

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 315**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2007 PCT/US2007/065274**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2007 WO07117996**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2007 E 07759500 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2007425**

54 Título: **Métodos para tratar afecciones asociadas con la activación del complemento dependiente de MASP-2**

30 Prioridad:

03.04.2006 US 788876 P
22.12.2006 US 645359

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.11.2016

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF LEICESTER (50.0%)
UNIVERSITY ROAD, LEICESTER,
LEICESTERSHIRE LE1 7RH, GB y
OMEROS CORPORATION (50.0%)

72 Inventor/es:

SCHWAEBLE, HANS-WILHELM;
STOVER, CORDULA MARGARET;
TEDFORD, CLARK E.;
PARENT, JAMES B. y
FUJITA, TEIZO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 589 315 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

Métodos para tratar afecciones asociadas con la activación del complemento dependiente de MASP-2

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para inhibir los efectos adversos de la activación del complemento dependiente de MASP-2.

Antecedentes de la invención

El sistema del complemento proporciona un mecanismo de acción temprana para iniciar y ampliar la respuesta inflamatoria a la infección microbiana y otros ataques agudos (M.K. Liszewski 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 de primera línea valiosa contra patógenos potenciales, las actividades del complemento que promueven una respuesta inflamatoria protectora pueden también representar una amenaza potencial al hospedante (K.R. Kalli, et al., *Springer Semin. Immunopathol.* 75:417-431, 1994; B.P. Morgan, *Eur. J. Clinical Investig.* 24:219-228, 1994). Por ejemplo, los productos proteolíticos C3 y C5 atraen y activan neutrófilos. Estas células activadas son indiscriminadas en su liberación de enzimas destructivas y pueden causar daño orgánico. Además, la activación del complemento puede causar la deposición de componentes del complemento líticos en células hospedantes aledañas así como también en dianas microbianas, produciendo la lisis de la célula hospedante.

El sistema del complemento se ha implicado como contribuyente a la patogénesis de diversas enfermedades agudas y crónicas, incluidos infarto de miocardio, revascularización que le sigue a accidente cerebrovascular, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), lesión de reperfusión, choque septicémico, fuga capilar que le sigue a quemaduras térmicas, inflamación post-derivación cardiopulmonar, rechazo de trasplante, artritis reumatoidea, esclerosis múltiple, miastenia grave y enfermedad de Alzheimer. Prácticamente en todas estas afecciones, el complemento no es la causa, sino uno de los diversos factores implicados en la patogénesis. No obstante, la activación del complemento puede ser un mecanismo patológico importante y representa un punto para el control clínico en muchos de estos estados de enfermedad. El reconocimiento cada vez mayor de la importancia de la lesión del tejido mediada por el complemento en una diversidad de estados de enfermedad subraya la necesidad de fármacos eficaces inhibidores del complemento. No se ha aprobado ningún fármaco para uso en seres humanos que se dirija específicamente e inhiba la activación del complemento.

Actualmente, está ampliamente aceptado que el sistema del complemento puede activarse a través de tres vías distintas: la vía clásica, la vía de lectinas y la vía alternativa. La vía clásica es usualmente desencadenada por la unión de un anticuerpo a una partícula extraña (es decir, un antígeno) y por lo tanto requiere la exposición previa a ese 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 es parte del sistema inmunológico adquirido. En contraste, tanto la ruta de las lectinas como la ruta alternativa son independientes de la inmunidad clonal y forman parte del sistema inmunológico innato.

La primera etapa en la activación de la vía clásica es la unión de una molécula de reconocimiento específica, C1q, a IgG e IgM de unión a antígenos. La activación del sistema del complemento produce la activación secuencial de zimógenos de serina proteasa. La C1q está asociada con las proenzimas de serina proteasa C1r y C1s como un complejo llamado C1 y, tras la unión de C1q a un complejo inmune, a la escisión autoproteolítica del sitio Arg-Ile de C1r le sigue la activación por C1r de C1s, que adquiere así la capacidad de escindir C4 y C2. La escisión de C4 en dos fragmentos, denominados C4a y C4b, permite que los fragmentos C4b formen enlaces covalentes con los grupos hidroxilo o amino adyacentes y la subsiguiente generación de convertasa C3 (C4b2b) a través de la interacción no covalente con el fragmento C2b de C2 activada. La convertasa C3 (C4b2b) activa C3, lo que lleva a la generación de la convertasa C5 (C4b2b3b) y a la formación del complejo de ataque a 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 exógenas, que son reconocidas por los receptores del complemento en múltiples fagocitos.

Independientemente, el primer paso en la activación del sistema del complemento por la vía de lectinas es también la unión de moléculas de reconocimiento específicas, seguida por la activación de serina proteasas asociadas. No obstante, en lugar de la unión de complejos inmunes por C1q, las moléculas de reconocimiento en la vía de lectinas son proteínas unidas a carbohidratos (lectina de unión a manano (MBL), H-ficolina, M-ficolina y L-ficolina) (J. Lu et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1572:387-400, 2002; Holmskov et al., *Annu. Rev. Immunol.* 21:547-578 (2003); Teh et al., *Immunology* 101:225-232 (2000)). Ikeda et al. fueron los primeros en demostrar que, al igual que C1q, la MBL podía activar el sistema del complemento tras la unión a eritrocitos recubiertos con manano en un modo dependiente de C4 (K. Ikeda et al., *J. Biol. Chem.* 2(52):7451-7454, 1987). La MBL, un miembro de la familia de la proteína colectina, es una lectina dependiente del calcio que se une a carbohidratos con grupos 3 y 4-hidroxi orientados en el plano ecuatorial del anillo piranosa. Por lo tanto, los ligandos prominentes para MBL son D-manosa y N-acetil-D-glucosamina, mientras que los carbohidratos que no cumplen este requerimiento estérico tienen afinidad indetectable hacia MBL (Weis, W.I., et al., *Nature* 360:127-134, 1992). La interacción entre MBL y azúcares

monovalentes es extremadamente débil, con constantes de disociación típicamente en el intervalo 2 mM. La MBL logra unión firme y específica a ligandos de glicano por interacción con múltiples residuos de monosacáridos simultáneamente (Lee, R.T., et al., *Archiv. Biochem. Biophys.* 299:129-136, 1992). La MBL reconoce los patrones del

5 En contraste, la MBL no reconoce la D-galactosa ni el ácido siálico, los penúltimos y últimos azúcares que usualmente decoran glucoconjugados complejos "maduros" presentes en glucoproteínas de la superficie celular y en el plasma de mamíferos. Se cree que esta especificidad de unión ayuda a proteger contra la autoactivación. No obstante, la MBL se une con gran afinidad a grupos de glicanos "precursores" de gran contenido de manosa en

10 glucoconjugados y glucolípidos unidos por N secuestrados en la retícula endoplasmática y en el Golgi de células mamíferas (Maynard, Y., et al., *J. Biol. Chem.* 257:3788-3794, 1982). En consecuencia, las células dañadas son dianas potenciales para la activación de la vía de lectinas mediante la unión a la MBL.

Las ficolinas poseen un tipo distinto de dominio de lectina que la MBL, llamado dominio de tipo fibrinógeno. Las ficolinas se unen a residuos de azúcar en un modo independiente del Ca^{++} . En seres humanos, se han identificado tres clases de ficolinas, L-ficolina, M-ficolina y H-ficolina. Ambas ficolinas del suero, L-ficolina y H-ficolina, tienen en

15 común una especificidad hacia N-acetil-D-glucosamina; no obstante, la H-ficolina también se une a N-acetil-D-galactosamina. La diferencia en la especificidad del azúcar de L-ficolina, H-ficolina y MBL significa que las diferentes lectinas pueden ser complementarias y dirigir glucoconjugados diferentes aunque superpuestos. Este concepto es respaldado por el informe reciente que indica que, de las lectinas conocidas en la vía de lectinas, solamente L-ficolina se une específicamente al ácido lipoteicoico, un glucoconjugado de la pared celular que se halla en todas las

20 bacterias grampositivas (Lynch, N.J., et al., *J. Immunol.* 172:1198-1202, 2004). Las colectinas (es decir, MBL) y las ficolinas no portan similitud importante en la secuencia de aminoácidos. No obstante, los dos grupos de proteínas tienen organizaciones de dominios similares y, al igual que C1q, se agrupan en estructuras oligoméricas, que maximizan la posibilidad de la unión a múltiples sitios. Las concentraciones séricas de MBL son altamente variables en poblaciones sanas, y esto es controlado genéticamente por el polimorfismo/mutaciones tanto en las regiones

25 promotoras con codificantes del gen de MBL. Como proteína de fase aguda, la expresión de MBL además aumenta durante la inflamación. La L-ficolina está presente en el suero a concentraciones similares a la MBL. Por lo tanto, la rama de L-ficolina de la vía de lectinas es potencialmente comparable con la rama de MBL en cuanto a fuerza. La MBL y las ficolinas también pueden funcionar como opsoninas, que requieren la interacción de estas proteínas con receptores de fagocitos (Kuhlman, M., et al., *J. Exp. Mecl.* 169:1733, 1989; Matsushita, M., et al., *J. Biol. Chem.* 271:2448-54, 1996). No obstante, las identidades del receptor o los receptores en las células fagocíticas no han sido establecidas.

La MBL humana forma una interacción específica y de gran afinidad a través de su dominio de tipo colágeno con serina proteasas de tipo C1r/C1s, denominadas serina proteasas asociadas a MBL (MASP). Hasta la fecha, se han descrito tres MASP. Primero, se identificó una "MASP" de una sola enzima y se caracterizó como la enzima

35 responsable del inicio de la cascada del complemento (es decir, escisión de C2 y C4) (Ji, Y.H., et al., *J. Immunol.* 150:571-578, 1993). Posteriormente, resultó que la MASP es de hecho una mezcla de dos proteasas: MASP-1 y MASP-2 (Thiel, S., et al., *Nature* 386:506-510, 1997). No obstante se demostró que el complejo MBL-MASP-2 solo es suficiente para la activación del complemento (Vorup-Jensen, T., et al., *J. Immunol.* 165:2093-2100, 2000). Asimismo, solamente la MASP-2 escindió C2 y C4 en altas tasas (Ambrus, G., et al., *J. Immunol.* 170:1374-1382, 2003). Por consiguiente, la MASP-2 es la proteasa responsable de activar C4 y C2 para generar la convertasa C3, C4b2b. Esta es una diferencia importante del complejo C1, en donde la acción coordinada de dos serina proteasas específicas (C1r y C1s) conduce a la activación del sistema del complemento. Recientemente, se aisló una tercera proteasa nueva, MASP-3 (Dahl, M.R., et al., *Immunity* 15:127-35, 2001). MASP-1 y MASP-3 son productos

40 alternativamente empalmados del mismo gen. Las funciones biológicas de MASP-1 y MASP-3 permanecen irresueltas.

Las MASP son organizaciones de dominios idénticos a aquellos 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 morfogénico veg/óseo de erizo de mar/C1r/C1s N-terminal (CUB), un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico, un segundo dominio CUB, un tándem de los dominios de la proteína de control del complemento y un dominio de serina

50 proteasa. Como en las C1 proteasas, la activación de MASP-2 ocurre a través de la escisión de un enlace Arg-Ile adyacente al mismo dominio de la serina proteasa, que divide la enzima en cadenas A y B unidas a disulfuro, en donde la última consiste en el dominio de serina proteasa. Recientemente, se describió una deficiencia genéticamente determinada de MASP-2 (Stengaard-Pedersen, K., et al., *New Eng. J. Mecl.* 349:554-560, 2003). La mutación de nucleótidos sencillos conduce a un intercambio Asp-Gly en el dominio CUB1 y torna la MASP-2 incapaz de unirse a MBL.

La MBL está también asociada con una proteína no enzimática denominada proteína asociada a MBL de 19 kDa (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). La MAp19 se forma por el empalme alternativo del producto génico de MASP 2 y comprende los primeros dos dominios de MASP-2, seguidos por una secuencia extra de cuatro aminoácidos

60 únicos. Los genes de MASP 1 y MASP 2 están ubicados en los cromosomas 3 y 1, respectivamente (Schwaeble, W., et al., *Immunobiology* 205:455-466, 2002).

Varias líneas de evidencia sugieren que hay diferentes complejos de MBL-MASP y una gran fracción de las MASP

totales en el suero no forma complejo con MBL (Thiel, S., et al., *J. Immunol.* 165:878-887, 2000). Tanto la ficolina H como la L están asociadas con MASP y activan la vía del complemento de lectinas, al igual que la MBL (Dahl, M.R., et al., *Immunity* 15:127-35, 2001; Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 168:3502-3506, 2002). La vía de lectinas y la vía clásica forman una convertasa C3 (C4b2b) y las dos vías convergen en esta etapa.

5 Se cree en gran medida que la vía de lectinas tiene una función importante en la defensa del hospedante contra infecciones. Los datos sólidos de la participación de la MBL en la defensa del hospedante provienen del análisis de pacientes con niveles séricos reducidos de MBL funcional (Kilpatrick, D.C., *Biochim. Biophys. Acta* 1572:401-413, 2002). Dichos pacientes exhiben susceptibilidad a infecciones fúngicas y bacterianas recurrentes. Estos síntomas por lo general son evidentes de manera temprana en la vida, durante una obvia vulnerabilidad a medida que se disipa la titulación de anticuerpos derivados de la madre, pero antes de que se desarrolle un repertorio completo de respuestas de anticuerpos. Este síndrome a menudo proviene de mutaciones en varios sitios en la porción de colágeno de la MBL, que interfieren con la formación correcta de oligómeros de MBL. No obstante, ya que la MBL puede funcionar como una opsonina independiente del complemento, no se sabe hasta qué grado el aumento de susceptibilidad a infecciones se debe a la activación del complemento.

15 Si bien existen muchos datos que implican tanto a la vía del complemento clásica como a la alternativa en la patogénesis de enfermedades humanas no infecciosas, la función de la vía de lectinas está ahora comenzando a ser evaluada. Estudios recientes aportan datos que indican que la activación de la vía de lectinas puede ser responsable de la activación del complemento y de la inflamación relacionada en lesión de isquemia/ reperusión. Collard et al. (2000) indicaron que las células endoteliales cultivadas, sometidas a estrés oxidativo se unen a MBL y exhiben deposición de C3 tras la exposición a suero humano (Collard, C.D., et al., *Am. J. Pathol.* 156:1549-1556, 2000). A su vez, el tratamiento de sueros humanos con anticuerpos monoclonales anti-MBL bloqueantes inhibió la unión a MBL y la activación del complemento. Estos hallazgos se extendieron a un modelo de rata de isquemia de miocardio-reperusión en el que las ratas tratadas con anticuerpo bloqueante dirigido contra MBL de rata exhibieron significativamente menos daño del miocardio tras la oclusión de una arteria coronaria, que las ratas tratadas con un anticuerpo control (Jordan, J.E., et al., *Circulation* 104:1413-1418, 2001). El mecanismo molecular de la unión de MBL al endotelio vascular después de estrés oxidativo no está del todo claro; un estudio reciente sugiere que la activación de la vía de lectinas después del estrés oxidativo puede ser mediada por la unión de MBL a citoqueratinas endoteliales vasculares y no a glucoconjugados (Collard, C.D., et al., *Am. J. Pathol.* 159:1045-1054, 2001). Otros estudios han implicado a la vía clásica y a la vía alternativa en la patogénesis de la lesión de isquemia/reperusión, y la función de la vía de lectinas en esta enfermedad sigue siendo controvertida (Riedermann, N.C., et al., *Am. J. Pathol.* 162:363-367, 2003).

En contraste con las vías clásica y de lectinas, no se han hallado iniciadores de la vía alternativa que cumplan las funciones de reconocimiento que efectúan la C1q y las lectinas en las otras dos vías. Actualmente se acepta ampliamente que la vía alternativa es desencadenada espontáneamente por superficies externas y anormales (bacterias, levadura, células infectadas por virus o tejido dañado). Hay cuatro proteínas plasmáticas directamente implicadas en la vía alternativa: C3, factores B y D y properdina. La generación proteolítica de C3b de C3 nativo se requiere para que funcione la vía alternativa. Dado que la convertasa C3 de la vía alternativa (C3bBb) contiene C3b como una subunidad esencial, la cuestión con respecto al origen de la primera C3b mediante la vía alternativa ha presentado un enigma y ha promovido una investigación considerable.

40 C3 pertenece a la familia de proteínas (junto con C4 y α -2 macroglobulina) que contienen una rara modificación post-traducción conocida como enlace tioéster. El grupo tioéster está compuesto por una glutamina cuyo grupo carbonilo terminal está unido al grupo sulfhidrilo de una cisteína a tres aminoácidos de distancia. Este enlace es inestable y el grupo carbonilo electrófilo de la glutamina puede formar un enlace covalente con otras moléculas mediante los grupos hidroxilo o amino. El enlace tioéster es razonablemente estable cuando se secuestra dentro de un bolsillo hidrófilo de C3 intacta. Sin embargo, la escisión proteolítica de C3 a C3a y C3b resulta en la exposición del enlace tioéster altamente reactivo en C3b y mediante este mecanismo, C3b se acopla covalentemente a una diana. Además de su función bien documentada en la unión covalente de C3b a dianas del complemento, también se cree que el tioéster de C3 tiene una función pivotal en desencadenar la vía alternativa. Según la teoría "poco avanzada" y ampliamente aceptada, la vía alternativa es iniciada por la generación de una convertasa de fase fluida, iC3Bb, que se forma a partir de C3 con tioéster hidrolizado (iC3; C3(H₂O)) y factor B (Lachmann, P.J., et al., *Springer Semin. Immunopathol.* 7:143-162, 1984). iC3 de tipo C3b se genera a partir de C3 nativa mediante hidrólisis espontánea lenta del tioéster interno en la proteína (Pangburn, M.K., et al., *J. Exp. Med.* 154:856-867, 1981). A través de la actividad de la convertasa iC3Bb, las moléculas de C3b se depositan en la superficie diana, iniciando de este modo la vía alternativa.

55 Se sabe muy poco acerca de los iniciadores de activación de la vía alternativa. Se cree que los activadores incluyen paredes de células de levadura (cimosano), muchos polisacáridos puros, eritrocitos de conejo, ciertas inmunoglobulinas, virus, hongos, bacterias, células tumorales animales, parásitos y células dañadas. La única característica en común con estos activadores es la presencia de carbohidrato, pero la complejidad y variedad de las estructuras de los carbohidratos ha hecho difícil que se puedan establecer los determinantes moleculares compartidos, los cuales se reconocen.

La vía alternativa puede también proporcionar un potente bucle de ampliación para la convertasa de la vía de

lectinas/clásica (C4b2b), ya que cualquier C3b generado puede participar con el factor B en la formación de la convertasa C3 de la vía alternativa (C3bBb) adicional. La convertasa C3 de la vía alternativa se estabiliza mediante la unión de properdina. La properdina extiende seis a diez veces la semivida de la convertasa C3 de la vía alternativa. La adición de C3b a la convertasa C3 conduce a la formación de la convertasa C5 de la vía alternativa.

- 5 Se ha pensado que las tres vías (es decir, la clásica, la de lectinas y la alternativa) convergen en C5, que se escinde para formar productos con múltiples efectos proinflamatorios. Se ha hecho referencia a la vía de convergencia como la vía del complemento terminal. C5a es la anafilatoxina más potente, que induce alteraciones en el músculo liso y en el tono vascular, así como también permeabilidad vascular. Es también una poderosa quimiotaxina y un activador de neutrófilos y monocitos. La activación celular mediada por C5a puede ampliar significativamente las respuestas inflamatorias, induciendo la liberación de múltiples mediadores inflamatorios adicionales, incluidas citocinas, enzimas hidrolíticas, metabolitos de ácido araquidónico y especies de oxígeno reactivas. La escisión de C5 conduce a la formación de C5b-9, también conocida como el complejo de ataque a la membrana (MAC). Existe ahora una fuerte evidencia de que la deposición de MAC sublítica puede cumplir una función importante en la inflamación, además de su función como complejo formador de poros líticos.
- 10
- 15 El documento WO 2005/123128 describe el uso de agentes inhibidores de MASP-2 que incluyen anticuerpos que se unen a una ubicación dentro de los aminoácidos 1-176 de la MASP-2 humana.

Compendio de la invención

Se describe en la presente invención un método para inhibir los efectos adversos de la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto vivo. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2. En este contexto, la frase "activación del complemento dependiente de MASP-2" se refiere a la activación del complemento de la ruta alternativa que ocurre mediante el sistema MASP-2 dependiente de lectina. El agente inhibidor de MASP-2 inhibe la activación del complemento mediante el sistema MASP-2 dependiente de lectina sin inhibir sustancialmente la activación del complemento a través del sistema dependiente de C1q clásico, de modo tal que el sistema dependiente de C1q permanece funcional.

20

25

El agente inhibidor de MASP-2 es un anticuerpo anti-MASP-2 o su fragmento. El anticuerpo anti-MASP-2 puede tener la función efectora reducida. También se describen agentes inhibidores de MASP-2 en los que hay un péptido inhibidor de MASP-2 o un inhibidor de MASP-2 no peptídico.

En la presente invención se describen composiciones para inhibir los efectos adversos de la activación del complemento dependiente de MASP-2, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, también se describen en este documento métodos para elaborar un medicamento para uso en la inhibición de los efectos adversos de la activación del complemento dependiente de MASP-2 en sujetos vivos que lo necesitan, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico. También se describen métodos para elaborar medicamentos para uso en la inhibición de la activación del complemento dependiente de MASP-2 para el tratamiento de cada una de las afecciones, enfermedades o trastornos que se describen a continuación en este documento.

30

35

Los métodos, composiciones y medicamentos descritos en este documento son útiles para inhibir los efectos adversos de la activación del complemento dependiente de MASP-2 *in vivo* en sujetos mamíferos, incluidos seres humanos que sufren una afección o lesión patológica aguda como se describirá en más detalle en la presente invención. Dichas afecciones o lesiones incluyen, aunque sin limitarse a ello, la activación del complemento mediada por MASP-2 en trastornos autoinmunes asociados y/o en afecciones inflamatorias.

40

En un aspecto de la invención, se dan a conocer usos para el tratamiento de lesiones de reperfusión por isquemia, tratando a un sujeto que experimenta una reperfusión isquémica, lo que incluye, de manera no taxativa, después de la reparación de un aneurisma aórtico, derivación cardiopulmonar, renastomosis vascular en relación con, por ejemplo, trasplante de órgano (p. ej., de corazón, pulmón, hígado, riñón) y/o reimplante de una extremidad/dígito, accidente cerebrovascular, lesión pulmonar aguda, infarto de miocardio, reanimación hemodinámica después de procedimientos de choque y/o quirúrgicos, con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico.

45

También se describen métodos para la inhibición de aterosclerosis, tratando a un sujeto que sufre de o es propenso a aterosclerosis, con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico.

50

También se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que experimenta una afección vascular que incluye, sin limitación, afecciones cardiovasculares, afecciones cerebrovasculares, afecciones periféricas (p. ej. musculoesqueléticas) afecciones vasculares, afecciones renovasculares, vasculares mesentéricas/entéricas y revascularización a trasplantes y/o reimplantes, tratando a dichos pacientes con una cantidad terapéuticamente eficaz de agente inhibidor de MASP-2. Dichas afecciones incluyen, sin limitación, el tratamiento de: vasculitis, incluida nefritis púrpura de Henoch-Schonlein, vasculitis

55

asociada a lupus eritematoso sistémico, vasculitis asociada a artritis reumatoidea (también llamada artritis reumatoidea maligna), vasculitis del complejo inmunológico y enfermedad de Takayasu; cardiomiopatía dilatada; angiopatía diabética; enfermedad de Kawasaki (arteritis); embolia gaseosa venosa (VGE); y/o restenosis que sigue a la colocación de un stent, aterectomía rotacional y/o angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA).

- 5 También se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece trastornos gastrointestinales inflamatorios, incluidos, aunque sin limitarse a ello, pancreatitis, diverticulitis y trastornos intestinales que incluyen enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y síndrome de intestino irritable.

También se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece una afección pulmonar, lo que incluye, aunque sin limitación, síndrome de dificultad respiratoria aguda, lesión pulmonar aguda relacionada con una transfusión, lesión pulmonar aguda por isquemia/reperfusión, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, granulomatosis de Wegener, enfermedad antimembrana basal glomerular (enfermedad de Goodpasture), síndrome de aspiración de meconio, síndrome de bronquiolitis obliterante, fibrosis pulmonar idiopática, lesión pulmonar aguda secundaria a quemadura, edema pulmonar no cardiogénico, depresión respiratoria relacionada con transfusión y enfisema.

15 También se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que se ha sometido, se está sometiendo o se someterá a un procedimiento de reperfusión extracorpóreo, incluidos, aunque sin limitarse a ello, hemodiálisis, plasmaféresis, leucoféresis, oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO), precipitación de LDL por oxigenación por membrana extracorpórea inducida por heparina (HELP) y derivación cardiopulmonar (CPB).

20 También se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece una afección musculoesquelética, lo que incluye, aunque sin limitarse a ello, artrosis, artritis reumatoidea, artritis reumatoidea juvenil, gota, artropatía neuropática, artritis sorriásica, espondilitis anquilosante u otras espondiloartropatías y artropatías cristalinas o lupus eritematoso sistémico (SLE).

25 También se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece afecciones renales que incluyen, aunque sin limitarse a ello, glomerulonefritis esangioproliferativa, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis membranoproliferativa (glomerulonefritis mesangiocapilar), glomerulonefritis post-infecciosa aguda (glomerulonefritis postestreptocócica), glomerulonefritis crioglobulinémica, nefritis por lupus, nefritis por púrpura de Henoch-Schonlein o nefropatía de IgA.

30 También se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece una afección de la piel que incluye, aunque sin limitación, dermatosis bullosa autoinmune, espongiosis eosinofílica, penfigoide bulloso, epidermólisis bullosa adquirida y herpes gestacional, y otros trastornos de la piel, o provenientes de una lesión por quemadura térmica o química que implica fuga capilar.

35 También se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que ha recibido un trasplante de órgano u otro tejido, lo que incluye, aunque sin limitarse a ello, alotrasplante o xenotrasplante de órganos enteros (p.ej., riñón, corazón, hígado, páncreas, pulmón, córnea, etc.) o injertos (p. ej., válvulas, tendones, médula ósea, etc.).

40 También se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece un trastorno o lesión del sistema nervioso central o un trastorno o lesión del sistema nervioso periférico que incluye, sin limitación, esclerosis múltiple (MS), miastenia grave (MG), enfermedad de Huntington (HD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), síndrome de Guillain Barre, reperfusión que le sigue a accidente cerebrovascular, discos degenerativos, traumatismo cerebral, enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Alzheimer (AD), síndrome de Miller-Fisher, traumatismo cerebral y/o desmielinación por hemorragia y meningitis.

45 También se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece un trastorno de la sangre que incluye, aunque sin limitarse a ello, septicemia o una afección que resulta de septicemia, incluidos, sin limitación, septicemia severa, choque septicémico, síndrome de dificultad respiratoria aguda resultante de septicemia y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Se dan a conocer métodos relacionados para el tratamiento de otros trastornos de la sangre, incluido choque hemorrágico, anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica trombótica autoinmune (TTP), síndrome urémico hemolítico (HUS) u otras afecciones destructivas de la médula/sangre.

50 También se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece una afección urogenital que incluye, aunque sin limitarse a ello, enfermedad de vejiga dolorosa, enfermedad de vejiga sensorial, cistitis abacteriana crónica y cistitis intersticial, esterilidad masculina y femenina, disfunción placentaria y aborto espontáneo y pre-eclampsia.

55 También se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece diabetes no obesa (diabetes de tipo 1 o diabetes mellitus insulino dependiente) o complicaciones de angiopatía, neuropatía o retinopatía por diabetes de tipo 1 o de tipo 2 (del adulto).

5 También se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que recibe tratamiento de quimioterapia y/o radioterapia, incluido sin limitación el tratamiento de afecciones cancerosas, administrando un inhibidor de MASP-2 a dicho paciente en forma periquimioterapéutica o por perirradioterapia, es decir, antes y/o durante y/o después de la administración de agente(s) quimioterapéutico(s) y/o radioterapia. La administración de la terapia periquimioterapéutica o por perirradioterapia de inhibidores de MASP-2 puede ser útil para reducir los efectos colaterales de la terapia quimioterapéutica o la radioterapia. Incluso en otro aspecto de la invención, se dan a conocer métodos para el tratamiento de malignidades, administrando un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéuticamente aceptable a un paciente que sufre una malignidad.

10 También se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece un trastorno endocrino, administrando a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico. Las afecciones sujetas al tratamiento de acuerdo con la presente invención incluyen, a modo de ejemplo no limitativo, tiroiditis de Hashimoto, estrés, ansiedad y otros trastornos hormonales potenciales que implican la liberación regulada de prolactina, factor de crecimiento o factor de crecimiento de tipo insulina y adrenocorticotropina de la glándula hipófisis.

15 También se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece degeneración macular relacionada con la edad u otra afección oftalmológica mediada por el complemento, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que padece dicha afección.

Breve descripción de los dibujos

20 Los aspectos precedentes y muchas de las ventajas concomitantes de la presente invención se apreciarán más fácilmente a medida que los mismos se entiendan mejor por referencia a la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos, en donde:

La Figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra el nuevo descubrimiento de que la nueva vía del complemento alternativa requiere la activación de MASP-2 dependiente de la vía de lectinas para la activación del complemento;

25 La Figura 2 es un diagrama que ilustra la estructura genómica de la MASP-2 humana;

La Figura 3A es un diagrama esquemático que ilustra la estructura de dominio de la proteína MASP-2 humana;

La Figura 3B es un diagrama esquemático que ilustra la estructura de dominio de la proteína MAPl9 humana;

La Figura 4 es un diagrama que ilustra la estrategia de inactivación de genes de MASP-2 murinos;

La Figura 5 es un diagrama que ilustra el constructo de minigen de MASP-2;

30 La Figura 6A presenta resultados que demuestran que la deficiencia de MASP-2 produce la pérdida de la activación de C4 mediada por la vía de lectinas según lo medido por la falta de deposición de C4b en manano;

La Figura 6B presenta resultados que demuestran que la deficiencia de MASP-2 produce la pérdida de la activación de C4 mediada por la vía de lectinas según lo medido por la deposición de C4b en cimosano;

35 La Figura 6C presenta resultados que demuestran niveles relativos de activación de C4 en muestras de suero obtenidas de MASP-2+/-; MASP-2-/- y de cepas de tipo salvaje según lo medido por deposición de C4b en manano y en cimosano;

La Figura 7A presenta resultados que demuestran que la deficiencia de MASP-2 produce la pérdida de activación de C3 mediada por la vía de lectinas y mediada por la vía alternativa, según lo medido por la falta de deposición de C3b en manano;

40 La Figura 7B presenta resultados que demuestran que la deficiencia de MASP-2 produce la pérdida de la activación de C3 mediada por la vía de lectinas y por la vía alternativa, según lo medido por la falta de deposición de C3b en cimosano;

La Figura 8 presenta resultados que demuestran que la adición de MASP-2 recombinante de murino a muestras de suero MASP-2-/- recupera la activación de C4 mediada por la vía de lectinas in un modo dependiente de la concentración de proteínas, según lo medido por la deposición de C4b en manano;

45 La Figura 9 presenta resultados que demuestran que la vía clásica es funcional en la cepa de MASP-2-/-;

La Figura 10 presenta resultados que demuestran que el sistema de activación del complemento dependiente de MASP-2 se activa en la fase de isquemia/reperfusión que le sigue a la reparación de un aneurisma aórtico abdominal;

50 La Figura 11A presenta resultados que demuestran que el anticuerpo anti-MASP-2 Fab2 #11 inhibe la formación de

- la convertasa C3, como se describe en el Ejemplo 24;
- La Figura 11B presenta resultados que demuestran que el anticuerpo anti-MASP-2 Fab2 #11 se une a MASP-2 de rata natural, como se describe en el Ejemplo 24;
- 5 La Figura 11C presenta resultados que demuestran que el anticuerpo anti-MASP-2 Fab2 #41 inhibe la escisión de C4, como se describe en el Ejemplo 24;
- La Figura 12 presenta resultados que demuestran que todos los anticuerpos anti-MASP-2 Fab2 ensayados que inhibieron la convertasa C3 también inhibieron la escisión de C4, como se describe en el Ejemplo 24;
- La Figura 13 es un diagrama que ilustra los polipéptidos recombinantes derivados de MASP-2 de rata que se usaron para el mapeo del epítipo de los anticuerpos Fab2 de bloqueo de anti-MASP-2, como se describe en el Ejemplo 25;
- 10 La Figura 14 presenta resultados que demuestran la unión de anti-MASP-2 Fab2 #40 y #60 a polipéptidos MASP-2 de rata, como se describe en el Ejemplo 25;
- La Figura 15 presenta resultados que demuestran el aclaramiento de nitrógeno ureico en la sangre para ratones de tipo salvaje (+/+) y MASP-2 (-/-) 24 y 48 horas después de la reperusión en un modelo de lesión de isquemia/reperusión renal, como se describe en el Ejemplo 26;
- 15 La Figura 16A presenta resultados que demuestran el tamaño del infarto para ratones de tipo salvaje (+/+) y el tamaño del infarto reducido en ratones MASP-2 (-/-) después de una lesión en una oclusión de la arteria coronaria y en un modelo de reperusión, como se describe en el Ejemplo 27;
- La Figura 16B presenta resultados que muestran la distribución de animales individuales ensayados en el modelo de oclusión y reperusión de una arteria coronaria, como se describe en el Ejemplo 27;
- 20 La Figura 17A presenta resultados que muestran los niveles de proteínas VEGF iniciales en el complejo RPE-coroides aislado de ratones de tipo salvaje (+/+) y MASP-2 (-/-), como se describe en el Ejemplo 28;
- La Figura 17B presenta resultados que muestran los niveles de proteínas VEGF en el complejo RPE-coroides en el día 3 en ratones de tipo salvaje (+/+) y MASP-2 (-/-) después de la lesión inducida por láser en un modelo de degeneración macular, como se describe en el Ejemplo 28;
- 25 La Figura 18 presenta resultados que demuestran el volumen de neovascularización coroidea media (CNV) en el día siete después de la lesión inducida por láser en ratones de tipo salvaje (+/+) y MASP-2 (-/-), como se describe en el Ejemplo 28;
- La Figura 19 presenta resultados que muestran la puntuación de artritis clínica media de ratones de tipo salvaje (+/+) y MASP-2 (-/-) con el paso del tiempo después de artritis reumatoidea inducida por Col2 mAb, como se describe en el Ejemplo 29;
- 30 La Figura 20A es un diagrama que muestra la ruptura dirigida del gen sMAP (Map 19), como se describe en el Ejemplo 30;
- La Figura 20B presenta un análisis de Southern del ADN genómico de crías derivadas del apareamiento de ratones quiméricos sMAP (-/-) macho con ratones C57BL/6 hembra, como se describe en el Ejemplo 30;
- 35 La Figura 20C presenta un análisis PCR de genotipos de ratones de tipo salvaje (+/+) y sMAP (-/-), como se describe en el Ejemplo 30;
- La Figura 21A presenta un análisis Northern de ARN de sMAP y MASP-2 en ratones sMAP (-/-), como se describe en el Ejemplo 30;
- 40 La Figura 21B presenta un análisis RT-PCR cuantitativo de ADNc que codifica la cadena pesada (H) de MASP-2, la cadena ligera (L) de MASP-2 y sMAP, en ratones de tipo salvaje (+/+) y sMAP (-/-), como se describe en el Ejemplo 30;
- La Figura 22A presenta una inmunotransferencia de sMAP (-/-), es decir., MAP19 (-/-), que demuestra la deficiencia de MASP-2 y sMAP en suero de ratón, como se describe en el Ejemplo 30;
- 45 La Figura 22B presenta resultados que demuestran que se detectaron MASP-2 y sMAP en el complejo MBL-MASP-sMAP, como se describe en el Ejemplo 30;
- La Figura 23A presenta resultados que muestran la deposición de C4 en pocillos recubiertos con manano en el suero de ratones de tipo salvaje (+/+) y sMAP (-/-), como se describe en el Ejemplo 30;
- La Figura 23B presenta resultados que muestran la deposición de C3 en pocillos recubiertos con manano en el suero de ratones de tipo salvaje (+/+) y sMAP (-/-), como se describe en el Ejemplo 30;

La Figura 24A presenta resultados que demuestran la reconstitución del complejo MBL-MASP-sMAP en suero de sMAP (-/-), como se describe en el Ejemplo 30;

Las Figura 24B-D presentan resultados que muestran la unión competitiva de rsMAP y MASP-2i a MBL, como se describe en el Ejemplo 30;

- 5 Las Figura 25A-B presentan resultados que muestran la restauración de la actividad de deposición de C4 por adición de rMASP-2, pero no de rsMAP, como se describe en el Ejemplo 30;

Las Figura 26A-B presentan resultados que muestran la reducción de la actividad de deposición de C4 por la adición de rsMAP, como se describe en el Ejemplo 30; y

- 10 Las Figura 27A-C presentan resultados que muestran que la MASP-2 es responsable de la activación de derivación de C4 en C3, como se describe en el Ejemplo 31.

Descripción de la lista de secuencias

SEC ID NO:1 ADNc de MAp19 humana

SEC ID NO:2 proteína MAp19 humana (con líder)

SEC ID NO:3 proteína MAp19 humana (madura)

- 15 SEC ID NO:4 ADNc de MASP-2 humana

SEC ID NO:5 proteína MASP-2 humana (con líder)

SEC ID NO:6 proteína MASP-2 humana (madura)

SEC ID NO:7 ADNc de MASP-2 humana (exones 1-6)

ANTÍGENOS: (CON REFERENCIA A LA PROTEÍNA MADURA MASP-2)

- 20 SEC ID NO:8 secuencia CUBI (aa 1-121)

SEC ID NO:9 secuencia CUBEGF (aa 1-166)

SEC ID NO: 10 CUBEGFCUBII (aa 1-293)

SEC ID NO: 11 región EGF (aa 122-166)

SEC ID NO: 12 dominio de serina proteasa (aa 429 - 671)

- 25 SEC ID NO: 13 dominio de serina proteasa inactivo (aa 610-625 con Ser618 para la mutación Ala)

SEC ID NO: 14 TPLGPKWPEPVFGRL (péptido CUBI)

SEC ID NO: 15

TAPPGYRLRLRYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLC GQ (péptido CUBI)

SEC ID NO: 16 TFRSDYSN (núcleo de la región de unión a MBL)

- 30 SEC ID NO: 17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (región de unión a MBL) SEC ID NO: 18 IDECQVAPG (PÉPTIDO EGF)

SEC ID NO: 19 ANMLCAGLESGGKDCRGGSGALV (núcleo de la región de unión a serina proteasa)Descripción detallada

INHIBIDORES DE PÉPTIDOS:

- 35 SEC ID NO:20 ADNc de longitud total MBL

SEC ID NO:21 proteína de longitud total MBL

SEC ID NO:22 OGK-X-GP (unión de consenso)

SEC ID NO:23 OGKLG SEC ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G SEC ID NO:25 GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GPO GPO SEC ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEPEGQLRGLQGPOGKLGPOG SEC ID NO:27

- 40 GAOGSOGKGAOGPQGPOGPOGKMGPKGEOGDO (h-ficolina humana)

SEC ID NO:28

GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOGPN GAOGEO (ficolina humana p35)

SEC ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI (sitio de escisión C4)

INHIBIDORES DE EXPRESIÓN:

SEC ID NO:30 ADNc del dominio CUBI-EGF (nucleótidos 22-680 de SEC ID NO:4)

5 SEC ID NO:31

5' CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC 3'

Nucleótidos 12-45 de SEC ID NO:4 incluido el sitio de inicio de la traducción MASP-2 (sentido)

SEC ID NO:32

5 'G AC ATT ACCTTCCGCTCCG ACTCC A ACG AG A AG3'

10 Nucleótidos 361-396 de SEC ID NO:4 que codifican una región que comprende la unión al sitio de MBL, MASP-2 (sentido)

SEC ID NO:33

5 AGC AGCCCTG A AT ACCC ACGGCCGT ATCCC A A A3'

Nucleótidos 610-642 de SEC ID NO:4 que codifican una región que comprende el dominio CUBII

15 CEBADORES DE CLONACIÓN:

SEC ID NO:34 CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC (5' PCR para CUB)

SEC ID NO:35 GGAATTCCTAGGCTGCATA (3' PCR PARA CUB)

SEC ID NO:36 GGA ATTCCT AC AGGGCGCT (3' PCR PARA CUBIEGF) SEC ID NO:37 GGAATTCCTAGTAGTGGAT (3' PCR PARA CUB IEGFCUBII)

20 SEC ID NOS:38-47 son cebadores de clonación para el anticuerpo humanizado

SEC ID NO:48 es un enlace peptídico 9 aa

VECTOR DE EXPRESIÓN:

SEC ID NO:49 es el inserto del minigen MASP-2

SEC ID NO: 50 es el ADNc de MASP-2 murina

25 SEC ID NO: 51 es la proteína MASP-2 murina (con líder)

SEC ID NO: 52 es la proteína MASP-2 murina madura

SEC ID NO: 53 ADNc de MASP-2 de rata

SEC ID NO: 54 es la proteína MASP-2 de rata (con líder)

SEC ID NO: 55 es la proteína MASP-2 de rata madura

30 SEC ID NO: 56-59 son los oligonucleótidos para mutagénesis del sitio dirigido de MASP-2 humana que se usan para generar MASP-2A humana

SEC ID NO: 60-63 son los oligonucleótidos para mutagénesis de sitio dirigido de MASP-2 murina que se usan para generar MASP-2A murina

35 SEC ID NO: 64-65 son los oligonucleótidos para mutagénesis de sitio dirigido de MASP-2 de rata que se usan para generar MASP-2A de rata

Descripción detallada

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de los presentes inventores de que la MASP-2 es necesaria para iniciar la activación de la vía del complemento alternativa. A través del uso de un modelo de ratón con genes inactivados de MASP-2^{-/-}, los presentes inventores han demostrado que es posible inhibir la activación de la vía del complemento alternativa mediante la vía de MASP-2 mediada por lectinas, dejando la vía clásica intacta, estableciendo así la activación de MASP-2 dependiente de lectinas como un requerimiento para la activación del

complemento alternativa en ausencia de la vía clásica. La presente invención describe también el uso de MASP-2 como diana terapéutica para inhibir la lesión celular asociada con la activación de la vía del complemento alternativa mediada por lectinas, dejando intacto el componente de la vía clásica (dependiente de C1q) del sistema inmunológico.

5 I. Definiciones

A menos que se defina específicamente en este documento, todos los términos utilizados en la presente memoria tienen el significado que entendería el experto en la técnica de la presente invención. Las siguientes definiciones se proveen con fines de claridad con respecto a los términos que se utilizan en la memoria y en las reivindicaciones para describir la presente invención.

10 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "activación del complemento dependiente de MASP-2" se refiere a la activación del complemento de la ruta alternativa que ocurre mediante la activación de MASP-2 dependiente de lectina.

15 Tal como se emplea en la presente memoria, el término "vía alternativa" se refiere a la activación del complemento que es desencadenada, por ejemplo, por cimosano de paredes de células de hongos y levadura, lipopolisacárido (LPS) de membranas exteriores gramnegativas y eritrocitos de conejo, como también de muchos polisacáridos puros, eritrocitos de conejo, virus, bacterias, células tumorales animales, parásitos y células dañadas, y que tradicionalmente se ha creído que surge de la generación proteolítica espontánea de C3b del factor del complemento C3.

20 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "vía de lectinas" se refiere a la activación del complemento que ocurre mediante la unión específica de proteínas de unión a los carbohidratos del suero y no del suero, incluidas lectina de unión a manano (MBL) y ficolinas.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "vía clásica" se refiere a la activación del complemento que es desencadenada por el anticuerpo unido a una partícula extraña y que requiere la unión de la molécula de reconocimiento C1q.

25 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "agente inhibidor de MASP-2" se refiere a cualquier agente que inhibe o actúa directamente con la MASP-2 e inhibe eficazmente la activación del complemento dependiente de MASP-2, incluidos los anticuerpos anti-MASP-2 y sus fragmentos de unión a MASP-2, péptidos naturales y sintéticos, moléculas pequeñas, receptores de MASP-2 solubles, inhibidores de expresión e inhibidores naturales aislados, y también abarca péptidos que compiten con MASP-2 para la unión a otra molécula de reconocimiento (p. ej., MBL, H-ficolina, M-ficolina o L-ficolina) en la vía de lectinas, pero no abarca anticuerpos que se unen a dichas otras moléculas de reconocimiento. Los agentes de inhibición de MASP-2 útiles en el método de la invención pueden reducir la activación del complemento dependiente de MASP-2 por más de 20%, tal como más de 50%, tal como más de 90%. En una realización, el agente inhibidor de MASP-2 reduce la activación del complemento dependiente de MASP-2 por más de 90% (es decir, resultando en la activación del complemento de MASP-2 de solamente 10% o menos).

40 Tal como se emplea en la presente memoria, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos y sus fragmentos de anticuerpos, derivados de cualquier mamífero que produzca anticuerpos (p. ej., ratón, rata, conejo y primate, incluidos seres humanos), que se une específicamente a polipéptidos de MASP-2 o sus porciones. Los anticuerpos ilustrativos incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales y recombinantes; anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos); anticuerpos humanizados; anticuerpos murinos; anticuerpos quiméricos, anticuerpos monoclonales de ratón-humanos, de ratón-primate, de primate-humano; y anticuerpos anti-idiotipo, y pueden ser cualquier molécula intacta o sus fragmentos.

45 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción derivada de o relacionada con un anticuerpo anti-MASP-2 de longitud total, que en general incluye la unión al antígeno o su región variable. Los ejemplos ilustrativos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ y Fv, fragmentos scFv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

50 Tal como se emplea en la presente memoria, un fragmento de anticuerpo "Fv" o "scFv monocatenario" comprende los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena de polipéptidos sencilla. En general, el polipéptido Fv además comprende un enlazador de polipéptidos entre los dominios V_H y V_L, que permite que el scFv forme la estructura deseada para unión del antígeno.

Tal como se emplea en la presente memoria, un "anticuerpo quimérico" es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y regiones determinantes de complementaridad derivadas de un anticuerpo de una especie no humana (p. ej., roedor), mientras el resto de la molécula de anticuerpos deriva de un anticuerpo humano.

55 Tal como se emplea en la presente memoria, un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo quimérico que comprende una secuencia mínima que conforma regiones determinantes de complementaridad específicas de

inmunoglobulina humana que es trasplantada en un marco de anticuerpo humano. Los anticuerpos humanizados son proteínas típicamente recombinantes en las que solamente las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo son de origen no humano.

5 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "lectina de unión a manano" ("MBL") es equivalente a proteína de unión a manano ("MBP").

Tal como se emplea en la presente memoria, el "complejo de ataque a la membrana" ("MAC") hace referencia a un complejo de los cinco componentes principales terminales del complemento (C5-C9) que se inserta y rompe las membranas. También se denomina C5b-9.

10 Tal como se emplea en la presente memoria, "un sujeto" incluye a todos los mamíferos, incluidos sin limitación, seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, ovejas, cabras, vacas, conejos, cerdos y roedores.

15 Tal como se emplean en la presente memoria, los residuos de aminoácidos se abrevian de la siguiente manera: alanina (Ala;A), asparagina (Asn;N), ácido aspártico (Asp;D), arginina (Arg;R), cisteína (Cys;C), ácido glutámico (Glu;E), glutamina (Gln;Q), glicina (Gly;G), histidina (His;H), isoleucina (Ile;I), leucina (Leu;L), lisina (Lys;K), metionina (Met;M), fenilalanina (Phe;F), prolina (Pro;P), serina (Ser;S), treonina (Thr;T), triptófano (Trp;W), tirosina (Tyr;Y) y valina (Val;V).

20 En el sentido más amplio, los aminoácidos naturales pueden dividirse en grupos en función de la característica química de la cadena lateral de los respectivos aminoácidos. Por aminoácido "hidrófobo" se entiende o bien lie, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys o Pro. Por aminoácido "hidrófilo" se entiende o bien Gly, Asn, Gin, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg o His. Este agrupamiento de aminoácidos puede además dividirse en otra subclase de la siguiente manera. Por aminoácido "hidrófilo no cargado" se entiende o bien Ser, Thr, Asn o Gin. Por aminoácido "ácido" se entiende o bien Glu o Asp. Por aminoácido "básico" se entiende o bien Lys, Arg o His.

25 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "sustitución de aminoácidos conservadores" se ilustra con una sustitución entre aminoácidos dentro de cada uno de los siguiente grupos: (1) glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina, (2) fenilalanina, tirosina y triptófano, (3) serina y treonina, (4) aspartato y glutamato, (5) glutamina y asparagina, y (6) lisina, arginina e histidina.

El término "oligonucleótido", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o sus miméticos. Este término también abarca aquellas oligonucleobases compuestas por nucleótidos, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (esqueleto) naturales, así como también oligonucleótidos que tienen modificaciones no naturales.

30 II. La vía alternativa, una nueva comprensión

35 La vía alternativa del complemento fue descrita por primera vez por Louis Pillemer y sus colegas a principios de los años cincuenta en base a estudios en los que se usó cimosano elaborado a partir de las paredes celulares de levadura para activar el complemento (Pillemer, L. et al., *J. Exp. Med.* 103:1-13, 1956; Lepow, I.H., *J. Immunol.* 125:471-478, 1980). Desde entonces, el cimosano es considerado el ejemplo canónico de un activador específico de la vía alternativa en suero de seres humanos y de roedores (Lachmann, P.J., et al., *Springer Semin. Immunopathol.* 7:143-162, 1984; Van Dijk, H., et al., *J. Immunol. Methods* 85:233-243, 1985; Pangbum, M.K., *Methods in Enzymol.* 162:639-653, 1988). Un ensayo práctico y muy utilizado para la activación de la vía alternativa consiste en incubar suero en pocillos plásticos recubiertos con cimosano y determinar la cantidad de deposición de C3b en la fase sólida después de la incubación. Como se espera, hay una deposición sustancial de C3b en los pocillos recubiertos con cimosano después de la incubación con suero de ratón normal (Figura 7B). Sin embargo, la incubación de suero de ratones deficientes de MASP-2 homocigotos en pocillos recubiertos con cimosano produce una reducción sustancial en la deposición de C3b en comparación con aquella del suero normal. Asimismo, el uso del suero de ratones heterocigotos para deficiencia del gen *MASP 2* en este ensayo produce niveles de deposición de C3b que son intermedios entre aquellos obtenidos con suero de ratones deficientes de MASP-2 homocigotos y suero de ratones normales. Los resultados paralelos también se obtienen usando pocillos recubiertos con manano, otro tipo de polisacárido conocido por activar la vía alternativa (Figura 7A). Dado que los ratones normales y los deficientes de MASP-2 comparten la misma información genética, excepto por el gen *MASP 2*, estos resultados inesperados demuestran que la MASP-2 cumple una función esencial en la activación de la vía alternativa.

50 Estos resultados ofrecen una fuerte evidencia de que la vía alternativa no es una vía independiente, autónoma de la activación del complemento como se describe esencialmente en todos los libros de texto médicos y en los artículos de revisión recientes sobre el complemento. La visión actual y ampliamente sostenida es que la vía alternativa se activa en la superficie de ciertas dianas particuladas (microbios, cimosano, eritrocitos de conejo) a través de la ampliación de la activación de C3 espontánea "poco avanzada". Sin embargo, la ausencia de activación importante de la vía alternativa en el suero de ratones con genes inactivados de MASP-2 por dos "activadores" conocidos de la vía alternativa hace que sea improbable que la "teoría poco avanzada" describa un mecanismo fisiológico importante de activación del complemento.

Ya que se sabe que la proteasa MASP-2 tiene una función específica y bien definida como enzima responsable del

inicio de la cascada del complemento de lectina, estos resultados implican la activación de la vía de lectinas por cimosano y manano como un primer paso crítico para la activación subsiguiente de la vía alternativa. C4b es un producto de activación generado por la vía de lectinas, pero no por la vía alternativa. De conformidad con este concepto, la incubación de suero de ratón normal con pocillos recubiertos con cimosano o manano produce la deposición de C4b en los pocillos y esta deposición de C4b se reduce sustancialmente cuando los pocillos recubiertos se incuban con suero de ratones deficientes de MASP-2 (Figuras 6A, 6B y 6C).

La ruta alternativa, además de su función ampliamente aceptada como una vía independiente para la activación del complemento, puede también proporcionar un bucle de ampliación para la activación del complemento inicialmente desencadenada por las vías clásica y de lectinas (Liszewski, M.K. y J.P. Atkinson, 1993, en *Fundamental Immunology*, Tercera Edición, editado por W.E. Paul, Raven Press, Ltd., Nueva York; Schweinle, J.E., et al., *J. Clin. Invest.* 84:1821-1829, 1989). En este mecanismo de ampliación mediado por la vía alternativa, la convertasa C3 (C4b2b) generada por activación o bien de las cascadas del complemento clásica o de lectinas escinde C3 en C3a y C3b, y proporciona así C3b que puede participar en la formación de C3bBb, la convertasa C3 de la vía alternativa. La explicación probable de la ausencia de activación de la vía alternativa en suero de genes inactivados de MASP-2 es que se requiere la vía de lectinas para la activación del complemento inicial por cimosano, manano y otros "activadores" putativos de la vía alternativa, mientras que la vía alternativa cumple una función crucial en la ampliación de la activación del complemento. En otros términos, la vía alternativa es un bucle de ampliación de proacción dependiente de las vías del complemento de lectinas y clásica para la activación, en lugar de una cascada lineal independiente.

En lugar de que la cascada del complemento se active a través de tres vías distintas (vías clásica, alternativa y de lectinas) como se contempló anteriormente, nuestros resultados indican que es más preciso visualizar el complemento como compuesto por dos sistemas principales, que corresponden, en una primera aproximación, a las ramas innata (lectina) y adquirida (clásica) del sistema de defensas inmunológico del complemento. Las lectinas (MBP, M-ficolina, H-ficolina y L-ficolina) son las moléculas de reconocimiento específicas que desencadenan el sistema del complemento innato, y el sistema incluye el bucle de ampliación de la vía de lectinas y la vía alternativa asociada. C1q es la molécula de reconocimiento específica que desencadena el sistema de complemento adquirido y el sistema incluye el bucle de ampliación de la vía clásica y de la vía alternativa asociada. Hacemos referencia a estos dos sistemas de activación principales del complemento como el sistema del complemento dependiente de lectinas y el sistema del complemento dependiente de C1q, respectivamente.

Además de su función esencial en la defensa inmune, el sistema del complemento contribuye al daño del tejido en muchas afecciones clínicas. Por lo tanto, existe una necesidad imperativa de desarrollar inhibidores del complemento terapéuticamente eficaces para prevenir estos efectos adversos. Al reconocer que el complemento está compuesto por dos sistemas principales de activación del complemento, se llega a la conclusión de que sería muy conveniente inhibir específicamente solamente el sistema de activación del complemento que causa una patología particular sin desactivar por completo las capacidades de defensa inmunes del complemento. Por ejemplo, en los estados de enfermedad en los que la activación del complemento es mediada predominantemente por el sistema del complemento dependiente de lectinas, sería ventajoso inhibir específicamente solamente este sistema. Esto dejaría intacto el sistema de activación del complemento dependiente de C1q para manejar el procesamiento del complejo inmunológico y ayudar en la defensa del hospedante contra las infecciones.

El componente de proteína preferido para dirigir en el desarrollo de agentes terapéuticos a fin de inhibir específicamente el sistema del complemento dependiente de lectinas es MASP-2. De todos los componentes de proteínas del sistema del complemento dependiente de lectinas (MBL, H-ficolina, M-ficolina, L-ficolina, MASP-2, C2-C9, Factor B, Factor D y properdina), solamente la MASP-2 es única para el sistema del complemento dependiente de lectinas y requerida para que el sistema funcione. Las lectinas (MBL, H-ficolina, M-ficolina y L-ficolina) son también componentes únicos en el sistema del complemento dependiente de lectinas. No obstante, la pérdida de uno cualquiera de los componentes de lectina no necesariamente inhibiría la activación del sistema debido a la redundancia de lectinas. Sería necesario inhibir las cuatro lectinas con el fin de garantizar la inhibición del sistema de activación del complemento dependiente de lectinas. Asimismo, ya que también se sabe que la MBL y las ficolinas tienen actividad opsónica independiente del complemento, la inhibición de la función de las lectinas resultaría en la pérdida de este mecanismo beneficioso de defensa del hospedante contra las infecciones. En cambio, esta actividad opsónica de las lectinas independiente del complemento permanecería intacta si la MASP-2 fuese la diana inhibidora. Un beneficio agregado de la MASP-2 como diana terapéutica para inhibir el sistema de activación del complemento dependiente de lectinas es que la concentración en el plasma de MASP-2 está entre las más bajas de cualquier proteína del complemento (~ 500 ng/ml); por lo tanto, correspondientemente a las bajas concentraciones de inhibidores de MASP-2 de gran afinidad, se puede requerir la obtención de una inhibición total (Moller-Kristensen, M., et al., *J. Immunol Methods* 282:159-167, 2003).

III. Función de la MASP-2 en diversas enfermedades y afecciones y métodos terapéuticos que usan MASP-2 como agentes inhibidores

Lesión de isquemia y reperfusión

Le lesión de isquemia y reperfusión (I/R) ocurre cuando el flujo sanguíneo se restaura después de un periodo de

isquemia extenso. Es una causa común de morbimortalidad en un amplio espectro de enfermedades. Los pacientes quirúrgicos son vulnerables después de la reparación de un aneurisma aórtico, derivación cardiopulmonar, reanastomosis revascular en relación, por ejemplo, con trasplantes de órganos (p. ej., corazón, pulmón, hígado, riñón) y reimplante de dígitos/extremidades, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio y reanimación hemodinámica que le sigue a choque y/o procedimientos quirúrgicos. Los pacientes con enfermedades ateroscleróticas son propensos a infartos de miocardio, accidentes cerebrovasculares e isquemia de las extremidades inferiores e intestinal inducida por embolias. Los pacientes con traumatismo frecuentemente sufren de isquemia temporal de las extremidades. Además, cualquier causa de pérdida de sangre masiva produce una reacción de isquemia y reperfusión en todo el cuerpo.

La patofisiología de la lesión de isquemia y reperfusión es compleja, con por lo menos dos factores importantes que contribuyen al proceso de activación del complemento y a la estimulación de neutrófilos con lesión concomitante mediada por radicales de oxígeno. En la lesión I/R, la activación del complemento se describió por primera vez durante el infarto de miocardio hace más de 30 años, y ha conducido a numerosas investigaciones sobre la contribución del sistema del complemento a la lesión del tejido por I/R (Hill, J.H., et al., *J. Exp. Med.* 133:885-900, 1971). Los datos acumulados señalan ahora al complemento como mediador fundamental en la lesión I/R. La inhibición del complemento ha sido exitosa para limitar la lesión en varios modelos animales de I/R. En estudios iniciales, se logró la reducción de C3 después de la infusión del factor de veneno de cobra, que se informó como beneficiosa durante la I/R en riñón y corazón (Maroko, P.R., et al., 1978, *J. Clin. Invest.* 61:661-670, 1978; Stein, S.H., et al., *Miner Electrolyte Metab.* 11:256-61, 1985). No obstante, la forma soluble del receptor del complemento 1 (sCRI) fue el primer inhibidor específico del complemento utilizado para la prevención de la lesión de I/R de miocardio (Weisman, H.F., et al., *Science* 249:146-51, 1990). El tratamiento con sCRI durante la I/R de miocardio atenúa el infarto asociado con deposición reducida de complejos C5b-9 a lo largo del endotelio coronario e infiltración reducida de leucocitos después de la reperfusión.

En I/R de miocardio experimental, el inhibidor de CI esterasa (CI INH) administrado antes de la reperfusión previene la deposición de C1q y reduce significativamente el área de necrosis del músculo cardíaco (Buerke, M., et al., 1995, *Circulation* 91:393-402, 1995). Los animales genéticamente deficientes de C3 tienen menos necrosis del tejido local después de la isquemia musculoesquelética intestinal (Weiser, M.R., et al., *J. Exp. Mecl.* 183:2343-48, 1996).

El complejo de ataque a la membrana es el vehículo principal de lesión dirigida al complemento, y los estudios en animales deficientes de C5 han demostrado menos lesiones locales y remotas en modelos de lesión de I/R (Austen, W.G. Jr., et al., *Surgery* 126:343-48, 1999). Se ha demostrado que un inhibidor de la activación del complemento, CiTy soluble (gen Y relacionado con el receptor del complemento 3++), es eficaz contra lesiones cuando se administra antes y después del inicio de la reperfusión intestinal en murinos (Rehrig, S., et al., *J. Immunol.* 167:5921-27, 2001). En un modelo de isquemia musculoesquelética, el uso del receptor soluble del complemento 1 (sCRI) también redujo la lesión muscular cuando se administró después del inicio de la reperfusión (Kyriakides, C., et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281:C244-30, 2001). En un modelo porcino de I/R de miocardio, los animales tratados con anticuerpo monoclonal ("MoAb") a la anafilatoxina C5a antes de la reperfusión demostraron atenuación del infarto (Amsterdam, E.A., et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 268:H448-57, 1995). Las ratas tratadas con MoAb de C5 demostraron una atenuación del tamaño del infarto, infiltración de neutrófilos y apoptosis en el miocardio (Vakeva, A., et al., *Circulation* 97:2259-67, 1998). Estos resultados experimentales destacan la importancia de la activación de la patogénesis de la lesión de I/R.

No está claro qué vía del complemento (clásica, de lectinas o alternativa) está predominantemente implicada en la activación del complemento en la lesión de I/R. Weiser et al. demostraron una función importante de las vías de lectinas y/o clásica durante la I/R esquelética, demostrando que los ratones con genes inactivados de C3 o C4 estuvieron protegidos contra lesión de I/R en base a la importante reducción de la permeabilidad vascular (Weiser, M.R., et al., *J. Exp. Mecl.* 183:2343-48, 1996). En contraste, los experimentos de I/R renal con ratones con genes inactivados de C4 no demuestran una protección importante del tejido, mientras que los ratones con genes inactivados de C3, C5 y C6 estuvieron protegidos contra lesión, lo que indica que la activación del complemento durante la lesión I/R renal ocurre a través de la vía alternativa (Zhou, W., et al., *J. Clin. Invest.* 105:1363-71, 2000). Usando ratones deficientes del factor D, Stahl et al. recientemente presentaron datos de una importante función de la vía alternativa en la I/R intestinal en ratones (Stahl, G., et al., *Am. J. Pathol.* 162:449-55, 2003). En contraste, Williams et al. sugirieron una función predominante de la vía clásica para el inicio de la lesión de I/R en el intestino de ratones, demostrando una reducción de la tinción del órgano para C3 y protección de la lesión en ratones deficientes de C4 e IgM (Rag1^{-/-}) (Williams, J.P., et al., *J. Appl. Physiol.* 86:938-42, 1999).

El tratamiento de ratas en el modelo de I/R de miocardio con anticuerpos monoclonales contra lectina de unión a manano (MBL) en ratas produjo una reducción de la lesión de reperfusión post-isquémica (Jordan, J.E., et al., *Circulation* 104:1413-18, 2001). Los anticuerpos de MBL también redujeron la deposición del complemento en las células endoteliales *in vitro* después del estrés oxidativo, indicando una función para la vía de lectinas en la lesión de I/R de miocardio (Collard, C.D., et al., *Am. J. Pathol.* 156:1549-56, 2000). Existen también datos de que la lesión de I/R en algunos órganos puede estar mediada por una categoría específica de IgM, denominada anticuerpos naturales, y la activación de la vía clásica (Fleming, S.D., et al., *J. Immunol.* 169:2126-33, 2002; Reid, R.R., et al., *J. Immunol.* 169:5433-40, 2002).

Se han desarrollado varios inhibidores de la activación del complemento como agentes terapéuticos potenciales para prevenir la morbimortalidad resultante de complicaciones de I/R de miocardio. Dos de estos inhibidores, sCRI (TP10) y anti-C5 scFv humanizado (Pexelizumab), han completado ensayos clínicos de fase II. Pexelizumab ha completado además un ensayo clínico de fase III. Si bien TP 10 fue bien tolerado y beneficioso para pacientes en los ensayos
 5 iniciales de fase I/II, los resultados de un ensayo de fase II que finalizó en febrero de 2002 no pudieron alcanzar el criterio principal de valoración. No obstante, el análisis de subgrupos de datos de pacientes de sexo masculino en poblaciones de alto riesgo que se sometieron a procedimientos a corazón abierto demostraron mortalidad y tamaño del infarto significativamente reducidos. La administración de un anti-C5 scFv humanizado redujo la mortalidad general del paciente asociada con infarto de miocardio agudo en los ensayos de fase II COMA y COMPLY, pero no
 10 pudo alcanzar el criterio principal de valoración (Mahaffey, K.W., et al., *Circulation* 108:1176-83, 2003). Recientemente se dieron a conocer los resultados de un ensayo clínico anti-C5 scFv de fase III (PRIMO-CABG) para mejorar resultados inducidos quirúrgicamente después de una derivación de arteria coronaria. Si bien no se alcanzó el criterio principal de valoración para este estudio, el estudio demostró una reducción general en la morbimortalidad postoperatoria.

Dr. Walsh y colegas han demostrado que los ratones que carecen de MBL y por lo tanto carentes de la activación de la vía de lectinas dependiente de MBL pero con la vía del complemento clásica plenamente activa, están protegidos contra lesión de reperfusión cardiaca con la conservación resultante de la función cardiaca (Walsh et al., *J. Immunol.*
 15 *175:541-46*, 2005). Significativamente, los ratones que carecen de C1q, el componente de reconocimiento de la vía del complemento clásica, pero que tienen la vía del complemento de MBL intacta, no están protegidos contra la lesión. Estos resultados indican que la vía de lectinas tiene una función importante en la patogénesis de la lesión de
 20 isquemia y reperfusión del miocardio.

Se sabe que la activación del complemento cumple una función importante en la lesión del tejido asociada con isquemia y reperfusión (I/R) gastrointestinal. Usando un modelo murino de GI/R, un estudio reciente realizado por Hart y colegas describe que los ratones genéticamente deficientes de MBL están protegidos contra lesiones del
 25 intestino después de I/R gastrointestinal (Hart et al., *J. Immunol.* 774:6373-80, 2005). La adición de MBL recombinante a ratones deficientes de MBL aumentó significativamente la lesión en comparación con ratones deficientes de MBL no tratados después de la I/R gastrointestinal. En contraste, los ratones que carecen genéticamente de C1q, el componente de reconocimiento de la vía clásica, no están protegidos contra lesión del tejido después de la I/R gastrointestinal.

La I/R renal es una importante causa de insuficiencia renal aguda. El sistema del complemento parece estar esencialmente implicado en la lesión de I/R renal. En un estudio reciente, de Vries y colegas describen que la vía de lectinas se activa en el curso de lesión de I/R renal experimental, así como también en el curso clínico (de Vries et al., *Am. J. Path.* 755:1677-88, 2004). Asimismo, la vía de lectinas precede y se co-localiza con la deposición de C3, C6 y C9 del complemento en el curso de la I/R renal. Estos resultados indican que la vía de lectinas de la activación
 30 del complemento está implicada en la lesión de I/R renal.

Un aspecto de la invención se refiere al tratamiento de lesiones de isquemia y reperfusión, tratando a un sujeto que experimenta isquemia y reperfusión con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico. El agente inhibidor de MASP-2 se puede administrar al sujeto por administración intra-arterial, intravenosa, intracraneal, intramuscular, subcutánea u otra administración parenteral y potencialmente oral para inhibidores no peptidérgicos, y más adecuadamente por administración intra-arterial o intravenosa. La administración de las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente invención adecuadamente comienzan inmediatamente después o lo más pronto posible después de un evento de isquemia y reperfusión. En casos en los que la reperfusión ocurre en un entorno controlado (p. ej., después de la reparación de un aneurisma aórtico, trasplante de órgano o reimplante de extremidades o dígitos amputados o traumatizados), el agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse antes y/o durante y/o después de la reperfusión. La administración se puede repetir periódicamente según lo determinado por el médico para un efecto terapéutico óptimo.
 40
 45

Aterosclerosis

Existen datos importantes de que la activación del complemento está implicada en la aterogénesis en seres humanos. Una serie de estudios han demostrado convincentemente que, si bien no tiene lugar la activación significativa del complemento en arterias normales, el complemento se activa ampliamente en lesiones ateroscleróticas y es especialmente fuerte en placas vulnerables y rotas. Los componentes terminales de la vía del complemento frecuentemente se hallan en ateromas humanos (Niculescu, F., et al., *Mol. Immunol.* 36:949-55.10-12, 1999; Rus, H.G., et al., *Immunol. Lett.* 20:305-310, 1989; Torzewski, M., et al., *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 18:369-378, 1998). La deposición de C3 y C4 en lesiones arteriales también ha sido demostrada (Hansson, G.K., et al., *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scandl. (A)* 92:429-35, 1984). Se halló que el grado de deposición de C5b-9 se correlaciona con la gravedad de la lesión (Vlaicu, R., et al., *Atherosclerosis* 57:163-77, 1985). La deposición de iC3b del complemento, pero no C5b-9, fue especialmente fuerte en placas rotas y vulnerables, lo que sugiere que la activación del complemento puede ser un factor en síndromes coronarios agudos (Taskinen S., et al., *Biochem. J.* 367:403-12, 2002). En el ateroma experimental en conejos, se halló que la activación del complemento precede al desarrollo de lesiones (Seifer, P.S., et al., *Lab Invest.* 60:747-54, 1989).
 50
 55
 60

En lesiones ateroscleróticas, el complemento se activa mediante las vías clásica y alternativa, pero aún hay pocos datos de la activación del complemento mediante la vía de lectinas. Varios componentes de la pared arterial pueden desencadenar la activación del complemento. La vía clásica del complemento se puede activar mediante la proteína reactiva C (CRP) unida a LDL degradada enzimáticamente (Bhakdi, S., et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:2348-54, 1999). Coherente con esta visión está el hallazgo de que las proteínas del complemento terminales se co-localizan con CRP en la capa íntima de lesiones humanas incipientes (Torzewski, J., et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1386-92, 1998). Asimismo, la inmunoglobulina M o los anticuerpos de IgG específicos de LDL oxidada dentro de las lesiones pueden activar la vía clásica (Witztum, J.L., *Lancet* 344:793-95, 1994). Los lípidos aislados de lesiones ateroscleróticas humanas tienen un alto contenido de colesterol no esterificado y son capaces de activar la vía alternativa (Seifert P.S., et al., *J. Exp. Med.* 172:547-57, 1990). *Chlamydia pneumoniae*, una bacteria gramnegativa frecuentemente asociada con lesiones ateroscleróticas, puede también activar la vía alternativa del complemento (Campbell L.A., et al., *J. Infect. Dis.* 172:585-8, 1995). Otros activadores potenciales del complemento en lesiones ateroscleróticas incluyen cristales de colesterol y sedimentos celulares, que pueden activar ambos la vía alternativa (Seifert, P.S., et al., *Mol. Immunol.* 24:1303-08, 1987).

Se sabe que los productos secundarios de activación del complemento tienen muchas propiedades biológicas que podrían influir en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. La activación del complemento local puede inducir la lisis celular y generar por lo menos algunos de los sedimentos celulares hallados en el núcleo necrótico de lesiones avanzadas (Niculescu, F. et al., *Mol. Immunol.* 36:949-55.10-12, 1999). La activación subclítica del complemento podría ser un factor importante contribuyente a la proliferación celular del músculo liso y la infiltración de monocitos en la íntima arterial durante la aterogénesis (Torzewski J., et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:673-77, 1996). La activación persistente del complemento puede ser perjudicial porque puede desencadenar y sostener la inflamación. Además de la infiltración de los componentes del complemento del plasma en la sangre, las células arteriales expresan ARN mensajero para las proteínas del complemento y la expresión de diversos componentes del complemento aumenta en las lesiones ateroscleróticas (Yasojima, K., et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1214-19, 2001).

Se ha descrito una cantidad limitada de estudios sobre la influencia de las deficiencias de las proteínas del complemento sobre la aterogénesis. Los resultados en modelos animales experimentales han sido contradictorios. En la rata, la formación de lesiones de tipo ateroscleróticas inducidas por dosis tóxicas de vitamina D se redujo en animales deficientes del complemento (Geertinger P., et al., *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. (A)* 78:284-88, 1970). Asimismo, en conejos alimentados con colesterol, la inhibición del complemento por deficiencia genética de C6 (Geertinger, P., et al., *Artery* 1:177-84, 1977; Schmiedt, W., et al., *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1790-1795, 1998) o por el agente anticomplemento K-76 COONa (Saito, E., et al., *J. Drug Dev.* 3:147-54, 1990) suprimió el desarrollo de aterosclerosis sin afectar los niveles de colesterol en el suero. En contraste, un estudio reciente informó que la deficiencia de C5 no reduce el desarrollo de lesiones ateroscleróticas en ratones deficientes de apolipoproteína E (ApoE) (Patel, S., et al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 286:164-70, 2001). No obstante, en otro estudio, se evaluó el desarrollo de lesiones ateroscleróticas en ratones deficientes de LDLR (ldlr) con o sin deficiencia de C3 (Buono, C., et al., *Circulation* 105:3025-31, 2002). Se halló que la maduración de ateromas a lesiones de tipo ateroscleróticas depende en parte de la presencia de un sistema del complemento intacto.

Se describe el tratamiento o la prevención de aterosclerosis tratando a un sujeto que padece o que es propenso a padecer aterosclerosis con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico. El agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto por administración intra-arterial, intravenosa, intratecal, intracraneal, intramuscular, subcutánea u otra administración parenteral, y potencialmente por vía oral para inhibidores no peptidérgicos. La administración de la composición inhibidora de MASP-2 puede comenzar después del diagnóstico de aterosclerosis en un sujeto o profilácticamente en un sujeto con alto riesgo de presentar dicha afección. La administración se puede repetir periódicamente según lo determinado por un médico para un efecto terapéutico óptimo.

Otras enfermedades y afecciones vasculares

El endotelio está muy expuesto al sistema inmunológico y es particularmente vulnerable a las proteínas del complemento presentes en el plasma. Se ha demostrado que la lesión vascular mediada por el complemento contribuye a la patofisiología de varias enfermedades del sistema cardiovascular, incluida la aterosclerosis (Seifert, P.S., et al., *Atherosclerosis* 73:91-104, 1988), lesión de isquemia y reperfusión (Weisman, H.F., *Science* 249:146-51, 1990) e infarto de miocardio (Tada, T., et al., *Virchows Arch* 430:327-332, 1997). Los datos indican que la activación del complemento puede extenderse a otras afecciones vasculares.

Por ejemplo, hay datos de que la activación del complemento contribuye a la patogénesis de muchas formas de vasculitis, incluyendo: nefritis por púrpura de Henoch-Schonlein, vasculitis asociada a lupus eritematoso sistémico, vasculitis asociada a artritis reumatoidea (también llamada artritis reumatoidea maligna), vasculitis del complejo inmune y enfermedad de Takayasu. La nefritis por púrpura de Henoch-Schonlein es una forma de vasculitis sistémica de los vasos pequeños con patogénesis inmune, en donde la activación del complemento a través de la vía de lectinas que produce daño endotelial inducido por C5b-9 es reconocida como un mecanismo importante (Kawana, S., et al., *Arch. Dermatol. Res.* 282:183-7, 1990; Endo, M., et al., *Am J. Kidney Dis.* 35:401-7, 2000). El lupus eritematoso sistémico (SLE) es un ejemplo de enfermedades autoinmunes que afecta múltiples órganos,

incluida la piel, los riñones, articulaciones, superficies serosas y el sistema nervioso central, y frecuentemente se asocia con vasculitis severa. Los anticuerpos anti-endoteliales IgG y los complejos de IgG capaces de unirse a las células endoteliales están presentes en los sueros de pacientes con SLE activo, y los depósitos de complejos inmunes de IgG y complemento se hallan en las paredes de los vasos sanguíneos de pacientes con vasculitis por SLE (Cines, D.B., et al., *J. Clin. Invest.* 73:611-25, 1984). La artritis reumatoidea asociada con vasculitis, también llamada artritis reumatoidea maligna (Tomooka, K., *Fukuoka Igaku Zasshi* 80:456-66, 1989), vasculitis del complejo inmune, vasculitis asociada con hepatitis A, vasculitis leucocitoclástica y la artritis conocida como enfermedad de Takayasu, forman otro grupo pleomórfico de enfermedades humanas en las que la citotoxicidad dependiente del complemento contra células endoteliales y de otros tipos cumple una función documentada (Tripathy, N.K., et al., *J. Rheumatol.* 28:805-8, 2001).

Las pruebas también indican que la activación del complemento cumple una función en la cardiomiopatía dilatada. La cardiomiopatía dilatada es un síndrome caracterizado por agrandamiento cardíaco y función sistólica deteriorada del corazón. Datos recientes indican que la inflamación constante del miocardio puede contribuir al desarrollo de la enfermedad. Se sabe que C5b-9, el complejo de ataque a la membrana terminal del complemento, se correlaciona en gran medida con la deposición de inmunoglobulina y la expresión de TNF-alfa en el miocardio. En biopsias de miocardio de 28 pacientes con cardiomiopatía dilatada, se demostró la acumulación de C5b-9 en el miocardio, indicando que la activación crónica del complemento mediada por inmunoglobulina en el miocardio puede contribuir, en parte, a la progresión de la cardiomiopatía dilatada (Zwaka, T.P., et al., *Am. J. Pathol.* 161(2):449-57, 2002).

Se describe el tratamiento de una afección vascular, incluidas afecciones cardiovasculares, afecciones cerebrovasculares, afecciones vasculares periféricas (p. ej., musculoesquelética), afecciones renovasculares y afecciones vasculares mesentéricas/entéricas, administrando una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico. Dichas afecciones para las cuales se cree que la invención es adecuada incluyen, aunque sin limitarse a ello: vasculitis, incluida nefritis por púrpura de Henoch-Schonlein, vasculitis asociada a lupus eritematoso sistémico, vasculitis asociada a artritis reumatoidea (también llamada artritis reumatoidea maligna), vasculitis del complejo inmune y enfermedad de Takayasu; cardiomiopatía dilatada, angiopatía diabética; enfermedad de Kawasaki (arteritis); y embolia gaseosa venosa (VGE). Además, dado que la activación del complemento ocurre como consecuencia de traumatismo luminal y de respuesta inflamatoria a cuerpo extraño asociada con procedimientos de intervención cardiovascular, se cree que las composiciones inhibitoras de MASP-2 de la presente invención pueden también utilizarse en la inhibición de restenosis que le sigue a la colocación de un stent, aterectomía rotacional y/o angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA), o bien solas o combinadas con otros agentes inhibidores de restenosis tales como aquellos descritos en la patente de EE. UU. núm. 6.492.332 para Demopulos.

El agente inhibidor de MASP-2 se puede administrar al sujeto por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, intratecal, intracraneal, subcutánea u otra administración, potencialmente por vía oral para inhibidores no peptidérgicos. La administración se puede repetir periódicamente según lo determinado por el médico para un efecto terapéutico óptimo. Para la inhibición de restenosis, la composición inhibitora de MASP-2 se puede administrar antes y/o durante y/o después de la colocación de un o del procedimiento de aterectomía o angioplastia. Alternativamente, la composición inhibitora de MASP-2 puede revestirse o incorporarse al stent.

Trastornos gastrointestinales

La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son trastornos inflamatorios crónicos del intestino que recaen bajo el estandarte de enfermedad inflamatoria de los intestinos (IBD). La IBD se caracteriza por una inflamación que ocurre espontáneamente, crónica, con recaídas y de origen desconocido. A pesar de la amplia investigación sobre la enfermedad tanto en seres humanos como en animales experimentales, los mecanismos precisos de la patología aún no han sido esclarecidos. Sin embargo, se cree que el sistema del complemento se activa en pacientes con IBD y se cree que cumple una función en la patogénesis de la enfermedad (Kolios, G., et al., *Hepato-Gastroenterology* 45:1601-9, 1998; Elmgreen, J., *Dan. Med. Bull.* 33:222, 1986).

Se ha demostrado que C3b y otros productos del complemento activados se encuentran en la cara luminal de las células epiteliales superficiales, así como también en los vasos sanguíneos de la muscularis mucosa y de la submucosa en pacientes con IBD (Halstensen, T.S., et al., *Immunol. Res.* 10:485-92, 1991; Halstensen, T.S., et al., *Gastroenterology* 98:1264, 1990). Asimismo, la infiltración de células polimorfonucleares, usualmente como consecuencia de la generación de C5a, se observa característicamente en el intestino inflamatorio (Kohl, J., *Mol. Immunol.* 38:175, 2001). En un pequeño estudio clínico, también se ha descrito que el inhibidor del complemento multifuncional K-76 produce una mejoría de los síntomas de la colitis ulcerosa (Kitano, A., et al., *Dis. Colon Rectum* 35:560, 1992), así como también en un modelo de colitis inducida por carragenina en conejos (Kitano, A., et al., *Clin. Exp. Immunol.* 94:348-53, 1993).

Se ha demostrado que un nuevo antagonista del receptor de C5a humano protege contra la patología de la enfermedad en un modelo de rata de IBD (Woodruff, T.M., et al., *J. Immunol.* 171:5514-20, 2003). Se usaron ratones que eran genéticamente deficientes del factor de aceleración de decaimiento (DAF), una proteína que regula el complemento de la membrana, en un modelo de IBD, para demostrar que la deficiencia de DAF resultó en un daño de tejido marcadamente mayor y en un aumento de la protección de las citocinas proinflamatorias (Lin, F., et al., *J.*

Immunol. 172:3836-41, 2004). Por lo tanto, el control del complemento es importante en la regulación de la homeostasis del intestino y puede ser un mecanismo patogénico importante implicado en el desarrollo de la IBD.

Se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en sujeto que padece trastornos gastrointestinales inflamatorios, lo que incluye, aunque sin limitarse a ello, pancreatitis, diverticulitis y trastornos del intestino que incluyen enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable, administrando una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un paciente que padece dicho trastorno. El agente inhibidor de MASP-2 se puede administrar al sujeto por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratecal, intracraneal u otra administración parenteral, y potencialmente por administración oral para inhibidores no peptidérgicos. La administración se puede repetir adecuadamente en forma periódica según lo determinado por un médico para controlar los síntomas del trastorno que se esté tratando.

Afecciones pulmonares

Se ha implicado al complemento en la patogénesis de muchos trastornos inflamatorios pulmonares, incluido el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) (Ware, I., et al., *N. Engl. J. Med.* 342:1334-49, 2000); la lesión pulmonar aguda relacionada con transfusiones (TRALI) (Seeger, W., et al., *Blood* 76:1438-44, 1990); lesión pulmonar aguda de isquemia/reperfusión (Xiao, F., et al., *J. Appl. Physiol.* 82:1459-65, 1997); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Marc, M.M., et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (publicación electrónica antes de la publicación impresa), 23 de marzo de 2004); asma (Krug, N., et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164:1841-43, 2001); granulomatosis de Wegener (Kalluri, R., et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 8:1795-800, 1997); y enfermedad de la membrana basal antiglomerular (enfermedad de Goodpasture) (Kondo, C., et al., *Clin. Exp. Immunol.* 124:323-9, 2001).

Se acepta ahora que gran parte de la patofisiología del ARDS implica una cascada inflamatoria desregulada que comienza como una respuesta normal a una infección u otro evento incitante, pero que en última instancia causa la autolesión al hospedante (Stanley, T.P., *Emerging Therapeutic Targets* 2:1-16, 1998). Los pacientes con ARDS casi universalmente demuestran evidencias de amplia activación del complemento (aumento de los niveles en plasma de los componentes del complemento C3a y C5a), y el grado de activación del complemento se ha correlacionado con el desarrollo y el desenlace del ARDS (Hammerschmidt, D.F., et al., *Lancet* 1:947-49, 1980; Solomkin, J.S., et al., *J. Surgery* 97:668-78, 1985).

Varios datos experimentales y clínicos sugieren una función de la activación del complemento en la patofisiología del ARDS. En modelos animales, la activación sistémica del complemento produce una lesión pulmonar aguda con histopatología similar a aquella vista en ARDS humano (Till, G.O., et al., *Am. J. Pathol.* 129:44-53, 1987; Ward, P.A., *Am. J. Pathol.* 149:1081-86, 1996). Inhibir la cascada del complemento por reducción del complemento general o por inhibición específica de C5a confiere protección en modelos animales de lesión pulmonar aguda (Mulligan, M.S., et al., *J. Clin. Invest.* 98:503-512, 1996). En modelos de rata, sCRI tiene un efecto protector en la lesión pulmonar mediada por el complemento y los neutrófilos (Mulligan, M.S., Yeh, et al., *J. Immunol.* 148:1479-85, 1992). Además, prácticamente todos los componentes del complemento pueden ser producidos en el pulmón por las células alveolares de tipo II, macrófagos alveolares y fibroblastos pulmonares (Hetland, G., et al., *Scand. J. Immunol.* 24:603-8, 1986; Rothman, B.I., et al., *J. Immunol.* 145:592-98, 1990). Por lo tanto, la cascada del complemento está bien posicionada para contribuir significativamente con la inflamación pulmonar y, en consecuencia, con la lesión pulmonar en el ARDS.

El asma es, en esencia, una enfermedad inflamatoria. Las características cardinales del asma alérgica incluyen hipersensibilidad de las vías respiratorias a una diversidad de estímulos específicos y no específicos, producción mucosa excesiva de las vías respiratorias, eosinofilia pulmonar y concentración elevada de IgE en suero. Si bien el asma es de origen multifactorial, está en general aceptado que surge como consecuencia de respuestas inmunológicas inadecuadas a antígenos ambientales comunes en individuos genéticamente susceptibles. El hecho de que el sistema del complemento está altamente activado en el pulmón asmático humano está bien documentado (Humbles, A.A., et al., *Nature* 406:998-01, 2002; van de Graf, E.A., et al., *J. Immunol. Methods* 147:241-50, 1992). Asimismo, datos recientes de modelos animales y de seres humanos aportan datos de que la activación del complemento es un mecanismo importante que contribuye a la patogénesis de la enfermedad (Karp, C.L., et al., *Nat. Immunol.* 1:221-26, 2000; Bautsch, W., et al., *J. Immunol.* 165:5401-5, 2000; Drouin, S.M., et al., *J. Immunol.* 169:5926-33, 2002; Walters, D.M., et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27:413-18, 2002). Una función de la vía de lectinas está respaldada por estudios que usan un modelo murino de asma fúngico crónico. Los ratones con una deficiencia genética en lectina de unión a manano desarrollan una hipersensibilidad de las vías respiratorias alterada en comparación con animales normales en este modelo de asma (Hogaboam, C.M., et al., *J. Leukoc. Biol.* 75:805-14, 2004).

El complemento puede activarse en el asma a través de muchas vías, incluidas: (a) activación a través de la vía clásica como consecuencia de la formación del complejo alérgeno-anticuerpo; (b) activación a través de la vía alternativa en las superficies de los alérgenos (c) activación de la vía de lectinas a través de la participación de estructuras de carbohidratos en los alérgenos; y (d) escisión de C3 y C5 por proteasas liberadas de las células inflamatorias. Si bien todavía queda mucho por aprender acerca de la función compleja del complemento en el

asma, la identificación de las vías de activación del complemento implicadas en el desarrollo de asma alérgica pueden proveer un foco de desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para esta enfermedad cada vez más importante.

5 Una serie de estudios que usaron modelos animales han demostrado una función crítica de C3 y su producto de escisión, C3a, en el desarrollo del fenotipo alérgico. Drouin y colegas utilizaron ratones deficientes de C3 en el modelo de asma de ovalbúmina (OVA)/*Aspergillus fumigatus* (Drouin et al., *J. Immunol.* 167:4141-45, 2001). Hallaron que, cuando se exponen a alérgenos, los ratones deficientes de C3 exhiben reducción sorprendente de la hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR) y eosinofilia pulmonar en comparación con ratones control de tipo salvaje. Asimismo, estos ratones deficientes de C3 tuvieron números considerablemente reducidos de células productoras de IL-4 y respuestas atenuadas de IgG1 e IgE específica de Ag. Taube y colegas obtuvieron resultados similares en el modelo OVA de asma al bloquear la activación del complemento a nivel de C3 y C4 usando una forma soluble recombinante del receptor del complemento de ratón Crry (Taube et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168:1333-41, 2003). Humbles y colegas eliminaron el C3aR en ratones para examinar la función de C3a en la función de los eosinófilos (Humbles et al., *Nature* 406:998-1001, 2000). Usando el modelo OVA de asma, observaron una protección prácticamente completa del desarrollo de AHR con metacolina en aerosol. Drouin y colegas (2002) utilizaron ratones deficientes de C3aR en el modelo de asma OVA / *A. fumigatus* y demostraron una respuesta alérgica atenuada muy similar a aquella de la de los animales deficientes de C3 con disminución de la AHR, agrupamiento de eosinófilos, producción de citocinas TH2 y secreción mucosa en el pulmón, así como también respuestas reducidas de IgE e IgG1 específicas de Ag (Drouin et al., *J. Immunol.* 169:5926-33, 2002). Bautsch y colegas realizaron investigaciones usando una cepa de cobayas que carecen naturalmente de C3aR (Bautsch et al., *J. Immunol.* 7(55:5401-05, 2000). Usando un modelo OVA de asma alérgica, observaron una importante protección de la broncoconstricción de las vías respiratorias después de la exposición a antígenos.

25 Una serie de estudios recientes que usaron modelos animales demostraron una función crítica de C5 y su producto de escisión C5a, en el desarrollo del fenotipo alérgico. Abe y colegas aportaron datos que vinculan la activación de C5aR con la inflamación de las vías respiratorias, la producción de citocinas y la hipersensibilidad de las vías respiratorias (Abe et al., *J. Immunol.* 7(57:4651-60, 2001). En sus estudios, la inhibición de la activación del complemento por CR1 soluble, futhan (un inhibidor de la activación del complemento) o el antagonista del hexapéptido sintético C5a bloqueó la respuesta inflamatoria y la hipersensibilidad de las vías respiratorias a metacolina. En estudios que usan anticuerpo monoclonal de bloqueo anti-C5, Peng y colegas descubrieron que la activación de C5 contribuyó sustancialmente a la inflamación de las vías respiratorias y a la AHR en el modelo OVA de asma (Peng et al., *J. Clin. Invest.* 775:1590-1600, 2005). Además, Baelder y colegas informaron que el bloqueo de C5aR redujo sustancialmente la AHR en el modelo *A. fumigatus* de asma (Baelder et al., *J. Immunol.* 774:783-89, 2005). Asimismo, el bloqueo de C3aR y C5aR redujo significativamente la inflamación de las vías respiratorias según lo demostrado por la reducción del número de neutrófilos y eosinófilos en BAL.

35 Si bien los estudios previamente mencionados destacan la importancia de los factores del complemento C3 y C5 y sus productos de escisión en la patogénesis del asma alérgica experimental, estos estudios no proveen información sobre la contribución de cada una de las tres vías de activación del complemento, dado que C3 y C5 son comunes a las tres vías de activación. No obstante, un estudio reciente de Hogaboam y colegas indica que la vía de lectinas puede cumplir una función importante en la patogénesis del asma (Hogaboam et al., *J. Leukocyte Biol.* 75:805-814, 2004). Estos estudios utilizaron ratones genéticamente deficientes de lectina de unión a manano A (MBL-A), una proteína de unión a carbohidratos que funciona como el componente de reconocimiento para la activación de la vía del complemento de lectinas. En un modelo de asma fúngica crónica, ratones MBL-A(+/+) y MBL-A(-/-) sensibilizados con *A. fumigatus* fueron examinados 4 y 28 días después de una exposición *i.t.* a *A. fumigatus* conidia. La AHR en ratones MBL-A(-/-) sensibilizados estuvo significativamente atenuada en ambos momentos después de la exposición a conidia en comparación con el grupo de MBL-A (+/+) sensibilizados. Descubrieron que los niveles de citocinas TH2 (IL-4, IL-5 e IL-13) en el pulmón fueron significativamente inferiores en ratones MBL-A(-/-) sensibilizados con *A. fumigatus* en comparación con el grupo salvaje en el día 4 después de conidia. Sus resultados indican que la vía de lectinas y MBL-A tienen una función importante en el desarrollo y el mantenimiento de AHR durante el asma fúngica crónica.

50 Resultados de un estudio clínico reciente de asociación entre un polimorfismo de MBL específico y el desarrollo del asma proporciona más datos de que la vía de lectinas puede cumplir una función patológica importante en esta enfermedad (Kaur et al., *Clin. Experimental Immunol.* 743:414-19, 2006). Las concentraciones en el plasma de MBL varían ampliamente entre un individuo y otro, y esto se atribuye principalmente a los polimorfismos genéticos dentro del gen MBL. Hallaron que los individuos que portan por lo menos una copia del polimorfismo de MBL específico que aumenta la expresión de MBL de dos a cuatro veces tienen un riesgo casi cinco veces mayor de desarrollar asma bronquial. Hubo también un aumento de la intensidad de los marcadores de la enfermedad en pacientes con asma bronquial que portan este polimorfismo de MBL.

60 Se describe un método para tratar trastornos pulmonares, administrando una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que sufre trastornos pulmonares, incluidos, aunque sin limitarse a ello, síndrome de dificultad respiratoria aguda, lesión pulmonar aguda relacionada con una transfusión, lesión pulmonar aguda por isquemia/reperfusión, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, granulomatosis de Wegener, enfermedad de la membrana basal antiglomerular

(enfermedad de Goodpasture), síndrome de aspiración de meconio, síndrome de bronquiolitis obliterante, fibrosis pulmonar idiopática, lesión pulmonar aguda secundaria a quemaduras, edema pulmonar no cardiogénico, depresión respiratoria relacionada con una transfusión y enfisema. El agente inhibidor de MASP-2 se puede administrar al sujeto en forma sistémica, tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, por inhalación, nasal, subcutánea u otra administración parenteral o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La composición del agente inhibidor de MASP-2 se puede combinar con uno o más agentes terapéuticos adicionales, incluidos agentes antiinflamatorios, antihistamínicos, corticosteroides o antimicrobianos. La administración se puede repetir según lo determinado por un médico hasta que el cuadro se haya resuelto.

Circulación extracorpórea

Existen numerosos procedimientos médicos durante los cuales la sangre del sistema circulatorio de un paciente es desviada (sistemas de circulación extracorpórea o ECC). Dichos procedimientos incluyen hemodiálisis, plasmaféresis, leucoféresis, oxigenador por membrana extracorpórea (ECMO), precipitación de LDL por oxigenación de membrana extracorpórea inducida por heparina (HELP) y derivación cardiopulmonar (CPB). Estos procedimientos exponen la sangre o los hemoderivados a superficies extrañas que pueden alterar la función celular normal y la hemostasis. En estudios pioneros, Craddock et al. identificaron la activación del complemento como la causa probable de granulocitopenia durante la hemodiálisis (Craddock, P.R., et al., *N. Engl. J. Med.* 296:769-74, 1977). Los resultados de numerosos estudios entre 1977 y el presente indican que muchos de los efectos adversos experimentados por los pacientes que se someten a hemodiálisis o CPB son causados por la activación del sistema del complemento (Chenoweth, D.E., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 516:306-313, 1987; Hugli, T.E., *Complement* 3:111-127, 1986; Cheung, A.K., *J. Am. Soc. Nephrol.* 1:150-161, 1990; Johnson, R.J., *Nephrol. Dial. Transplant* 9:36-45 1994). Por ejemplo, se ha demostrado que el potencial de activación del complemento es un importante criterio en la determinación de la biocompatibilidad de los hemodializadores con respecto a la recuperación de la función renal, susceptibilidad a infecciones, disfunción pulmonar, tasa de morbilidad y supervivencia de pacientes con insuficiencia renal (Hakim, R.M., *Kidney Int.* 44:484-494, 1993).

Se ha creído en gran medida que la activación del complemento por las membranas de hemodiálisis ocurre mediante mecanismos de la vía alternativa debido a la generación débil de C4a (Kirklin, J.K., et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 86:845-57, 1983; Vallhonrat, H., et al., *ASAIO J.* 45:113-4, 1999), pero el trabajo reciente sugiere que puede estar también implicada la vía clásica (Wachtfogel, Y.T., et al., *Blood* 73:468-471, 1989). No obstante, todavía no se comprenden del todo los factores que inician y controlan la activación del complemento en superficies artificiales que incluyen polímeros biomédicos. Por ejemplo, la membrana Cuprofan utilizada en hemodiálisis se ha clasificado como un activador del complemento muy potente. Sin desear estar limitados por la teoría, los inventores teorizan que esto tal vez podría explicarse en parte por su naturaleza de polisacárido. El sistema de activación del complemento dependiente de MASP-2 identificado en esta patente proporciona un mecanismo mediante el cual la activación de la vía de lectinas desencadena la activación de la vía alternativa.

Los pacientes que se someten a ECC durante CPB sufren una reacción inflamatoria sistémica, que es en parte causada por la exposición de la sangre a las superficies artificiales del circuito extracorpóreo, pero además por factores independientes de la superficie como traumatismo quirúrgico y lesión de isquemia y reperfusión (Butler, J., et al., *Ann. Thorac. Surg.* 55:552-9, 1993; Edmunds, L.H., *Ann. Thorac. Surg.* 66(Supl):S12-6, 1998; Asimakopoulos, G., *Perfusion* 14:269-77, 1999). La reacción inflamatoria desencadenada por CPB puede resultar en complicaciones post-quirúrgicas, en general denominadas "síndrome post-reperfusión". Entre estos eventos postoperatorios se encuentran los déficits cognitivos (Fitch, J., et al., *Circulation* 100(25):2499-2506, 1999), insuficiencia respiratoria, trastornos de la sangre, disfunción renal y, en los casos más severos, insuficiencia multiorgánica (Wan, S., et al., *Chest* 112:676-692, 1997). La cirugía de derivación coronaria con CPB conduce a la activación profunda del complemento, en contraste con la cirugía sin CPB pero con un grado comparable de traumatismo quirúrgico (E. Fosse, 1987). Por lo tanto, la causa principal sospechada de estos problemas relacionados con CPB es la activación inadecuada del complemento durante el procedimiento de derivación (Chenoweth, K., et al., *N. Engl. J. Med.* 304:497-503, 1981; P. Haslam, et al., *Anaesthesia* 25:22-26, 1980; J.K. Kirklin, et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 86:845-857, 1983; Moore, F.D., et al., *Ann. Surg* 208:95-103, 1988; J. Steinberg, et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* 106:1901-1918, 1993). En circuitos de CPB, la vía del complemento alternativa cumple una función predominante en la activación del complemento, que resulta de la interacción de la sangre con las superficies artificiales de los circuitos de CPB (Kirklin, J.K., et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 86:845-57, 1983; Kirklin, J.K., et al., *Ann. Thorac. Surg.* 41:193-199, 1986; Vallhonrat H., et al., *ASAIO J.* 45:113-4, 1999). No obstante, hay datos que indican que la vía del complemento clásica se activa durante la CPB (Wachtfogel, Y.T., et al., *Blood* 73:468-471, 1989).

Las sustancias inflamatorias primarias se generan después de la activación del sistema del complemento, incluidas las anafilatoxinas C3a y C5a, la opsonina C3b y el complejo de ataque a la membrana C5b-9. C3a y C5a son potentes estimulantes de neutrófilos, monocitos y plaquetas (Haeffner-Cavaillon, N., et al., *J. Immunol.* 139:794-9, 1987; Fletcher, M.P., et al., *Am. J. Physiol.* 265:H1750-61, 1993; Rinder, C.S., et al., *J. Clin. Invest.* 96:1564-72, 1995; Rinder, C.S., et al., *Circulation* 100:553-8, 1999). La activación de estas células resulta en la liberación de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF alfa), radicales libres oxidativos y proteasas (Schindler, R., et al., *Blood* 76:1631-8, 1990; Cruickshank, A.M., et al., *Clin. Sci. (Lond)* 79:161-5, 1990; Kawamura, T., et al., *Can. J. Anaesth.* 40:1016-21, 1993; Steinberg, J.B., et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 106:1008-1, 1993; Finn, A., et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 105:234-41, 1993; Ashraf, S.S., et al., *J. Cardiothorac. Vase. Anesth.* 11:718-22, 1997).

Se ha demostrado que C5a aumenta las moléculas de adhesión CD 11b y CD 18 de Mac-1 en células polimorfonucleares (PMN) y que induce la desgranulación de las PMN para liberar enzimas proinflamatorias. Rinder, C., et al., *Cardiovasc Pharmacol.* 27(Supl 1):S6-12, 1996; Evangelista, V., et al., *Blood* 93:876-85, 1999; Kinkade, J.M., Jr., et al., *Biochem, Biophys. Res. Commun.* 114:296-303, 1983; Lamb, N.J., et al., *Crit. Care Med.* 27:1738-44, 1999; Fujie, K., et al., *Eur. J. Pharmacol.* 374:117-25, 1999. C5b-9 induce la expresión de la molécula de adhesión P-selectina (CD62P) en las plaquetas (Rinder, C.S., et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 118:460-6, 1999), mientras que C5a y C5b-9 inducen expresión superficial de P-selectina en las células endoteliales (Foreman, K.E., et al., *J. Clin. Invest.* 94:1147-55, 1994). Estas moléculas de adhesión están implicadas en la interacción entre los leucocitos, las plaquetas y las células endoteliales. La expresión de las moléculas de adhesión en las células endoteliales activadas es responsable de la secuestro de leucocitos activados, que luego median la inflamación y la lesión del tejido (Evangelista, V., *Blood* 1999; Foreman, K.E., *J. Clin. Invest.* 1994; Lentsch, A.B., et al., *J. Pathol.* 190:343-8, 2000). Son estas acciones de estos productos de activación del complemento sobre los neutrófilos, monocitos, plaquetas y otras células circulatorias lo que probablemente conduce a los distintos problemas que surgen después de la CPB.

Varios inhibidores del complemento están siendo estudiados para aplicaciones potenciales en CPB. Incluyen un receptor del complemento soluble recombinante 1 (sCRI) (Chai, P.J., et al., *Circulation* 101:541-6, 2000), un anticuerpo anti-C5 monocatenario humanizado (h5GI.I-scFv o Pexelizumab) (Fitch, J.C.K., et al., *Circulation* 100:3499-506, 1999), un híbrido de fusión recombinante (CAB-2) de la proteína del cofactor de membrana humana y factor acelerador de decaimiento humano (Rinder, C.S., et al., *Circulation* 100:553-8, 1999), un péptido cíclico de unión a C3 del residuo 13 (Compstatina) (Nilsson, B., et al., *Blood* 92:1661-7, 1998) y un anti-factor D MoAb (Fung, M., et al., *J. Thoracic Cardiovasc. Surg.* 122:113-22, 2001). SCRI y CAB-2 inhiben las vías del complemento clásica y alternativa en las etapas de activación de C3 y C5. La compstatina inhibe las vías del complemento en la etapa de activación de C3, mientras que h5GI.I-scFv lo hace solamente en la etapa de activación de C5. El anti-factor D MoAb inhibe su vía alternativa en las etapas de activación de C3 y C5. Sin embargo, ninguno de estos inhibidores del complemento inhibiría específicamente el sistema de activación del complemento dependiente de MASP-2 identificado en esta patente.

Se describieron los resultados de un gran estudio clínico de fase 3 para investigar la eficacia y la seguridad del anticuerpo anti-C5 monocatenario humanizado (h5GI.I-scFv, pexelizumab) en la reducción del MI y la mortalidad perioperatoria en la cirugía de injerto de derivación de la arteria coronaria (CABG) (Venier, E.D., et al., *JAMA* 291:2319-27, 2004). En comparación con el placebo, pexelizumab no se asoció con una reducción significativa en el riesgo del criterio compuesto de valoración de muerte o MI en 2746 pacientes que se habían sometido a cirugía CABG. No obstante, hubo una reducción estadísticamente significativa 30 días después del procedimiento entre los 3099 pacientes que se sometieron a cirugía CABG con o sin cirugía valvular. Ya que pexelizumab se inhibe en la etapa de activación de C5, inhibe la generación de C5a y sC5b-9 pero no tiene ningún efecto sobre la generación de las otras dos sustancias inflamatorias del complemento, C3a y C3b opsónicos, que se sabe que también contribuyen a la reacción de inflamación desencadenada por la CPB.

Se describe la prevención o el tratamiento de reacción inflamatoria desencadenada por exposición extracorpórea, tratando a un sujeto que se somete a un procedimiento de circulación extracorpórea con una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico, incluidos pacientes que se someten a hemodiálisis, plasmaféresis, leucoféresis, oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO), precipitación de LDL por oxigenación de membrana extracorpórea inducida por heparina (HELP) y derivación cardiopulmonar (CPB). Se cree que el tratamiento con el agente inhibidor de MASP-2 de acuerdo con los métodos de la presente invención es útil para reducir o prevenir la disfunción cognitiva que a veces resulta de los procedimientos de CPB. El agente inhibidor de MASP-2 se puede administrar al sujeto antes del procedimiento y/o intra-procedimiento y/o post-procedimiento, tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, subcutánea u otra administración parenteral. Alternativamente, el agente inhibidor de MASP-2 se puede introducir al torrente circulatorio del sujeto durante la circulación extracorpórea, tal como inyectando el agente inhibidor de MASP-2 en un tubo o en una membrana a través de los cuales circula la sangre, o poniendo en contacto la sangre con una superficie que ha sido recubierta con el agente inhibidor MASP-2 tal como una pared interior del tubo, membrana u otra superficie tal como un dispositivo de CPB.

Artritis inflamatoria y no inflamatoria y otras enfermedades musculoesqueléticas

Se ha implicado a la activación del sistema del complemento en la patogénesis de una amplia diversidad de enfermedades reumatológicas, incluidas artritis reumatoidea (Linton, S.M., et al., *Molec. Immunol.* 36:905-14, 1999), artritis reumatoidea juvenil (Mollnes, T.E., et al., *Arthritis Rheum.* 29:1359-64, 1986), artrosis (Kemp, P.A., et al., *J. Clin. Lab. Immunol.* 37:147-62, 1992), lupus eritematoso sistémico (SLE) (Molina, H., *Current Opinion in Rheumatol.* 14:492-497, 2002), síndrome de Behcet (Rumfeld, W.R., et al., *Br. J. Rheumatol.* 25:266-70, 1986) y síndrome de Sjogren (Sanders, M.E., et al., *J. Immunol.* 138:2095-9, 1987). Existen datos convincentes de que la activación del complemento desencadenada por el complejo inmune es un mecanismo patológico importante que contribuye al daño del tejido en la artritis reumatoidea (RA). Varias publicaciones documentan que los productos de activación del complemento están elevados en el plasma de pacientes con RA (Morgan, B.P., et al., *Clin. Exp. Immunol.* 73:473-478, 1988; Auda, G., et al., *Rheumatol. Int.* 10:185-189, 1990; Rumfeld, W.R., et al., *Br. J. Rheumatol.* 25:266-270, 1986). Los productos de activación del complemento tales como C3a, C5a y sC5b-9 también se han hallado dentro de articulaciones reumáticas inflamadas y se han establecido relaciones positivas entre el grado de activación del

complemento y la gravedad de la RA (Makinde, V.A., et al., *Ann. Rheum. Dis.* 48:302-306, 1989; Brodeur, J.P., et al., *Arthritis Rheumatism* 34:1531-1537, 1991). Tanto en la artritis reumatoidea adulta como juvenil los niveles elevados de suero y líquido sinovial del producto de activación del complemento de la vía alternativa Bb comparado con C4d (un marcador para la activación de la vía clásica), indican que la activación del complemento es mediada predominantemente por la vía alternativa (El-Ghobarey, A.F. et al., *J. Rheumatology* 7:453-460, 1980; Agarwal, A., et al., *Rheumatology* 39:189-192, 2000). Los productos de activación del complemento pueden dañar directamente el tejido (vía C5b-9) o mediar indirectamente a través de la captación de células inflamatorias por las anafilatoxinas C3a y C5a.

Los modelos animales de artritis experimental se han utilizado ampliamente para investigar la función del complemento en la patogénesis de la RA. La eliminación del complemento con el factor de veneno de cobra en modelos animales de RA previene el inicio de la artritis (Morgan, K., et al., *Arthritis Rheumat.* 24:1356-1362, 1981; Van Lent, P.L., et al., *Am. J. Pathol.* 140:1451-1461, 1992). La inyección intra-articular de la forma soluble del receptor del complemento 1 (sCRI), un inhibidor del complemento, suprimió la inflamación en un modelo de rata de RA (Goodfellow, R.M., et al., *Clin. Exp. Immunol.* 110:45-52, 1997). Asimismo, sCRI inhibe el desarrollo y la progresión de artritis inducida por colágeno en la rata (Goodfellow, R.M., et al., *Clin Exp. Immunol.* 119:210-216, 2000). CR1 soluble inhibe las vías del complemento clásica y alternativa en las etapas de activación de C3 y C5 tanto en la vía alternativa como en la vía clásica, inhibiendo así la generación de C3a, C5a y sC5b-9.

A fines de los setenta, se reconoció que la inmunización de roedores con colágeno heterólogo de tipo II (CII; el componente de colágeno principal del cartílago articular humano) produjo el desarrollo de una artritis autoinmune (artritis inducida por colágeno, o CIA) con similitudes importantes con la RA humana (Courtenay, J.S., et al., *Nature* 283:666-68 (1980), Banda et al., *J. of Immunol.* 171:2109-2115 (2003)). La respuesta autoinmune en animales susceptibles implica una combinación compleja de factores que incluyen moléculas específicas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), citocinas y respuestas de células B y T específicas de CH (revisado por Myers, L.K., et al., *Life Sciences* (57):1861-78, 1997). La observación de que casi el 40% de las cepas de ratones de endogamia tienen una deficiencia completa en el componente del complemento C5 (Cinader, B., et al., *J. Exp. Med.* 720:897-902, 1964) ha proporcionado una oportunidad indirecta de explorar la función del complemento en este modelo artrítico, comparando CIA entre cepas deficientes y suficientes de C5. Los resultados de dichos estudios indican que la suficiencia de C5 es un requerimiento absoluto para el desarrollo de CIA (Watson et al., 1987; Wang, Y., et al., *J. Immunol.* 7(54):4340-4347, 2000). Otras pruebas de la importancia de C5 y del complemento en RA han sido proporcionadas por el uso de anticuerpos monoclonales anti-C5 (MoAb). La administración profiláctica intraperitoneal de anti-C5 MoAb en un modelo murino de CIA previno casi por completo el inicio de la enfermedad, mientras que el tratamiento durante la artritis activa resultó en un beneficio clínico significativo y en enfermedad histológica más leve (Wang, Y., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU* 92:8955-59, 1995).

Perspectivas adicionales acerca de la función potencial de la activación del complemento en la patogénesis de la enfermedad han sido provistas por estudios que usan ratones transgénicos receptores de células T, K/BxN, un modelo de artritis inflamatoria recientemente desarrollado (Korganow, A.S., et al., *Immunity* 70:451-461, 1999). Todos los animales K/BxN desarrollaron espontáneamente una enfermedad autoinmune con la mayoría (aunque no todas) de las características clínicas, histológicas e inmunológicas de la RA en seres humanos. Asimismo, la transferencia de suero de ratones K/BxN artríticos a animales sanos provoca artritis al cabo de días mediante la transferencia de inmunoglobulinas artritogénicas. Para identificar las etapas específicas de activación del complemento requeridas para el desarrollo de la enfermedad, el suero de los ratones K/BxN artríticos se transfirió a diversos ratones genéticamente deficientes de un producto de la vía del complemento particular (Ji, H., et al., *Immunity* 7(5):157-68, 2002). Cabe destacar que los resultados del estudio demostraron que la activación de la vía alternativa es crucial, mientras que la activación de la vía clásica es prescindible. Además, la generación de C5a es crítica, ya que tanto los ratones deficientes de C5 como los ratones deficientes de C5aR estuvieron protegidos del desarrollo de la enfermedad. De conformidad con estos resultados, un estudio previo indicó que la ablación genética de la expresión del receptor de C5a protege a los ratones contra la artritis (Grant, E.P., et al., *J. Exp. Med.* 796:1461-1471, 2002).

Un anti-C5 MoAb humanizado (5G1.1) que previene la escisión del componente del complemento humano C5 en sus componentes proinflamatorios está siendo desarrollado por Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut, como tratamiento potencial de la RA.

Dos grupos de investigación han propuesto independientemente que la vía de lectinas promueve la inflamación en pacientes con RA mediante la interacción de MBL con glucoformas de IgG específicas (Malhotra et al., *Nat. Med.* 7:237-243, 1995; Cuchacovich et al., *J. Rheumatol.* 23:44-51, 1996). La RA está asociada con un marcado incremento en las glucoformas de IgG que carecen de galactosa (denominadas glucoformas IgGO) en la región Fc de la molécula (Ruddetal., *Trends Biotechnology* 22:524-30, 2004). El porcentaje de glucoformas IgGO se incrementa con la progresión de la enfermedad, y retorna a la normalidad cuando los pacientes pasan a remisión. *In vivo*, la IgGO se deposita en el tejido sinovial, y la MBL está presente en mayores niveles en el líquido sinovial en individuos con RA. La agalactosil IgG (IgGO) agregada en la IgG agrupada asociada con RA puede unirse a la lectina de unión a manano (MBL) y activar la vía de lectinas del complemento. Asimismo, los resultados de un estudio clínico reciente que observó las variantes alélicas de MBL en pacientes con RA sugiere que la MBL puede tener una función potenciadora de la inflamación en la enfermedad (GaiTed et al., *J. Rheumatol.* 27:26-34, 2000). En

consecuencia, la vía de lectinas puede tener una función importante en la patogénesis de la RA.

El lupus eritematoso sistémico (SLE) es una enfermedad autoinmune de etiología indefinida que resulta en la producción de autoanticuerpos, generación de complejos inmunes y activación episódica descontrolada del sistema del complemento. Si bien los orígenes de la autoinmunidad en el SLE siguen siendo imprecisos, hay ahora considerable información disponible que implica la activación del complemento como un mecanismo importante que contribuye a lesión vascular en esta enfermedad (Abramson, S.B., et al., *Hospital Practice* 33:107-122, 1998). La activación de las vías del complemento clásica y alternativa está implicada en la enfermedad y tanto C4d como Bb son marcadores sensibles de la actividad moderada a severa del lupus (Manzi, S., et al., *Arthritis Rheumat.* 39:1178-1188, 1996). La activación de la vía del complemento alternativa acompaña brotes de la enfermedad en el lupus eritematoso sistémico durante el embarazo (Buyon, J.P., et al., *Arthritis Rheum.* 35:55-61, 1992). A su vez, la vía de lectinas puede contribuir al desarrollo de la enfermedad, dado que recientemente se han identificado autoanticuerpos contra la MBL en sueros de pacientes con SLE (Seelen, M.A., et al., *Clin Exp. Immunol.* 734:335-343, 2003).

Se cree que la activación del complemento mediada por el complejo inmune a través de la vía clásica es un mecanismo mediante el cual ocurre la lesión del tejido en pacientes con SLE. No obstante, las deficiencias hereditarias en los componentes del complemento de la vía clásica incrementan el riesgo del lupus y de enfermedad de tipo lupus (Pickering, M.C., et al., *Adv. Immunol.* 7(5):227-324, 2000). El SLE, o un síndrome relacionado, ocurre en más del 80% de las personas con deficiencia completa de C1q, C1r/C1s, C4 o C3. Esto presenta una aparente paradoja en la conciliación de los efectos nocivos con los efectos protectores del complemento en el lupus.

Una importante actividad de la vía clásica parece promover la eliminación de los complejos inmunes de la circulación y los tejidos mediante el sistema fagocítico mononuclear (Kohler, P.F., et al., *Am. J. Med.* 5(5):406-11, 1974). Además, se ha descubierto recientemente que el complemento tiene una función importante en la eliminación y desecho de cuerpos apoptóticos (Mevorarch, D., et al., *J. Exp. Med.* 188:2313-2320, 1998). La deficiencia en la función de la vía clásica puede predisponer a los sujetos al desarrollo de SLE, permitiendo un ciclo para desarrollo en el que los complejos inmunes o las células apoptóticas se acumulan en los tejidos, causan inflamación y liberan autoantígenos, que a su vez estimulan la producción de autoanticuerpos y complejos más inmunes, y evocan así una respuesta autoinmune (Botto, M., et al., *Nat. Genet.* 19:56-59, 1998; Botto, M., *Arthritis Res.* 3:201-10, 2001). No obstante, estos estados de deficiencia "completa" en los componentes de la vía clásica están presentes en aproximadamente uno de 100 pacientes con SLE. Por lo tanto, en la gran mayoría de los pacientes con SLE, la deficiencia del complemento en los componentes de la vía clásica no contribuye a la etiología de la enfermedad y la activación del complemento puede ser un mecanismo importante que contribuye a la patogénesis del SLE. El hecho de que escasos individuos con deficiencias genéticas permanentes en los componentes de la vía clásica frecuentemente desarrollen SLE en algún punto de sus vidas da testimonio de la redundancia de mecanismos capaces de desencadenar la enfermedad.

Los resultados de modelos animales de SLE respaldan la importante función de la activación del complemento en la patogénesis de la enfermedad. La inhibición de la activación de C5 usando un anti-C5 MoAb de bloqueo redujo la proteinuria y la enfermedad renal en ratones NZB/NZW FI, un modelo de ratón de SLE (Wang Y., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 93:8563-8, 1996). Asimismo, el tratamiento con anti-C5 MoAb de ratón con enfermedad de inmunodeficiencia combinada severa implantados con células que segregan anticuerpos anti-ADN produce una mejoría en la proteinuria y en el cuadro histológico renal con un beneficio asociado en la supervivencia comparado con los controles no tratados (Ravirajan, C.T., et al., *Rheumatology* 43:442-7, 2004). La vía alternativa también cumple una función importante en las manifestaciones de enfermedad autoinmune de SLE, ya que el retrocruzamiento de ratones deficientes del factor B en el modelo de MRL/lpr de SLE reveló que la carencia del factor B redujo la vasculitis, la enfermedad glomerular, el consumo de C3 y los niveles de IgG3 RF típicamente hallados en este modelo sin alterar los niveles de otros autoanticuerpos (Watanabe, H., et al., *J. Immunol.* 7(54):786-794, 2000). Un anti-C5 MoAb humanizado está bajo investigación como tratamiento potencial del SLE. Este anticuerpo previene la escisión de C5 a C5a y C5b. En ensayos clínicos de fase I, no se observaron efectos adversos graves, y hay más ensayos humanos en curso para determinar la eficacia en el SLE (Strand, V., *Lupus* 70:216-221, 2001).

Los resultados de estudios humanos y animales promueven la posibilidad de que el sistema del complemento contribuya directamente a la patogénesis de la distrofia muscular. Los estudios de biopsias distróficas humanas han demostrado que C3 y C9 se depositan en fibras necróticas y no necróticas del músculo distrófico (Cornelio y Dones, *Ann. Neurol.* 7(5):694-701, 1984; Spuler y Engel, A.G., *Neurology* 50:41-46, 1998). Usando métodos de micromatriz de ADN, Porter y colegas hallaron expresión génica notablemente aumentada de numerosos ARNm relacionados con el complemento en ratones deficientes de distrofina (*mdx*), lo cual coincide con el desarrollo de la enfermedad distrófica (Porter et al., *Hum. Mol. Genet.* 77:263-72, 2002).

Las mutaciones en el gen humano que codifica disferlina, una proteína muscular transmembrana, se han identificado como factores de riesgo importantes de dos formas de enfermedad musculoesquelética, a saber, distrofia muscular de la cintura y las extremidades (LGMD) y miopatía de Miyoshi (Liu et al., *Nat. Genet.* 20:31-6, 1998). Se han desarrollado varios modelos de ratón con mutaciones en disferlina, y también desarrollan distrofia muscular progresiva. La activación de la cascada del complemento se ha identificado en la superficie de fibras musculares no necróticas en algunos pacientes con LGMD (Spuler Engel., *Neurology* 50:41-46, 1998). En un estudio reciente,

Wenzel y colegas demostraron que las fibras musculares deficientes de disferlina, tanto en murinos como en seres humanos, carecen del factor inhibidor del complemento, CD33/DAF, un inhibidor específico de C5b-9 MAC (complejo de ataque a la membrana) (Wenzel et al., *J. Immunol.* 775:6219-25, 2005). En consecuencia, las células musculares no necróticas deficientes de disferlina son más susceptibles a lisis celular mediada por el complemento. Wenzel y colegas sugieren que la lisis mediada por el complemento de células del músculo esquelético puede ser un mecanismo patológico importante implicado en el desarrollo de LGMD y miopatía de Miyoshi en los pacientes. Connolly y colegas estudiaron la función del complemento C3 en la patogénesis de un modelo severo de distrofia congénita, el ratón *dy-I*, que es deficiente de laminina $\alpha 2$ (Connolly et al., *J. Neuroimmunol.* 727:80-7, 2002). Generaron animales genéticamente deficientes de C3 y laminina $\alpha 2$ y descubrieron que la ausencia de C3 prolongó la supervivencia en el modelo de *dy-I* de distrofia muscular. Asimismo, los ratones con genes inactivados dobles (C3-/-, *dy-I*-/-) demostraron más fuerza muscular que los ratones *dy-I*. Este trabajo sugiere que el sistema del complemento puede contribuir directamente a la patogénesis de esta forma de distrofia congénita.

Se describe la prevención o el tratamiento de artritis inflamatoria y no inflamatoria y otros trastornos musculoesqueléticos, incluidos, aunque sin limitarse a ello, artrosis, artritis reumatoidea, artritis reumatoidea juvenil, gota, artropatía neuropática, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante u otras espondiloartropatías y artropatías cristalinas, distrofia muscular o lupus eritematosos sistémico (SLE), administrando una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que padece dicho trastorno. El agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto sistémicamente, tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, subcutánea u otra administración parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. Alternativamente, la administración puede ser por administración local, tal como por inyección intra-articular. El agente inhibidor de MASP-2 se puede administrar periódicamente por un periodo de tiempo extenso para el tratamiento o el control de una afección crónica, o puede efectuarse por administración única o repetida en el periodo anterior, durante y/o después del traumatismo o la lesión aguda, incluidos procedimientos quirúrgicos realizados en la articulación.

25 Afecciones renales

Se ha implicado a la activación del sistema del complemento en la patogénesis de una amplia gama de enfermedades renales; incluidas glomerulonefritis mesangioproliferativa (nefropatía IgA, enfermedad de Berger) (Endo, M., et al., *Clin. Nephrology* 55:185-191, 2001), glomerulonefritis membranosa (Kerjashki, D., *Arch B Cell Pathol.* 55:253-71, 1990; Brenchley, P.E., et al., *Kidney Int.*, 41:933-7, 1992; Salant, D.J., et al., *Kidney Int.* 35:976-84, 1989), glomerulonefritis membranoproliferativa (glomerulonefritis mesangiocapilar) (Bartlow, B.G., et al., *Kidney Int.* 75:294-300, 1979; Meri, S., et al., *J. Exp. Med.* 775:939-50, 1992), glomerulonefritis postinfecciosa aguda (glomerulonefritis postestreptocócica), glomerulonefritis crioglobulinémica (Ohsawa, I., et al., *Clin Immunol.* 101:59-66, 2001), nefritis por lupus (Gatenby, P.A., *Autoimmunity* 11:61-6, 1991) y nefritis por púrpura de Henoch-Schonlein (Endo, M., et al., *Am. J. Kidney Dis.* 35:401-407, 2000). Se ha apreciado la participación del complemento en la enfermedad renal durante varias décadas, pero todavía existe un debate importante en cuanto a su función exacta en la fase de inicio, de desarrollo y de resolución de la enfermedad renal. Bajo condiciones normales, la contribución del complemento es beneficiosa para el hospedante, pero la activación inadecuada y la deposición del complemento pueden contribuir al daño del tejido.

Existen datos sustanciales de que la glomerulonefritis, la inflamación de los glomérulos, a menudo se inicia por deposición de complejos inmunes en estructuras glomerulares o tubulares que luego desencadena la activación del complemento, la inflamación y el daño del tejido. Kahn y Sinniah demostraron un aumento de la deposición de C5b-9 en las membranas basales tubulares en biopsias de pacientes con diversas formas de glomerulonefritis (Kahn, T.N., et al., *Histopath.* 26:351-6, 1995). En un estudio de pacientes con nefrología IgA (Alexopoulos, A., et al., *Nephrol. Dial. Transplant* 70:1166-1172, 1995), la deposición de C5b-9 en las estructuras de la membrana basal tubulares/epiteliales se correlacionó con niveles de creatinina en el plasma. Otro estudio de nefropatía membranosa demostró una relación entre el desenlace y los niveles de sC5b-9 en la orina (Kon, S.P., et al., *Kidney Int.* 48:1953-58, 1995). Los niveles de sC5b-9 elevados se correlacionaron positivamente con un mal pronóstico. Lehto et al., midieron niveles elevados de CD59, un factor regulador del complemento que inhibe el complejo de ataque a la membrana en las membranas plasmáticas, así como también C5b-9 en orina de pacientes con glomerulonefritis membranosa (Lehto, T., et al., *Kidney Int.* 47:1403-11, 1995). El análisis histopatológico de muestras de biopsias tomadas de estos pacientes demostró deposición de proteínas C3 y C9 en los glomérulos, mientras que la expresión de CD59 en estos tejidos disminuyó en comparación con aquella del tejido renal normal. Estos diversos estudios sugieren que la glomerulonefritis constante mediada por el complemento produce excreción urinaria de las proteínas del complemento que se correlaciona con el grado de daño al tejido y pronóstico de la enfermedad.

La inhibición de la activación del complemento en diversos modelos animales de glomerulonefritis también ha demostrado la importancia de la activación del complemento en la etiología de la enfermedad. En un modelo de glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN), la infusión de antisuero anti-Thy1 en ratas deficientes de C6- (que no pueden formar C5b-9) resultó en 90% menos de proliferación celular glomerular, 80% de reducción de plaquetas e infiltración de macrófagos, disminución de la síntesis de colágeno de tipo IV (un marcador para la expansión de la matriz mesangial) y 50% menos de proteinuria que en ratas normales C6+ (Brandt, J., et al., *Kidney Int.* 49:335-343, 1996). Estos resultados implican a C5b-9 como un mediador importante del daño al tejido por el complemento en este modelo de suero anti-timocito de rata. En otro modelo de glomerulonefritis, la infusión de dosis graduales de

membrana basal antirrata de conejo produjo un flujo de leucocitos polimorfonucleares (PMN) dependiente de la dosis que se atenuó con el tratamiento previo con el factor de veneno de cobra (para consumir el complemento) (Scandrett, A.L., et al., *Am. J. Physiol.* 268:F256-F265, 1995). Las ratas tratadas con el factor de veneno de cobra también demostraron menos histopatología, menos proteinuria a largo plazo y menos niveles de creatinina que las ratas control. Al emplear tres modelos de GN en ratas (suero anti-timocito. Con A anti-Con A y nefritis pasiva de Heymann), Couser et al., demostraron la eficacia terapéutica potencial de los enfoques para inhibir el complemento usando la proteína sCRI recombinante (Couser, W.G., et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 5:1888-94, 1995). Las ratas tratadas con sCRI demostraron una importante reducción de PMN, plaquetas e influjo de macrófagos, menos mesangiólisis y proteinuria frente a las ratas control. Se han aportado otros datos de la importancia de la activación del complemento en la glomerulonefritis mediante el uso de un anti-C5 MoAb en el modelo de ratón NZB/W FI. El anti-C5 MoAb inhibe la escisión de C5, bloqueando así la generación de C5a y C5b-9. La terapia continua con anti-C5 MoAb durante 6 meses produjo la mejoría del curso de la glomerulonefritis. Un anticuerpo monoclonal anti-C5 MoAb humanizado (5G1.1) que previene la escisión del componente del complemento humano C5 en sus componentes pro-inflamatorios está bajo desarrollo por Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut, como tratamiento potencial de la glomerulonefritis.

Evidencia directa de una función patológica del complemento en la lesión renal es provista por estudios de pacientes con deficiencias genéticas en los componentes del complemento específicos. Una serie de informes han documentado una asociación de la enfermedad renal con deficiencias del factor regulador del complemento H (Ault, B.H., *Nephrol.* 74:1045-1053, 2000; Levy, M., et al., *Kidney Int.* 30:949-56, 1986; Pickering, M.C., et al., *Nat. Genet.* 37:424-8, 2002). La deficiencia del factor H resulta en bajos niveles en plasma del factor B y C3, y en el consumo de C5b-9. Tanto la glomerulonefritis membranoproliferativa atípica (MPGN) como el síndrome urémico hemolítico idiopático (HUS) están asociados con la deficiencia del factor H. Cerdos deficientes del factor H (Jansen, J.H., et al., *Kidney Int.* 53:331-49, 1998) y ratones con genes inactivados del factor H (Pickering, M.C., 2002) exhiben síntomas de tipo MPGN, confirmando la importancia del factor H en la regulación del complemento. Las deficiencias de otros componentes del complemento están asociadas con enfermedad renal, secundaria al desarrollo de lupus eritematoso sistémico (SLE) (Walport, M.J., Davies, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 815:267-81, 1997). La deficiencia de C1q, C4 y C2 predispone fuertemente al desarrollo de SLE mediante mecanismos relacionados con el aclaramiento defectuoso de complejos inmunes y material apoptótico. En muchos de estos pacientes con SLE tiene lugar la nefritis por lupus, que se caracteriza por la deposición de complejos inmunes a través de los glomérulos.

Otros datos que vinculan la activación del complemento con la enfermedad renal han sido proporcionados por la identificación en pacientes con autoanticuerpos dirigidos contra los componentes del complemento, algunos de los cuales se han relacionado directamente con enfermedad renal (Trouw, L.A., et al., *Mol. Immunol.* 38:199-206, 2001). Una serie de estos autoanticuerpos demuestran un grado tal de correlación con la enfermedad renal que se introdujo el término factor nefrítico (NeF) para indicar esta actividad. En estudios clínicos, aproximadamente el 50% de los pacientes positivos para factores nefríticos desarrollaron MPGN (Spitzer, R.E., et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 64:177-83, 1992). C3NeF es un autoanticuerpo dirigido contra la convertasa C3 de la vía alternativa (C3bBb) y estabiliza esta convertasa, promoviendo así la activación de la vía alternativa (Daha, M.R., et al., *J. Immunol.* 116:1-1, 1976). Asimismo, el autoanticuerpo con una especificidad para la convertasa C3 de la vía clásica (C4b2a), llamado C4NeF, estabiliza esta convertasa y promueve así la activación de la vía clásica (Daha, M.R. et al., *J. Immunol.* 125:2051-2054, 1980; Halbwachs, L., et al., *J. Clin. Invest.* 65:1249-56, 1980). Se ha descrito que los autoanticuerpos anti-C1q están relacionados con la nefritis en pacientes con SLE (Hovath, L., et al., *Clin. Exp. Rheumatol.* 79:667-72, 2001; Siegert, C., et al., *J. Rheumatol.* 78:230-34, 1991; Siegert, C., et al., *Clin. Exp. Rheumatol.* 70:19-23, 1992), y se describió que un aumento en la titulación de estos autoanticuerpos anti-C1q pronostica un brote de nefritis (Coremans, I.E., et al., *Am. J. Kidney Dis.* 26:595-601, 1995). Los depósitos inmunes eluidos de riñones postmórtem de pacientes con SLE revelaron la acumulación de estos autoanticuerpos anti-C1q (Mannick, M., et al., *Arthritis Rheumatol.* 40:1504-11, 1997). Todos estos hechos señalan la función patológica de estos autoanticuerpos. No obstante, no todos los pacientes con autoanticuerpos anti-C1q desarrollan enfermedad renal y también algunos individuos sanos tienen autoanticuerpos anti-C1q de baja titulación (Siegert, C.E., et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 67:204-9, 1993).

Además de las vías alternativa y clásica de la activación del complemento, la vía de lectinas puede también tener una función importante en la enfermedad renal. Niveles elevados de MBL, serina proteasa asociada a MBL y productos de activación del complemento han sido detectados por técnicas de inmunohistoquímica en material de biopsia renal obtenido de pacientes diagnosticados con varias enfermedades renales distintas, incluida nefritis por púrpura de Henoch-Schonlein (Endo, M., et al., *Am. J. Kidney Dis.* 35:401-407, 2000), glomerulonefritis crioglobulinémica (Ohsawa, I., et al., *Clin. Immunol.* 101:59-66, 2001) y neuropatía IgA (Endo, M., et al., *Clin. Nephrology* 55:185-191, 200). Por consiguiente, a pesar de que se conoce desde hace varias décadas una asociación entre el complemento y las enfermedades renales, los de cómo el complemento influye exactamente en estas enfermedades renales son mucho más complejos.

Un aspecto de la invención se refiere entonces al tratamiento de afecciones renales que incluyen, aunque sin limitarse a ello, glomerulonefritis mesangioproliferativa, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis membranoproliferativa (glomerulonefritis mesangiocapilar), glomerulonefritis post-infecciosa aguda (glomerulonefritis estreptocócica), glomerulonefritis crioglobulinémica, nefritis por lupus, nefritis por púrpura de Henoch-Schonlein o nefropatía IgA, administrando una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente

inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que padece dicho trastorno. El agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto en forma sistémica, tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, subcutánea u otra administración parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. El agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse periódicamente por un periodo de tiempo extenso para el tratamiento o el control de una afección crónica, o puede ser una administración única o repetida en el periodo, anterior, durante o posterior al trauma o lesión aguda.

Trastornos de la piel

La psoriasis es una afección crónica y debilitante de la piel que afecta a millones de personas y se atribuye tanto a factores genéticos como ambientales. Los agentes tópicos, así como también la fototerapia de UVB y PUVA se consideran en general la primera línea de tratamiento de la psoriasis. Sin embargo, para la enfermedad más extensa o generalizada, se indica la terapia sistémica como tratamiento primario o, en algunos casos, para potenciar la terapia de UVB y PUVA.

La etiología subyacente de diversas enfermedades de la piel tales como psoriasis respaldan la función de los procesos inmunes y proinflamatorios, incluida la participación del sistema del complemento. Asimismo, la función del sistema del complemento se ha establecido como un importante mecanismo de defensa de la piel no específico. Su activación conduce a la generación de productos que no solamente ayudan a mantener las defensas normales del hospedante, sino que además median en la inflamación y la lesión del tejido. Los productos proinflamatorios del complemento incluyen grandes fragmentos de C3 con actividades opsónicas y estimuladoras de las células (C3b y C3bi), anafilatoxinas de bajo peso molecular (C3a, C4a y C5a), y complejos de ataque a la membrana. Entre ellos, C5a o su producto de degradación C5a des Arg, parece ser el mediador más importante, dado que ejerce un potente efecto quimiotáctico sobre las células inflamatorias. La administración intradérmica de anafilatoxina C5a induce cambios en la piel bastante similares a aquellos observados en vasculitis de hipersensibilidad cutánea que ocurre a través de la activación del complemento mediada por el complejo inmune. La activación del complemento está implicada en la patogénesis de los cambios inflamatorios en dermatosis bullosa autoinmune. La activación del complemento por el anticuerpo penfigoide en la epidermis parece ser responsable del desarrollo de cambios inflamatorios característicos llamados espongiosis eosinofílica. En el pénfigo bulloso (BP), la interacción del antígeno de la zona de la membrana basal y el anticuerpo BP conduce a la activación del complemento que parece estar relacionada con los leucocitos que recubren la unión dermoepidérmica. Las anafilatoxinas resultantes no solamente activan los leucocitos infiltrantes, sino que además inducen la desgranulación de mastocitos, lo cual facilita la separación dermoepidérmica y la infiltración de eosinófilos. De modo similar, la activación del complemento parece cumplir una función más directa en la separación dermoepidérmica observada en epidermólisis bullosa adquirida y en herpes gestacional.

La evidencia de la participación del complemento en la psoriasis proviene de hallazgos experimentales recientes descritos en la bibliografía relacionada con mecanismos patofisiológicos para los cambios inflamatorios en la psoriasis y en enfermedades relacionadas. Un conjunto de pruebas ha indicado que la inmunidad mediada por las células T cumple una función importante en el desencadenamiento y el mantenimiento de lesiones psoriásicas. Se ha revelado que las linfocinas producidas por células T activadas en lesiones psoriásicas tienen una fuerte influencia sobre la proliferación de la epidermis. Se puede observar la acumulación de neutrófilos característica debajo de la capa córnea en las áreas muy inflamadas de las lesiones psoriásicas. Los neutrófilos son atraídos y activados quimiotácticamente allí por una acción sinérgica de las quimiocinas, IL-8 y Gro-alfa, liberadas por queratinocitos estimulados, y particularmente por C5a/C5a des-arg producidos mediante la activación de la vía del complemento alternativa (Terui, T., *Tahoku J. Exp. Med.* 190:239-248, 2000; Terui, T., *Exp. Dermatol.* 9:1-10, 2000).

Los extractos de escamas psoriásicas contienen una fracción de péptido quimiotáctico única que probablemente esté implicada en la inducción de la quimiotaxis de leucocitos transepidérmicos rítmicos. Estudios recientes han identificado la presencia de dos péptidos quimiotácticos no relacionados en esta fracción, es decir, C5a/C5a des Arg e interleucina 8 (IL-8) y sus citocinas relacionadas. Para investigar su contribución relativa a la migración de leucocitos transepidérmicos, así como también su interrelación en las lesiones psoriásicas, se cuantificaron concentraciones de C5a/C5a desArg e IL-8 inmunorreactivos en extractos de escamas de lesiones psoriásicas y aquellas de dermatosis pustular estéril relacionada. Se descubrió que las concentraciones de C5a/C5a desArg e IL-8 aumentaban más significativamente en los extractos de tejido córneo de piel con lesiones que en aquellos de piel ortoqueratósica no inflamatoria. El incremento de la concentración de C5a/C5a desArg fue específico de los extractos de escamas de lesiones. En función de estos resultados, parece ser que C5a/C5a desArg se genera solamente en piel con lesiones inflamatorias bajo circunstancias específicas que preferencialmente favorecen la activación del complemento. Esto provee un fundamento para el uso de un inhibidor de la activación del complemento a fin de mejorar las lesiones psoriásicas.

Si bien se ha demostrado que la vía clásica del sistema del complemento se activa en la psoriasis, hay menos informes sobre la participación de la vía alternativa en las reacciones inflamatorias en psoriasis. Dentro del panorama convencional de las vías de activación del complemento, los fragmentos del complemento C4d y Bb se liberan al momento de activación de las vías clásica y alternativa, respectivamente. La presencia del fragmento C4d o Bb, por lo tanto, ilustra una activación del complemento que procede a través de la vía clásica y/o alternativa. Un estudio midió los niveles de C4d y Bb en extractos de escamas psoriásicas usando técnicas de inmunoensayo

enzimático. Las escamas de estas dermatosis contenían niveles mayores de C4d y Bb detectables por el inmunoensayo enzimático que aquellas en la capa córnea de piel no inflamatoria (Takematsu, H., et al., *Dermatologica* 181:289-292, 1990). Estos resultados indican que la vía alternativa se activa, además de la vía clásica del complemento, en piel con lesiones psoriásicas.

5 Otros datos de la participación del complemento en psoriasis y dermatitis atópica se han obtenido midiendo los componentes del complemento normales y los productos de activación en la sangre periférica de 35 pacientes con dermatitis atópica (AD) y 24 pacientes con psoriasis en una etapa entre leve e intermedia. Los niveles de C3, C4 y de inactivador de CI (CI INA) se determinaron en suero por inmunodifusión radial, mientras que los niveles de C3a y C5a se midieron por radioinmunoensayo. En comparación con controles no atópicos sanos, los niveles de C3, C4 y CI INA se hallaron significativamente aumentados en ambas enfermedades. En AD, hubo una tendencia a aumento en los niveles de C3a, mientras que en psoriasis, los niveles de C3a aumentaron significativamente. Los resultados indican que tanto en AD como en psoriasis, el sistema de activación del complemento participa en los procesos inflamatorios (Ohkonohchi, K., et al., *Dermatologica* 779:30-34, 1989).

15 La activación del complemento en piel con lesiones psoriásicas resulta en la deposición de complejos del complemento terminales dentro de la epidermis según lo definido midiendo los niveles de SC5b-9 en el plasma y en los tejidos con queratomas de pacientes psoriásicos. Se ha descubierto que los niveles de SC5b-9 en el plasma psoriásico son significativamente más altos que aquellos de los controles o aquellos de pacientes con dermatitis atópica. Los estudios de extractos de proteínas totales de piel con lesiones han demostrado que, si bien no se puede detectar SC5b-9 en los tejidos con queratomas no inflamatorios, hubo altos niveles de SC5b-9 en tejidos con queratomas de psoriasis. Por inmunofluorescencia que usa un anticuerpo monoclonal al neonatígeno C5b-9, se observó la deposición de C5b-9 solamente en la capa córnea de piel psoriásica. En resumen, en piel con lesiones psoriásicas, el sistema del complemento se activa y la activación del complemento procede hasta la etapa terminal, generando el complejo de ataque a la membrana.

25 Nuevos fármacos biológicos que se dirigen selectivamente al sistema inmunológico están ahora disponibles para tratar la psoriasis. Cuatro fármacos biológicos actualmente aprobados por la FDA en estudios de fase 3 son: alefacept (Amevive®) y efalizumab (Raptiva®) que son moduladores de células T; etanercept (Enbrel®), un receptor de TNF soluble; e infliximab (Remicade®), un anticuerpo monoclonal anti-TNF. Raptiva es un modificador de la respuesta inmune, en donde el mecanismo dirigido de acción es un bloqueo de la interacción entre LFA-1 en los linfocitos e ICAM-1 en las células que presentan antígenos y en las células endoteliales vasculares. La unión de CD 11a por Raptiva produce la saturación de sitios de unión a CD 11a disponibles en los linfocitos y la reducción de la modulación de la expresión de CD11a de la superficie celular en los linfocitos. Este mecanismo de acción inhibe la activación de las células T, el tráfico de células hacia la dermis y la epidermis y la reactivación de las células T. Por lo tanto, una pluralidad de datos científicos indican una función del complemento en estados de enfermedad inflamatorios de la piel, y planteamientos farmacéuticos recientes se han dirigido al sistema inmunológico o a procesos inflamatorios específicos. No obstante, ninguno de ellos ha identificado a la MASP-2 como un planteamiento dirigido. En base a la nueva comprensión de los inventores de la función de la MASP-2 en la activación del complemento, los inventores creen que la MASP-2 es una diana eficaz para el tratamiento de la psoriasis y otros trastornos de la piel.

40 Se describe el tratamiento de la psoriasis, dermatosis bullosa autoinmune, espongiosis eosinofílica, penfigoide bulloso, epidermolísis bullosa adquirida, dermatitis atópica, herpes gestacional y otros trastornos de la piel, y para el tratamiento de quemaduras térmicas y químicas incluida fuga capilar causada de este modo, administrando una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que padece dicho trastorno de piel. El agente inhibidor de MASP-2 se puede administrar al sujeto por vía tópica, por aplicación de un aerosol, loción, gel, pasta o disolución de irrigación que contiene el agente inhibidor de MASP-2, o por vía sistémica tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, subcutánea u otra administración parenteral, o potencialmente por administración oral para inhibidores no peptidérgicos. El tratamiento puede implicar una sola administración o aplicaciones o dosis repetidas para una afección aguda, o aplicaciones o administraciones periódicas para el control de una afección crónica.

Trasplante

50 La activación del sistema del complemento contribuye significativamente a la reacción inflamatoria después del trasplante de órganos sólidos. En el alotrasplante, el sistema del complemento puede ser activado por isquemia/reperusión y posiblemente, por anticuerpos dirigidos contra el injerto (Baldwin, W.M., et al., *Springer Semin Immunopathol.* 25:181-197, 2003). En xenotrasplante de no primates a primates, los activadores principales del complemento son anticuerpos preexistentes. Los estudios en modelos animales han demostrado que el uso de inhibidores del complemento puede prolongar significativamente la supervivencia del injerto (ver a continuación). Por consiguiente, existe una función establecida del sistema del complemento en la lesión orgánica después del trasplante del órgano, y por lo tanto los inventores consideran que el uso de los inhibidores del complemento dirigidos a MASP-2 puede prevenir el daño al injerto después de un alo o xenotrasplante.

60 Los mecanismos inmunes innatos, particularmente el complemento, cumplen una función más importante en las repuestas inflamatorias e inmunes contra el injerto que lo que se había reconocido previamente. Por ejemplo, la

activación de la vía del complemento alternativa parece mediar la lesión de isquemia/reperfusión renal, y las células tubulares proximales pueden ser la fuente y el sitio de ataque de los componentes del complemento en este escenario. El complemento producido localmente en el riñón también cumple una función en el desarrollo de respuestas inmunes mediadas por anticuerpos y células contra el injerto.

5 C4d es el producto de degradación del factor del complemento activado C4, un componente de las vías clásica y dependiente de lectinas. La tinción de C4d ha emergido como un marcador útil del rechazo humoral tanto en el ámbito agudo como en el crónico y condujo a un interés renovado en la significancia de la formación de anticuerpos anti-donante. La asociación entre C4d y signos morfológicos de rechazo celular agudo es estadísticamente significativa. El C4d se halla en 24-43% de los episodios de tipo I, en 45% de rechazo de tipo II y en 50% de rechazo de tipo III (Nickeleit, V., et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 13:242-251, 2002; Nickeleit, V., et al., *Nephrol. Dial. Transplant* 18:2232-2239, 2003). Se encuentran en desarrollo una serie de terapias que inhiben el complemento o reducen la síntesis local como medio para lograr un mejor desenlace clínico después del trasplante.

15 La activación de la cascada del complemento ocurre como consecuencia de una serie de procesos durante el trasplante. La terapia actual, si bien eficaz para limitar el rechazo celular, no aborda todas las barreras enfrentadas. Estas incluyen rechazo humoral y nefropatía o disfunción crónica por el aloinjerto. Si bien la respuesta general al órgano trasplantado es consecuencia de una serie de mecanismos efectores por parte del hospedante, el complemento puede cumplir una función clave en algunos de estos. En este ámbito de trasplante renal, la síntesis local del complemento por las células tubulares proximales parece ser de particular importancia.

20 La disponibilidad de los inhibidores específicos del complemento puede proveer la oportunidad de un resultado mejorado después del trasplante de órganos. Los inhibidores que actúan por un mecanismo que bloquea el ataque del complemento pueden ser particularmente útiles, ya que mantienen la promesa de una mayor eficacia y evitación de la disminución del complemento sistémico en un receptor ya inmunocomprometido.

25 El complemento también cumple una función crítica en el rechazo de xenoinjertos. Por ende, los inhibidores del complemento eficaces son de gran interés como potenciales agentes terapéuticos. En el trasplante de órganos de cerdo a primate, el rechazo hiperagudo (HAR) produce la deposición de anticuerpos y la activación del complemento. Se han ensayado múltiples estrategias y dianas para prevenir el rechazo del xenoinjerto hiperagudo en la combinación cerdo a primate. Estos planteamientos se han logrado mediante la eliminación de anticuerpos naturales, eliminación del complemento con el factor de veneno de cobra o prevención de la activación de C3 con el inhibidor del complemento soluble sCRI. Además, el bloqueante 2 (CAB-2) de la activación del complemento, una proteína quimérica soluble recombinante derivada del factor acelerado de decaimiento (DAF) humano y la proteína del cofactor de membrana, inhibe las convertasas C3 y C5 de ambas vías, clásica y alternativa. CAB-2 reduce la lesión del tejido mediada por el complemento de un corazón de cerdo perfundido *ex vivo* con sangre humana. Un estudio de la eficacia de CAB-2 cuando se trasplantó un corazón de cerdo en forma heterotópica en monos rhesus que no recibieron inmunosupresión demostró que la supervivencia del injerto era notablemente prolongada en monos que recibieron CAB-2 (Salerno, C.T., et al., *Xenotransplantation* 9:125-134, 2002). CAB-2 inhibió marcadamente la activación del complemento, como se muestra mediante la fuerte reducción en la generación de C3a y SC5b-9. En el rechazo de injertos, la deposición de tejido de iC3b, C4 y C9 fue similar o ligeramente reducida de los controles, y la deposición de IgG, IgM, Clq y fibrina no cambió. Por lo tanto, este planteamiento para la inhibición del complemento revocó el rechazo hiperagudo de corazones de cerdo trasplantados a monos rhesus. Estos estudios demuestran los efectos beneficios de la inhibición del complemento en la supervivencia, y los inventores creen que la inhibición de MASP-2 puede ser útil en el xenotrasplante.

45 Otro planteamiento se ha centrado en determinar si los anticuerpos monoclonales anti-complemento 5 (C5) podrían prevenir el rechazo hiperagudo (HAR) en un modelo de trasplante de corazón de rata a ratón presensibilizado y si estos MoAb, combinados con ciclosporina y ciclofosfamida, podrían lograr la supervivencia del injerto a largo plazo. Se halló que el anti-C5 MoAb previene el HAR (Wang, H., et al., *Transplantation* (58):1643-1651, 1999). Los inventores creen por lo tanto que otras dianas en la cascada del complemento, tales como MASP-2, podrían también ser valiosas para prevenir HAR y rechazo vascular agudo en el xenotrasplante clínico futuro.

50 Si bien la función fundamental del complemento en el rechazo hiperagudo observado en xenoinjertos está bien establecida, está emergiendo una función más sutil en el trasplante alogénico. Se conoce desde hace mucho un vínculo entre el complemento y la respuesta inmune adquirida, con el hallazgo de que los animales que carecen del complemento montaron respuestas de anticuerpos subnormales después de la estimulación antigénica. Se ha demostrado que la opsonización de antígeno con el producto de división del complemento C3d incrementa en gran medida la eficacia de la presentación de antígenos a las células B, y se ha demostrado que actúan mediante la implicación del receptor del complemento de tipo 2 en ciertas células B. Este trabajo se ha extendido al ámbito del trasplante en un modelo de injerto de piel en ratones, en donde los ratones deficientes de C3 y C4 tuvieron un notable efecto en la producción de alo-anticuerpos, debido a la falla de clase alterna a IgG de gran afinidad. La importancia de estos mecanismos en el trasplante renal aumenta debido a la significancia de los anticuerpos anti-donante y al rechazo humoral.

60 El trabajo previo ya ha demostrado el aumento de la síntesis de C3 por células tubulares proximales durante el rechazo del aloinjerto que le sigue a un trasplante renal. La función del complemento sintetizado localmente se ha

5 examinado en un modelo de trasplante renal de ratón. Los injertos de donantes C3-negativos trasplantados a receptores suficientes de C3 demostraron supervivencia prolongada (>100 días) comparados con los injertos control de donantes C3-positivos, que fueron rechazados dentro de los 14 días. Además, la respuesta proliferativa de las células T anti-donante en receptores de injertos C3-negativos se redujo notablemente en comparación con aquella de los controles, lo que indica un efecto de C3 localmente sintetizado en la imprimación de las células T.

10 Estas observaciones sugieren la posibilidad de que la exposición del antígeno del donante a las células T ocurra primero en el injerto y que el complemento localmente sintetizado potencie la presentación de antígenos, o bien por opsonización del antígeno del donante o proporcionando señales adicionales tanto a las células presentadoras de antígenos como a las células T. En el ámbito del trasplante renal, las células tubulares que producen el complemento también demuestran la deposición del complemento en su superficie celular.

15 Se describe la prevención o el tratamiento de reacción inflamatoria resultante de trasplante de tejido u órgano sólido, administrando una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico al receptor del trasplante, incluidos sujetos que han recibido alotrasplante o xenotrasplante de órganos enteros (p. ej., riñón, corazón, hígado, páncreas, pulmón, córnea, etc.) o injertos (p. ej., válvulas, tendones, médula ósea, etc.). El agente inhibidor de MASP-2 se puede administrar al sujeto por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, subcutánea u otra administración parenteral, o potencialmente por administración oral para inhibidores no peptidérgicos. La administración puede ocurrir durante el periodo agudo que sigue al trasplante y/o durante la terapia post-trasplante a largo plazo. Adicionalmente o en lugar de la administración post-trasplante, el sujeto puede ser tratado con el agente inhibidor de MASP-2 antes del trasplante y/o durante el procedimiento de trasplante, y/o pre-tratando el órgano o tejido que se ha de trasplantar con el agente inhibidor de MASP-2. El pretratamiento del órgano o tejido puede comprender aplicar una disolución, gel o pasta que contenga el agente inhibidor de MASP-2 a la superficie del órgano o tejido, pulverizando o irrigando la superficie, o el órgano o tejido puede ser embebido en una disolución que contenga el inhibidor de MASP-2.

Trastornos y lesiones del sistema nervioso central y periférico

25 La activación del sistema del complemento ha sido implicada en la patogénesis de una diversidad de enfermedades o lesiones del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP), lo que incluye, aunque sin limitarse a ello, esclerosis múltiple (MS), miastenia grave (MG), enfermedad de Huntington (HD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), síndrome de Guillain Barre, reperfusión que le sigue a un accidente cerebrovascular, discos degenerativos, traumatismo cerebral, enfermedad de Parkinson (PD) y enfermedad de Alzheimer (AD). La determinación inicial de que las proteínas del complemento se sintetizan en las células del SNC incluidas neuronas, astrocitos y microglías, así como también la comprensión de que las anafilatoxinas generadas en el SNC después de la activación del complemento pueden alterar la función neuronal, ha abierto la función potencial del complemento en trastornos del SNC (Morgan, B.P., et al., *Immunology Today* 17:10: 461-466, 1996). Se ha demostrado ahora que los receptores de C3a y los receptores de C5a se hallan en las neuronas y demuestran distribución extendida en distintas porciones de los sistemas cerebrales sensorial, motriz y límbico (Barum, S.R., *Immunologic Research* 26:1-13, 2002). Asimismo, se ha demostrado que las anafilatoxinas C5a y C3a alteran la conducta de comer y beber en roedores y pueden inducir señalización de calcio en microglías y neuronas. Estos hallazgos abren posibilidades con respecto a la utilidad terapéutica de inhibir la activación del complemento en una diversidad de enfermedades inflamatorias del SNC, incluido traumatismo cerebral, desmielinación, meningitis, accidente cerebrovascular y enfermedad de Alzheimer.

45 El traumatismo o la hemorragia cerebral es un problema clínico común, y la activación del complemento puede ocurrir y exacerbar la inflamación y el edema resultantes. Los efectos de la inhibición del complemento se han estudiado en un modelo de traumatismo cerebral en ratas (Kaczorowski et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 75:860-864, 1995). La administración de sCRI inmediatamente antes de la lesión cerebral inhibió notablemente la infiltración de neutrófilos en el área lesionada, lo que indica que el complemento fue importante para captar células fagocíticas. Asimismo, la activación del complemento en los pacientes después de una hemorragia cerebral está claramente implicada por la presencia de altos niveles de múltiples productos de activación del complemento, tanto en plasma como en el líquido cefalorraquídeo (CSF). La activación del complemento y el aumento de tinción de complejos de C5b-9 se han demostrado en tejido de disco lumbar secuestrado, y esto podría sugerir una función en la ciática inducida por tejido de hernia de disco (Gronblad, M., et al., *Spine* 28(2):114-118, 2003).

50 La MS se caracteriza por una pérdida progresiva de la mielina que recubre y aísla los axones dentro del SNC. Si bien se desconoce la causa inicial, hay mucha información que implica al sistema inmune (Prineas, J.W., et al., *Lab Invest.* 38:409-421, 1978; Ryberg, B., *J. Neurol. Sci.* 54:239-261, 1982). También hay datos claros de que el complemento cumple una función prominente en la patofisiología de las enfermedades de desmielinación del SNC o el SNP, incluida la MS, el síndrome de Guillain-Barre y el síndrome de Miller-Fisher (Gasque, P., et al., *Immunopharmacology* 49:171-186, 2000; Bamum, S.R. en Bondy S. et al. (eds.) *Inflammatory events in neurodegeneration*, Prominent Press 139-156, 2001). El complemento contribuye a la destrucción e inflamación del tejido, aclaramiento de sedimentos de mielina e incluso remielinación de axones. A pesar de la clara evidencia de la participación del complemento, la identificación de dianas terapéuticas del complemento es ahora solamente evaluada en encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), un modelo animal de esclerosis múltiple. Los estudios han establecido que los ratones con EAE deficientes de C3 o del factor B demostraron desmielinación atenuada en

comparación con ratones EAE control (Bamum, *Immunologic Research* 26:7-13, 2002). Los estudios de ratones EAE que usan una forma soluble de un inhibidor del complemento definido como "sCrry" y C3-/- y factor B-/- demostraron que el complemento contribuye al desarrollo y la progresión del modelo de enfermedad en varios niveles. Además, la marcada reducción de la gravedad de la EAE en ratones con el factor B-/- proporciona más datos de la función de la vía alternativa del complemento en EAE (Nataf et al., *J. Immunology* 165:5867-5873, 2000).

La MG es una enfermedad de la unión neuromuscular con una pérdida de receptores de acetilcolina y destrucción de la placa terminal. sCRI es muy eficaz en un modelo animal de MG, lo que además indica la función del complemento en la enfermedad (Piddelesden et al., *J. Neuroimmunol.* 1997).

Los sellos distintivos histológicos de AD, una enfermedad neurodegenerativa, son las placas seniles y los enredos neurofibrilares (McGeer et al., *Res. Immunol.* 143:621-630, 1992). Estos marcadores patológicos también tiñen fuertemente los componentes del sistema del complemento. La evidencia señala un estado neuroinflamatorio local que resulta en la muerte neuronal y la disfunción cognitiva. Las placas seniles contienen el péptido α -amiloides anormal (AD, un péptido derivado de la proteína precursora de amiloide. Se ha demostrado que AD se une a C1 y puede desencadenar la activación del complemento (Rogers et al., *Res. Immunol.* 143:624-630, 1992). Además, una característica prominente de AD es la asociación de proteínas activadas de la vía del complemento clásica de C1q a C5b-9, que se han hallado altamente localizadas en las placas neuríticas (Shen, Y., et al., *Brain Research* 769:391-395, 1997; Shen, Y., et al., *Neurosci. Letters* 305(3):165-168, 2001). Por lo tanto, AD no solamente inicia la vía clásica, sino que también un estado inflamatorio continuo resultante puede contribuir a la muerte neuronal. Asimismo, el hecho de que la activación del complemento en AD haya progresado a la fase C5b-9 terminal indica que los mecanismos reguladores del sistema del complemento no han sido capaces de impedir el proceso de activación del complemento.

Se han propuesto diversos inhibidores de la vía del complemento como planteamientos terapéuticos potenciales para la AD, incluidos proteoglicanos como inhibidores de la unión de C1Q, Nafamstat como inhibidor de la convertasa C3, y bloqueantes de la activación de C5 o inhibidores de los receptores de C5a (Shen, Y., et al., *Progress in Neurobiology* 70:463-472, 2003). La función de la MASP-2 como una etapa de inicio en la vía del complemento innata, así como también en la activación de la vía alternativa, proporciona un nuevo planteamiento terapéutico respaldado por la riqueza de datos que indican la participación de la vía del complemento en la AD.

En las regiones dañadas de los cerebros de pacientes con PD, al igual que en otras enfermedades degenerativas del SNC, hay pruebas de inflamación caracterizada por reacción glial (especialmente microglías), así como también de aumento de expresión de antígenos HLA-DR, citocinas y componentes del complemento. Estas observaciones sugieren que los mecanismos del sistema inmunológico están implicados en la patogénesis del daño neuronal en PD. Los mecanismos celulares de lesión primaria en PD no han sido aclarados, sin embargo, es probable que las mutaciones de mitocondrias, el estrés oxidativo y la apoptosis cumplan una función. Asimismo, la inflamación iniciada por el daño neuronal en el cuerpo estriado y la sustancia negra en la PD pueden agravar el curso de la enfermedad. Estas observaciones indican que el tratamiento con fármacos inhibidores del complemento puede actuar para demorar la progresión de la PD (Czlonkowska, A., et al., *Med. Sci. Monit.* 5:165-177, 2002).

Se describe el tratamiento de trastornos o lesiones del sistema nervioso periférico (SNP) y/o el sistema nervioso central (SNC), tratando a un sujeto que padece dicho trastorno o lesión con una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico. Se cree que los trastornos y lesiones del SNC y del SNP que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque sin limitarse a ello, esclerosis múltiple (MS), miastenia grave (MG), enfermedad de Huntington (HD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), síndrome de Guillain Barre, reperfusión que le sigue a un accidente cerebrovascular, discos degenerativos, traumatismo cerebral, enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Alzheimer (AD), síndrome de Miller-Fisher, traumatismo y/o hemorragia cerebral, desmielinación y, posiblemente, meningitis.

Para el tratamiento de afecciones del SNC y traumatismo cerebral, el agente inhibidor de MASP-2 se puede administrar al sujeto por administración intratecal, intracraneal, intraventricular, intra-arterial, intravenosa, intramuscular, subcutánea u otra administración parenteral, y potencialmente por vía oral para inhibidores no peptidérgicos. Las afecciones del SNP y el traumatismo cerebral se pueden tratar por la ruta de administración sistémica o alternativamente por administración local al sitio de disfunción o traumatismo. La administración de las composiciones inhibitoras de MASP-2 de la presente invención se puede repetir periódicamente según lo determinado por un médico hasta lograr el alivio eficaz o el control de los síntomas.

Trastornos de la sangre

La septicemia es causada por una reacción agobiante del paciente a microorganismos invasores. Una función importante del sistema del complemento es orquestar la respuesta inflamatoria a bacterias y otros patógenos invasores. Coherente con esta función fisiológica, se ha demostrado en varios estudios que la activación del complemento tiene una función importante en la patogénesis de la septicemia (Bone, R. *CAnnals. Internal. Med.* 115:457-469, 1991). La definición de las manifestaciones clínicas de la septicemia está en constante evolución. La septicemia usualmente se define como la respuesta sistémica del hospedante a una infección. No obstante, en

muchas ocasiones, no se hayan signos clínicos de infección (p. ej., cultivos positivos de sangre bacteriana) en pacientes con síntomas septicémicos. Esta discrepancia fue tomada en cuenta por primera vez en una Conferencia de Consenso en 1992 cuando se estableció la expresión "síndrome de respuesta inflamatoria sistémica" (SIRS), y para el cual no fue necesaria la presencia definible de infección bacteriana (Bone, R.C., et al., *Crit. Care Med.* 20:724-726, 1992). Existe ahora un consenso general de que la septicemia y el SIRS van acompañados de la incapacidad de regular la respuesta inflamatoria. Para los propósitos de esta breve reseña, consideraremos la definición clínica de septicemia para que también incluya septicemia grave, choque septicémico y SIRS.

La fuente predominante de infección en pacientes septicémicos antes de fines de los años ochenta eran las bacterias gramnegativas. Se sabía que el lipopolisacárido (LPS), el componente principal de la pared celular de bacterias gramnegativas, estimula la liberación de mediadores inflamatorios de diversos tipos de células y que induce síntomas infecciosos agudos cuando se inyecta en animales (Haeney, M.R., et al., *Antimicrobial Chemotherapy* 4i(Supl. A):41-6, 1998). Cabe destacar que el espectro de microorganismos responsables parece haberse desplazado de bacterias gramnegativas a fines de los años setenta y ochenta hacia bacterias predominantemente grampositivas en la actualidad, por motivos que actualmente no están claros (Martin, G.S., et al., *N. Eng. J. Med.* 348:1546-54, 2003).

Muchos estudios han demostrado la importancia de la activación del complemento para mediar la inflamación y contribuir a las características de choque, particularmente choque septicémico y hemorrágico. Ambos organismos gramnegativos y grampositivos comúnmente precipitan un choque septicémico. El LPS es un activador potente del complemento, predominantemente a través de la vía alternativa, aunque también ocurre la activación de la vía clásica mediada por anticuerpos (Fearon, D.T., et al., *N. Engl. J. Med.* 292:937-400, 1975). Los componentes principales de la pared de células grampositivas son el peptidoglicano y el ácido lipoteicoico, y ambos componentes son activadores potentes de la vía del complemento alternativa, aunque en presencia de anticuerpos específicos pueden también activar la vía del complemento clásica (Joiner, K.A., et al., *Ann. Rev. Immunol.* 2:461-2, 1984).

El sistema del complemento estaba inicialmente implicado en la patogénesis de septicemia cuando los investigadores observaron que las anafilatoxinas C3a y C5a median una diversidad de reacciones inflamatorias que también podrían ocurrir durante la septicemia. Estas anafilatoxinas suscitan la vasodilatación y un incremento en la permeabilidad microvascular, eventos que cumplen una función central en el choque septicémico (Schumacher, W.A., et al., *Agents Actions* 34:345-349, 1991). Además, las anafilatoxinas inducen broncoespasmo, liberación de histaminas de los mastocitos y agregación de plaquetas. Asimismo, ejercen numerosos efectos sobre los granulocitos, como quimiotaxis, agregación, adhesión, liberación de enzimas lisosomales, generación del anión superóxido tóxico y la formación de leucotrienos (Shin, H.S., et al., *Science* 162:361-363, 1968; Vogt, W., *Complement* 3:177-86, 1986). Se cree que estos efectos biológicos cumplen una función en el desarrollo de complicaciones de septicemia tales como choque o síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) (Hammerschmidt, D.E., et al., *Lancet* 7:947-949, 1980; Slotman, G.T., et al., *Surgery* 99:744-50, 1986). A su vez, los niveles elevados de la anafilatoxina C3a se asocian con un desenlace fatal en la septicemia (Hack, C.E., et al., *Am. J. Med.* 86:20-26, 1989). En algunos modelos animales de choque, ciertas cepas deficientes del complemento (p. ej., las deficientes de C5) son más resistentes a los efectos de las infusiones de LPS (Hseuh, W., et al., *Immunol.* 70:309-14, 1990).

Se ha demostrado que el bloqueo de la generación de C5a con anticuerpos durante el inicio de la septicemia en roedores mejora en gran medida la supervivencia (Czermak, B.J., et al., *Nat. Med.* 5:788-792, 1999). Se efectuaron hallazgos similares cuando se bloqueó el receptor de C5a (C5aR), o bien con anticuerpos o con un inhibidor de moléculas pequeñas (Huber-Lang, M.S., et al., *FASEB J.* 16:1567-74, 2002; Riedemann, N.C., et al., *J. Clin. Invest.* 110:101-8, 2002). Estudios experimentales iniciales en monos han sugerido que el bloqueo de anticuerpos con C5a atenuó el choque septicémico inducido por *E. coli* y síndrome de dificultad respiratoria aguda (Hangen, D.H., et al., *J. Surg. Res.* 46:195-9, 1989; Stevens, J.H., et al., *J. Clin. Invest.* 77:1812-16, 1986). En seres humanos con septicemia, el C5a se elevó y asoció con tasas de supervivencia significativamente reducidas junto con falla multiorgánica, en comparación con aquel de pacientes septicémicos menos graves y sobrevivientes (Nakae, H., et al., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 84: 189-95, 1994; Nakae, et al., *Surg. Today* 26:225-29, 1996; Bengtson, A., et al., *Arch. Surg.* 123:645-649, 1988). Los mecanismos mediante los cuales C5a ejerce sus efectos nocivos durante la septicemia todavía deben investigarse en más detalle, pero datos recientes sugieren que la generación de C5a durante la septicemia compromete significativamente las funciones inmunes innatas de los neutrófilos de la sangre (Huber-Lang, M.S., et al., *J. Immunol.* 169:3223-31, 2002), su capacidad de expresar un estallido respiratorio y su capacidad de generar citocinas (Riedemann, N.C., et al., *Immunity* 19:193-202, 2003). Además, la generación de C5a durante la septicemia parece tener efectos procoagulantes (Laudes, I.J., et al., *Am. J. Pathol.* 750:1867-75, 2002). La proteína moduladora del complemento CI INH también ha demostrado eficacia en modelos animales de septicemia y ARDS (Dickneite, G., *Behring Ins. Mitt.* 93:299-305, 1993).

La vía de lectinas puede también tener una función en la patogénesis de la septicemia. Se ha demostrado que la MBL se une a una gama de microorganismos clínicamente importantes, incluidas bacterias gramnegativas y grampositivas, y que activa la vía de lectinas (Neth, O., et al., *Infect. Immun.* 68:688, 2000). El ácido lipoteicoico (LTA) está cada vez más considerado como una contraparte grampositiva del LPS. Es un potente inmunoestimulante que induce la liberación de citocinas de fagocitos mononucleares y sangre completa (Morath, S. et al., *J. Exp. Med.* 795:1635, 2002; Morath, S. et al., *Infect. Immun.* 70:938, 2002). Recientemente se demostró que la L-ficolina se une

específicamente a LTA aislado de numerosas especies bacterianas grampositivas, incluida *Staphylococcus aureus*, y activa la vía de lectinas (Lynch, N.J., et al., *J. Immunol.* 772:1198-02, 2004). También se ha demostrado que la MBL se une al LTA de *Enterococcus spp* en donde la cadena de poliglicerofosfato se sustituye por grupos glucosilo), pero no al LTA de otras nueve especies, incluida *S. aureus* (Polotsky, V.Y., et al., *Infect. Immun.* 64:380, 1996).

- 5 Se describe un método para tratar la septicemia o una afección resultante de la septicemia, administrando una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que padece septicemia o una afección resultante de la septicemia, lo que incluye, aunque sin limitarse a ello, septicemia grave, choque septicémico, síndrome de dificultad respiratoria aguda resultante de septicemia y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Se proveen métodos relacionados para el
- 10 tratamiento de otros trastornos de la sangre, incluido choque hemorrágico, anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica trombótica autoinmune (TTP), síndrome urémico hemolítico (HUS) u otras afecciones destructivas de la médula/sangre, administrando una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que padece dicha afección. El agente inhibidor de MASP-2 se administra al sujeto por ruta sistémica, tal como por administración intra-arterial, intravenosa,
- 15 intramuscular, por inhalación (particularmente en el caso de ARDS), subcutánea u otra administración parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La composición del agente inhibidor de MASP-2 se puede combinar con uno o más agentes terapéuticos adicionales para combatir las secuelas de la septicemia y/o el choque. Para septicemia avanzada o choque o una afección resultante, la composición inhibidora de MASP-2 se puede administrar adecuadamente en una forma de dosificación de acción rápida, tal como administración intravenosa o intra-arterial de un bolo o una disolución que contenga la composición inhibidora de MASP-2. Se puede llevar a cabo la administración repetida según lo determinado por un médico hasta que la afección se resuelva.

Afecciones urogenitales

- 25 Se ha implicado al sistema del complemento en diversos trastornos urogenitales, incluida la enfermedad de vejiga dolorosa, enfermedad de vejiga, cistitis abacteriana crónica y cistitis intersticial (Holm-Bentzen, M., et al., *J. Urol.* 738:503-507, 1987), esterilidad (Cruz, et al., *Biol. Reprod.* 54:1217-1228, 1996), embarazo (Xu, C., et al., *Science* 287:498-507, 2000), tolerancia fetomaterna (Xu, C., et al., *Science* 287:498-507, 2000) y pre-eclampsia (Haeger, M., *Int. J. Gynecol. Obstet.* 43:113-127, 1993).

- 30 La enfermedad de vejiga dolorosa, enfermedad de vejiga sensible, cistitis abacteriana crónica y cistitis intersticial son afecciones que todavía no han sido correctamente definidas y de etiología y patogénesis desconocidas, y por lo tanto, no tienen ninguna terapia racional. Predominan las teorías patogénicas con respecto a los defectos del epitelio y/o la superficie mucosa que recubre la vejiga, y las teorías con respecto a alteraciones inmunológicas (Holm-Bentzen, M., et al., *J. Urol.* 738:503-507, 1987). Se ha descrito que se han estudiado las inmunoglobulinas (IgA, G, M), los componentes del complemento (C1q, C3, C4) y el inhibidor de Cl-esterasa de pacientes con cistitis
- 35 intersticial. Hubo una deficiencia altamente significativa de los niveles en suero del componente del complemento C4 (p menos de 0,001) y la inmunoglobulina G se elevó notablemente (p menos de 0,001). Este estudio indica la activación de la vía clásica del sistema del complemento y sustenta la posibilidad de un proceso inmunológico local crónico implicado en la patogénesis de la enfermedad (Mattila, J., et al., *Eur. Urol.* 9:350-352, 1983). A su vez, después de la unión a autoanticuerpos en la mucosa de la vejiga, la activación del complemento podría implicarse en
- 40 la producción de lesión al tejido y en la inflamación autoprolongada y crónica típica de esta enfermedad (Helin, H., et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 43:88-96, 1987).

- Además de la función del complemento en las enfermedades inflamatorias urogenitales, las funciones reproductoras pueden verse impactadas por la regulación local de la vía del complemento. Los inhibidores del complemento naturales han evolucionado para proveer células hospedantes con la protección que necesitan para controlar el
- 45 sistema del complemento del organismo. CiTy, un inhibidor del complemento natural de roedores estructuralmente similar a los inhibidores del complemento humano, MCP y DAF, se ha investigado para delinear el control regulador del complemento en el desarrollo fetal. Cabe destacar que los intentos por generar ratones Crry^{-/-} no tuvieron éxito. En cambio, se descubrió que los ratones homocigotos CiTy^{-/-} murieron en el útero. Los embriones de Crry^{-/-} sobrevivieron hasta aproximadamente 10 días después del coito, y la supervivencia declinó rápidamente y se produjo la muerte como consecuencia de la detención del desarrollo. Hubo además una destacada invasión de células inflamatorias en el tejido placentario de los embriones Crry^{-/-}. En contraste, los embriones Crry^{+/+} parecieron tener C3 depositado en la placenta. Esto sugiere que la activación del complemento había ocurrido al nivel de la placenta, y en ausencia de regulación del complemento, los embriones murieron. Estudios confirmatorios investigaron la introducción de la mutación Crry en un contexto deficiente de C3. Esta estrategia de rescate fue
- 50 exitosa. Juntos, estos datos ilustran que la interface del complemento fetomaterno debe regularse. Alteraciones sutiles en la regulación del complemento dentro de la placenta podrían contribuir a una disfunción placentaria y a aborto espontáneo (Xu, C., et al., *Science* 287:498-507, 2000).

- La pre-eclampsia es un trastorno hipertensivo inducido por el embarazo en el que se ha implicado a la activación del sistema del complemento, aunque esto sigue siendo controversial (Haeger, M., *Int. J. Gynecol. Obstet.* 43:113-127, 1993). La activación del complemento en la circulación sistémica está estrechamente relacionada con la enfermedad establecida en pre-eclampsia, pero no se observaron elevaciones antes de la presencia de los síntomas clínicos y,

en consecuencia, los componentes del complemento no pueden emplearse como indicadores de pre-eclampsia (Haeger, et al., *Obstet. Gynecol.* 78:46, 1991). No obstante, el aumento de la activación del complemento en el entorno local del lecho placentario podría superar mecanismos de control locales, resultando en niveles elevados de anafilatoxinas y C5b-9 (Haeger, et al., *Obstet. Gynecol.* 73:551, 1989).

- 5 Un mecanismo propuesto de esterilidad relacionada con anticuerpos antiesperma (ASA) es a través de la función de la activación del complemento en el aparato genital. La generación de C3b y opsonina iC3b, que pueden potenciar la unión del esperma por células fagocíticas mediante sus receptores del complemento así como también la formación del complejo C5b-9 terminal en la superficie del esperma, reduciendo así la movilidad del esperma, son causas potenciales asociadas con reducción de la fertilidad. Los niveles elevados de C5b-9 también se han demostrado en fluido folicular ovárico de mujeres estériles (D'Cruz, O.J., et al., *J. Immunol.* 744:3841-3848, 1990). Otros estudios han demostrado el deterioro en la migración de esperma e interacciones reducidas entre espermatozoides/ovarios, lo que puede estar asociado al complemento (D'Cruz, O.J., et al., *J. Immunol* 146:611-620, 1991; Alexander, N.J., *Fertil. Steril.* 47:433-439, 1984). Finalmente, estudios con sCRI demostraron un efecto protector contra lesión mediada por el complemento y ASA para esperma humano (D'Cruz, O.J., et al., *Biol. Reprod.* 54:1217-1228, 1996).
 10 Estos datos proporcionan varias líneas de evidencia para el uso de inhibidores del complemento en el tratamiento de enfermedades y trastornos urogenitales.
 15

Se describe un método para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un paciente que padece un trastorno urogenital, administrando una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que padece dicho trastorno. Se cree que los trastornos urogenitales que están sujetos al tratamiento terapéutico con los métodos y composiciones de la presente invención incluyen, a modo de ejemplo no limitativo, enfermedad de vejiga dolorosa, enfermedad de vejiga sensible, cistitis abacteriana crónica y cistitis intersticial, esterilidad masculina y femenina, disfunción placentaria y aborto espontáneo y pre-eclampsia. El agente inhibidor de MASP-2 se puede administrar al sujeto por la ruta sistémica, tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, por inhalación, subcutánea u otra administración parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos.
 20 Alternativamente, la composición inhibidora de MASP-2 puede administrarse localmente al aparato urogenital, tal como por irrigación o instilación intravesical con una disolución líquida o composición en gel. Se puede llevar a cabo la administración repetida según lo determinado por un médico para controlar o resolver la afección.
 25

Diabetes y afecciones crónicas

- 30 La micronangiopatía retiniana diabética se caracteriza por un aumento de la permeabilidad, leucostasis, micro trombosis y apoptosis de las células capilares, que pueden ser todas causadas o promovidas por la activación del complemento. Las estructuras glomerulares y los microvasos endoneuriales de pacientes con diabetes exhiben signos de activación del complemento. La reducción de la disponibilidad o efectividad de inhibidores de del complemento en la diabetes ha sido sugerida por los hallazgos de que un alto contenido de glucosa *in vitro* reduce selectivamente en la superficie de las células endoteliales, la expresión de CD55 y CD59, los dos inhibidores que son proteínas de la membrana anclada a glucosilfosfatidilinositol (GPI), y de que CD59 se somete a glucación no enzimática que obstaculiza su función inhibidora del complemento.
 35

Los estudios de Zhang et al. (*Diabetes* 51:3499-3504, 2002), investigaron la activación del complemento como un rasgo de la retinopatía diabética no proliferativa humana y su asociación con cambios en las moléculas inhibidoras. Se descubrió que la deposición de C5b-9, el producto terminal de activación del complemento, ocurre en la pared de los vasos retinianos de donantes de ojo humano con diabetes de tipo 2, pero no en los vasos de donantes no diabéticos de la misma edad. C11 y C4, los componentes del complemento únicos para la vía clásica, no se detectaron en las retinas diabéticas, lo que indica que C5b-9 se generó mediante la vía alternativa. Los donantes diabéticos demostraron una reducción prominente en los niveles retinianos de CD55 y CD59, los dos inhibidores del complemento vinculados a la membrana plasmática por anclajes de GPI. Se observó activación del complemento similar en vasos retinianos, así como también reducción selectiva en los niveles de CD55 y CD59 retinianos, en ratas con una duración de 10 semanas de diabetes inducida por estreptozotocina. Por consiguiente la diabetes parece causar regulación defectuosa de los inhibidores de la regulación del complemento y activación del complemento que preceden a la mayoría de las otras manifestaciones de microangiopatía retiniana diabética.
 40
 45

- 50 Gerl et al. (*Investigative Ophthalmology and Visual Science* 43:1104-08, 2000) determinaron la presencia de componentes del complemento activados en los ojos afectados por retinopatía diabética. Estudios de inmunohistoquímica hallaron amplios depósitos de complejos C5b-9 del complemento, que fueron detectados en los coriocabilares inmediatamente subyacentes a la membrana de Bruch y rodeando densamente los capilares en las 50 muestras de retinopatía diabética. La tinción para C3d se correlacionó positivamente con la tinción de C5b-9, lo cual es indicativo de que la activación del complemento había ocurrido *in situ*. Asimismo, se detectó tinción positiva para vitronectina, que forma complejos estables con C5b-9 extracelular. En cambio, no hubo tinción positiva para la proteína reactiva C (CRP), lectina de unión a manano (MBL), C1q o C4, indicando que la activación del complemento no ocurrió a través de una vía dependiente de C4. Por lo tanto, la presencia de C3d, C5b-9 y vitronectina indica que la activación del complemento tiene lugar hasta concretarse, posiblemente a través de la vía alternativa en los coriocabilares de los ojos afectados por la retinopatía diabética.
 55
 60

La activación del complemento puede ser un factor causal en las secuelas patológicas que puede contribuir a la enfermedad del tejido ocular y al deterioro visual. Por consiguiente, el uso de un inhibidor del complemento puede ser una terapia eficaz para reducir o bloquear el daño a los microvasos que tiene lugar en la diabetes.

5 La diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM, también denominada diabetes de tipo I) es una enfermedad autoinmune asociada con la presencia de diferente tipos de autoanticuerpos (Nicoloff et al., *Clin. Dev. Immunol.* 11:61-66, 2004). La presencia de estos anticuerpos y de los antígenos correspondientes en la circulación provoca la formación de complejos inmunes circulantes (CIC), que se conocen por persistir en la sangre por periodos de tiempo prolongados. La deposición de CIC en los vasos sanguíneos pequeños tiene el potencial de producir microangiopatía con consecuencias clínicas debilitantes. Existe una correlación entre los CIC y el desarrollo de complicaciones microvasculares en niños diabéticos. Estos hallazgos sugieren que los niveles elevados de IgG de CIC se asocian con el desarrollo de nefropatía diabética temprana y que un inhibidor de la vía del complemento podría ser eficaz para bloquear la nefropatía diabética (Kotnik, et al., *Croat. Med. J.* 44:707-11, 2003). A su vez, la formación de proteínas del complemento en dirección 3' y el compromiso de la vía alternativa probablemente sean factores que contribuyan a la función general de los islotes en IDDM, y se espera el uso de un inhibidor del complemento para reducir el daño potencial o limitar la muerte celular (Caraher, et al., *J. Endocrinol.* 162:143-53, 1999).

Las concentraciones de MBL circulantes son significativamente elevadas en pacientes con diabetes de tipo 1 en comparaciones con controles sanos, y estas concentraciones de MBL se correlacionan positivamente con la excreción de albúmina urinaria (Hansen et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:4857-61, 2003). Un estudio clínico reciente reveló que las frecuencias de genotipos de MBL de alta y baja expresión fueron similares entre pacientes con diabetes de tipo 1 y controles sanos (Hansen et al., *Diabetes* 53:1570-76, 2004). No obstante, el riesgo de tener nefropatía entre los pacientes con diabetes aumentaba significativamente si tenían un alto genotipo de MBL. Esto indica que los niveles de MBL y la activación de la vía de lectinas del complemento pueden contribuir al desarrollo de nefropatía diabética. Esta conclusión es avalada por un estudio prospectivo reciente en el que se examinó la asociación entre los niveles de MBL y el desarrollo de albuminuria en una cohorte de pacientes diabéticos de tipo 1 recién diagnosticados (Hovind et al., *Diabetes* 54:1523-27, 2005). Hallaron que los altos niveles de MBL tempranos en el curso de la diabetes de tipo 1 estuvieron significativamente asociados con el desarrollo posterior de albuminuria persistente. Estos resultados sugieren que la MBL y la ruta de lectinas pueden estar implicadas en la patogénesis específica de complicaciones vasculares diabéticas más que meramente causar una aceleración de las alteraciones existentes. En un estudio clínico reciente (Hansen et al., *Arch. Intern. Med.* 755:2007-13, 2006), se midieron los niveles de MBL iniciales en una cohorte bien caracterizada de pacientes con diabetes de tipo 2 que recibieron más de 15 años de seguimiento. Hallaron que incluso después del ajuste de factores de confusión conocidos, el riesgo de muerte fue significativamente mayor con altos niveles en plasma de MBL (>1000 µg/l) que entre pacientes con bajos niveles de MBL (<1000 µg/l).

35 Se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece diabetes no obesa (IDDM) o complicaciones de IDDM o diabetes del adulto (tipo 2) por angiopatía, neuropatía o retinopatía, administrando una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico. El agente inhibidor de MASP-2 se puede administrar al sujeto por la ruta sistémica, tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, subcutánea u otra administración parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. Alternativamente, la administración puede ser local al sitio de los síntomas angiopáticos, neuropáticos o retinopáticos. El agente inhibidor de MASP-2 se puede administrar periódicamente por un periodo de tiempo extenso para el tratamiento o el control de una afección crónica, o por administración única o una serie de administraciones para el tratamiento de una afección aguda.

45 Administración periquimioterapéutica y tratamiento de malignidades

La activación del sistema del complemento puede estar implicada en la patogénesis de malignidades. Recientemente, los neoantígenos del complejo del complemento C5b-9, IgG, C3, C4, S-proteína/vitronectina, fibronectina y macrófagos se localizaron en 17 muestras de cáncer de mama y en 6 muestras de tumores de mama benignos, usando anticuerpos policlonales o monoclonales y la técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa. Todas las muestras de tejido con carcinoma en cada una de las etapas TNM presentaron depósitos de C5b-9 en las membranas de las células tumorales, gránulos delgados en restos celulares y depósitos difusos en las áreas necróticas (Niculescu, F., et al., *Am. J. Pathol.* 140:1039-1043, 1992).

Además, la activación del complemento puede ser una consecuencia de la quimioterapia o la radioterapia y entonces la inhibición de la activación del complemento sería útil como auxiliar al tratamiento de malignidades a fin de reducir la inflamación iatrogénica. Cuando la quimioterapia y la radioterapia precedieron a la cirugía, los depósitos de C5b-9 fueron más intensos y extendidos. Los depósitos de C5b-9 estuvieron ausentes en todas las muestras con lesiones benignas. S-proteína/vitronectina estuvo presente como depósitos fibrilares en la matriz del tejido conjuntivo y como depósitos difusos alrededor de las células tumorales, con menos intensidad y extensión que la fibronectina. Los depósitos de IgG, C3 y C4 estuvieron presentes solamente en muestras de carcinoma. La presencia de depósitos de C5b-9 es indicativa de la activación del complemento y sus efectos patogenéticos subsiguientes en cáncer de mama (Niculescu, F., et al., *Am. J. Pathol.* 740:1039-1043, 1992).

La terapia con láser pulsado de colorante sintonizable (577 nm) (PTDL) induce la coagulación de hemoglobina y la necrosis del tejido, que está principalmente limitada a los vasos sanguíneos. En un estudio de piel normal irradiada con PTDL, los hallazgos principales fueron los siguientes: 1) fragmentos de C3, C8, C9 y MAC se depositaron en las paredes de los vasos; 2) estos depósitos no se debieron a la desnaturalización de las proteínas, ya que se volvieron notables solo 7 min después de la irradiación, contrariamente con la deposición inmediata de transferrina en los sitios de coagulación de eritrocitos; 3) se demostró que los depósitos de C3 amplían la activación del complemento por la vía alternativa, una reacción que fue específica, dado que la necrosis de tejido propiamente dicha no produjo dicha ampliación; y 4) estas reacciones precedieron a la acumulación local de leucocitos polimorfonucleares. La necrosis del tejido fue más pronunciada en los hemangiomas. Los vasos angiomasos más grandes en el centro de la necrosis no se fijaron al complemento significativamente. En contraste, la deposición del complemento en los vasos situados en la periferia fue similar a aquella observada en piel normal con una excepción: C8, C9 y MAC se detectaron en algunos vasos sanguíneos después del tratamiento con láser, un hallazgo coherente con el conjunto de MAC que ocurre directamente sin la formación de una convertasa C5. Estos resultados indican que el complemento se activa en la necrosis vascular inducida por PTDL, y podría ser responsable de la respuesta inflamatoria resultante.

La terapia fotodinámica (PDT) de los tumores produce una fuerte respuesta inmune del hospedante, y una de sus manifestaciones es una pronunciada neutrofilia. Además de los fragmentos del complemento (mediadores directos) liberados como consecuencia de la activación del complemento inducida por PDT, hay por lo menos una docena de mediadores secundarios que surgen como consecuencia de la actividad complementaria. Estos últimos incluyen citocinas IL-beta, TNF-alfa, IL-6, IL-10, G-CSF y KC, tromboxano, prostaglandinas, leucotrienos, histamina y factores de coagulación (Cecic, I., et al., *Cancer Lett.* 783:43-51, 2002).

Finalmente, el uso de inhibidores de la activación del complemento dependiente de MASP-2 puede contemplarse en conjunto con el esquema terapéutico estándar para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, el tratamiento con rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20 monoclonal quimérico, puede asociarse con efectos colaterales moderados a intensos en la primera dosis, notablemente en pacientes con altos números de células tumorales circulantes. Estudios recientes durante la primera infusión de rituximab midieron los productos de activación del complemento (C3b/c y C4b/c) y las citocinas (factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina 6 (IL-6) e IL-8) en cinco pacientes con recidiva de linfoma no Hodgkin (NHL) de bajo grado. La infusión de rituximab indujo la rápida activación del complemento, precediendo a la liberación de TNF-alfa, IL-6 e IL-8. Si bien el grupo de estudio fue pequeño, el nivel de activación del complemento pareció correlacionarse tanto con el número de células B circulantes antes de la infusión ($r = 0,85$; $P = 0,07$), como con la intensidad de los efectos colaterales. Los resultados indicaron que el complemento cumple una función fundamental en la patogénesis de los efectos colaterales del tratamiento con rituximab. Dado que la activación del complemento no puede prevenirse con corticoesteroides, puede ser relevante estudiar la posible función de los inhibidores del complemento durante la primera administración de rituximab (van der Kolk, L.E., et al., *Br. J. Haematol.* 775:807-811, 2001).

Se describen métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que está siendo tratado con agentes quimioterapéuticos y/o radioterapia, incluido sin limitación para el tratamiento de afecciones cancerosas. Este método incluye administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un paciente en forma periquimioterapéutica, es decir, antes y/o durante y/o después de la administración de agente(s) quimioterapéutico(s) y/o radioterapia. Por ejemplo, la administración de una composición del inhibidor de MASP-2 de la presente invención puede comenzar antes o en forma concomitante con la administración de quimio o radioterapia, y continuar durante el transcurso de la terapia para reducir los efectos perjudiciales de la quimio y/o radioterapia en los tejidos sanos no dirigidos. A su vez, la composición del inhibidor de MASP-2 puede administrarse después de la quimio y/o radioterapia. Se ha de entender que los esquemas de quimio y radioterapia a menudo comprenden tratamientos repetidos y, por lo tanto, es posible que la administración de una composición con el inhibidor de MASP-2 también deba repetirse y coincidir relativamente con los tratamientos quimioterapéuticos y de radiación. Se cree también que los agentes inhibidores de MASP-2 se pueden usar como agentes quimioterapéuticos, solos o combinados con otros agentes quimioterapéuticos y/o radioterapia, para tratar a pacientes que presentan malignidades. La administración se puede realizar adecuadamente por vía oral (para no peptidérgicos), intravenosa, intramuscular u otra ruta parenteral.

Trastornos endocrinos

El sistema del complemento también ha sido recientemente asociado con algunas afecciones o trastornos endocrinos, incluida tiroiditis de Hashimoto (Blanchin, S., et al., *Exp. Eye Res.* 73(6):887-96, 2001), estrés, ansiedad y otros trastornos hormonales potenciales que implican la liberación regulada de prolactina, el factor de crecimiento o el factor de crecimiento de tipo insulina y adrenocorticotropina de la glándula hipófisis (Francis, K., et al., *FASEB J.* 17:2266-2268, 2003; Hansen, T.K., *Endocrinology* 144(12):5422-9, 2003).

Existe una comunicación bidireccional entre los sistemas endocrino e inmunológico, usando moléculas tales como las hormonas y las citocinas. Recientemente, se dilucidó una nueva vía mediante la cual C3a, una citocina derivada del complemento, estimula la liberación de la hormona pituitaria anterior y activa el eje adrenérgico pituitario hipotalámico, un reflejo central a la respuesta de estrés y al control de la inflamación. Los receptores de C3a se

expresan en las células que segregan la hormona pituitaria y células que no segregan hormonas (folículoestrelladas). C3a y C3adesArg (un metabolito no inflamatorio) estimulan cultivos de células pituitarias para liberar prolactina, hormona del crecimiento y adrenocorticotropina. Los niveles en el suero de estas hormonas, junto con la corticosterona adrenérgica, aumentan en un modo dependiente de la dosis con la administración de C3a y C3adesArg recombinante *in vivo*. La implicancia es que la vía del complemento modula respuestas inflamatorias específicas del tejido y sistémicas a través de la comunicación con la glándula hipófisis endocrina (Francis, K., et al., *FASEB J.* 17:2266-2268, 2003).

Un número de estudios cada vez mayor en animales y seres humanos indican que la hormona del crecimiento (GH) y el factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-I) modulan la función inmune. La terapia de la GH aumentó la mortalidad en pacientes muy enfermos. La mortalidad excesiva se debió prácticamente en su totalidad a choque septicémico o falla multiorgánica, lo que podría sugerir que estuvieron implicadas una modulación inducida por GH y la función del complemento. La lectina de unión a manano (MBL) es una proteína del plasma que cumple una función importante en la inmunidad innata a través de la activación de la cascada del complemento y la inflamación después de la unión a estructuras de carbohidratos. La evidencia avala una influencia importante de la hormona del crecimiento sobre los niveles de MBL y por lo tanto, potencialmente sobre la activación del complemento dependiente de lectinas (Hansen, T.K., *Endocrinology* 144(12):5422-9, 2003).

La tiroperoxidasa (TPO) es uno de los autoantígenos principales implicados en las enfermedades tiroideas autoinmunes. La TPO consiste en un gran módulo de tipo mieloperoxidasa N-terminal seguido de un módulo de tipo proteína de control del complemento (CCP) y un módulo de tipo factor de crecimiento epidérmico. El módulo CCP es un constituyente de las moléculas implicadas en la activación del componente del complemento C4, y se efectuaron estudios para investigar si C4 puede unirse a TPO y activar la vía del complemento en afecciones autoinmunes. La TPO, mediante su módulo CCP, activa directamente el complemento sin ninguna mediación por Ig. Asimismo, en pacientes con tiroiditis de Hashimoto, los tirocitos sobreexpresan C4 y todos los componentes en dirección 3' de la vía del complemento. Estos resultados indican que la TPO, junto con otros mecanismos relacionados con la activación de la vía del complemento, pueden contribuir a la destrucción de células masiva observada en la tiroiditis de Hashimoto (Blanchin, S., et al., 2001).

Se describe un método para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 para tratar un trastorno endocrino, administrando una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que padece un trastorno endocrino. Las afecciones sujetas al tratamiento de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque sin limitarse a ello, tiroiditis de Hashimoto, estrés, ansiedad y otros trastornos hormonales potenciales que implican la liberación desregulada de prolactina, factor de crecimiento o de crecimiento de tipo insulina y adrenocorticotropina de la glándula hipófisis. El agente inhibidor de MAS-2 se puede administrar al sujeto en forma sistémica, tal como por administración intraarterial, intravenosa, intramuscular, por inhalación, nasal, subcutánea u otra administración parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La composición del agente inhibidor de MASP-2 se puede combinar con uno o más agentes terapéuticos adicionales. La administración se puede repetir según lo determinado por un médico hasta que la afección se haya resuelto.

Afecciones oftalmológicas

La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una enfermedad de ceguera que afecta a millones de adultos, aun así, las secuelas de los eventos bioquímicos, celulares y/o moleculares que llevan al desarrollo de la AMD no se entienden del todo. La AMD provoca la destrucción progresiva de la mácula que se ha correlacionado con la formación de depósitos extracelulares llamados drusas que están situados en y alrededor de la mácula, detrás de la retina y entre el epitelio pigmentario retiniano (RPE) y la coroides. Estudios recientes han revelado que las proteínas asociadas con inflamación y procesos inmunes son prevalentes entre los constituyentes asociados a las drusas. Se han detectado transcripciones que codifican un número de estas moléculas en células retinianas, de RPE y coroides. Estos datos también demuestran que las células dendríticas, que son potentes células presentadoras de antígenos, están íntimamente asociadas con el desarrollo de drusas, y que la activación del complemento es una vía clave que está activa tanto dentro de las drusas como a lo largo de la interface de la coroides del RPE (Hageman, G.S., et al., *Prog. Retin. Eye Res.*, 20:705-732, 2001).

Varios estudios independientes han demostrado una fuerte asociación entre la AMD y un polimorfismo genético en el gen para el factor del complemento H (CFH) en el que la probabilidad de AMD aumenta con un factor de 7,4 en individuos homocigotos para el alelo de riesgo (Klein, R.J. et al., *Science*, 308:362-364, 2005; Haines et al., *Science* 308:362-364, 2005; Edwards et al., *Science* 308:263-264, 2005). El gen de CFH ha sido mapeado al cromosoma 1q31, una región que había sido implicada en la AMD por seis exploraciones de enlaces (véase, p. ej., D.W. Schultz et al., *Hum. Mol. Genet.* 12:3315, 2003). Se sabe que el CFH es un regulador clave del sistema del complemento. Se ha demostrado que el CFH en las células y en la circulación regula la actividad del complemento inhibiendo la activación de C3 a C3a y C3b, e inactivando el C3b existente. Se ha observado la deposición de C5b-9 en la membrana de Brush, en los pilares intercapilares y dentro de las drusas en pacientes con AMD (Klein et al.). Los experimentos de inmunofluorescencia sugieren que en AMD, el polimorfismo de CFH puede dar origen a la deposición del complemento en capilares de coroides y vasos de coroides (Klein et al.).

El inhibidor del complemento asociado a la membrana, el receptor del complemento 1, también está localizado en las drusas, pero no se detecta en las células de RPE en inmunohistoquímica. En contraste, un segundo inhibidor del complemento asociado a la membrana, la proteína del cofactor de la membrana, está presente en células de RPE asociadas a drusas, así como también en elementos subestructurales pequeños y esféricos dentro de las drusas. Estos elementos previamente no identificados demuestran una fuerte inmunorreactividad para los fragmentos proteolíticos del componente del complemento C3 que están característicamente depositados en sitios de activación del complemento. Se propone que estas estructuras representan sedimentos residuales de células de RPE degenerantes que son dianas de ataque al complemento (Johnson, L.V., et al., *Exp. Eye Res.* 73:887-896, 2001).

La identificación y localización de estos múltiples reguladores del complemento, así como también los productos de activación del complemento (C3a, C5a, C3b, C5b-9) han llevado a los investigadores a concluir que la activación crónica del complemento cumple una función importante en el proceso de biogénesis de las drusas y en la etiología de la AMD (Hageman et al., *Progress Retinal Eye Res.* 20:705-32, 2001). La identificación de los productos de activación C3 y C5 en las drusas no proporciona conocimientos acerca de si el complemento es activado por la vía clásica, la vía de lectinas o el bucle de ampliación alternativo, como se entiende con la presente invención, dado que C3 y C5 son comunes a las tres. No obstante, dos estudios han buscado el inmunoetiquetado de drusas usando anticuerpos específicos para C1q, el componente de reconocimiento esencial para activación de la vía clásica (Mullins et al., *FASEB J.* 14:835-846, 2000; Johnson et al., *Exp. Eye Res.* 70:441-449, 2000). Ambos estudios concluyeron que el inmunoetiquetado de C1q en drusas en general no se observó. Estos resultados negativos con C1q sugieren que la activación del complemento en drusas no ocurre mediante la vía clásica. Además, el inmunoetiquetado de drusas para constituyentes del complejo inmune (cadenas ligeras de IgG, IgM) se describe en el estudio de Mullins et al., 2000 como débil a variable, lo que indica que la vía clásica cumple una función menor en la activación del complemento que ocurre en este proceso de enfermedad.

Dos estudios recientemente publicados han evaluado la función del complemento en el desarrollo de neovascularización de coroides inducida por láser (CNV) en ratones, un modelo de CNV humana. Usando métodos inmunohistológicos, Bora y colegas (2005) hallaron una deposición importante de los productos de activación del complemento C3b y C5b-9 (MAC) en el complejo neovascular después del tratamiento con láser (Bora et al., *J. Immunol.* 774:491-7, 2005). Cabe destacar que la CNV no se desarrolló en ratones genéticamente deficientes de C3 (ratones C3^{-/-}), el componente esencial requerido en las tres vías de activación del complemento. Los niveles de mensaje de ARN para VEGF, TGF- β_2 y β -FGF, tres factores angiogénicos implicados en CNV, estuvieron elevados en el tejido ocular de los ratones después de la CNV inducida por láser. Significativamente, la carencia del complemento resultó en una marcada reducción en los niveles de ARN de estos factores angiogénicos.

Usando métodos ELISA, Nozaki y colegas demostraron que las anafilatoxinas potentes C3a y C5a se generan temprano en el curso de la CNV inducida por láser (Nozaki et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 703:2328-33, 2006). Asimismo, estos dos fragmentos bioactivos de C3 y C5 indujeron la expresión de VEGF después de la inyección intravítrea en ratones de tipo salvaje. Coherentes con estos resultados, Nozaki y colegas también demostraron que la ablación genética de receptores para C3a y C5a reduce la expresión de VEGF y la formación de CNV después de la lesión con láser, y que la neutralización mediada por anticuerpos de C3a o C5a, o el bloqueo farmacológico de sus receptores, también induce CNV. Estudios anteriores han establecido que la captación de leucocitos, y macrófagos en particular, cumple una función esencial en la CNV inducida por láser (Sakurai et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:3578-85, 2003; Espinosa-Heidmann, et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:3586-92, 2003). En su trabajo de 2006, Nozaki y colegas informan que la captación de leucocitos se reduce notablemente en ratones C3aR^{-/-} y C5aR^{-/-} después de la lesión con láser.

Se describe un método para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 para tratar la degeneración macular relacionada con la edad u otra afección oftalmológica mediada por el complemento, administrando una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que padece dicha afección u otra afección oftalmológica mediada por el complemento. La composición inhibidora de MASP-2 se puede administrar localmente al ojo, tal como por irrigación o aplicación de la composición en la forma de un gel, bálsamo o gotas. Alternativamente, el agente inhibidor de MASP-2 se puede administrar al sujeto en forma sistémica, tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, por inhalación, nasal, subcutánea u otra administración parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La composición del agente inhibidor de MASP-2 se puede combinar con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como aquellos descritos en la publicación de solicitud de patente estadounidense núm. 2004-0072809-A1. La administración se puede repetir según lo determinado por un médico hasta que la afección se haya resuelto o haya sido controlada.

IV. Agentes inhibidores de MASP-2

Se describen en la presente invención métodos para inhibir los efectos de la activación del complemento dependiente de MASP-2. Los agentes inhibidores de MASP-2 se administran en una cantidad eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto vivo. Los agentes inhibidores de MASP-2 representativos incluyen moléculas que inhiben la actividad biológica de MASP-2 (tal como los inhibidores de moléculas pequeñas, anticuerpos anti-MASP-2 o péptidos bloqueantes que interactúan con MASP-2 o interfieren con una interacción proteína-proteína) y moléculas que reducen la expresión de MASP-2 (tales como las moléculas de

ácido nucleico antisentido de MASP-2, moléculas de ARNi específicas de MASP-2 y ribozimas de MASP-2), previniendo así que la MASP-2 active las vías del complemento alternativas. Los agentes inhibidores de MASP-2 se pueden usar solos como terapia primaria o combinados con otros agentes terapéuticos como terapia adyuvante para potenciar los beneficios terapéuticos de otros tratamientos médicos.

5 La inhibición de la activación del complemento dependiente de MASP-2 se caracteriza por al menos uno de los siguientes cambios en un complemento del sistema del complemento que ocurre como resultado de la administración de un agente inhibidor de MASP-2 de acuerdo con los métodos de la invención: la inhibición de la generación o producción de productos del sistema de activación del complemento dependientes de MASP-2 C4b, C3a, C5a y/o C5b-9 (MAC) (medida, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2), la reducción de la activación del complemento alternativa evaluada en un ensayo hemolítico que emplea glóbulos rojos de conejo o cobaya insensibilizados, la reducción de escisión de C4 y deposición de C4b (medida, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2) o la reducción de la escisión de C3 y la deposición de C3b (medida, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2).

15 Se utilizan agentes inhibidores de MASP-2 que son eficaces para inhibir el sistema de activación del complemento dependiente de MASP-2. Los agentes inhibidores de MASP-2 útiles en la práctica de la presente invención son anticuerpos anti-MASP-2 y sus fragmentos, péptidos inhibidores de MASP-2, moléculas pequeñas, receptores solubles de MASP-2, y también se describen los inhibidores de expresión. Los agentes inhibidores de MASP-2 pueden inhibir el sistema de activación del complemento dependiente de MASP-2 bloqueando la función biológica de la MASP-2. Por ejemplo, un agente inhibidor puede bloquear eficazmente las interacciones de una proteína MASP-2 a otra, interferir con la dimerización o el ensamblaje de MASP-2, bloquear la unión a Ca^{2+} , interferir con el sitio activo de serina proteasa MASP-2, o pueden reducir la expresión de la proteína MASP-2.

Los agentes inhibidores de MASP-2 inhiben selectivamente la activación del complemento de MASP-2, dejando funcionalmente intacto el sistema de activación del complemento dependiente de C1q.

25 Un agente inhibidor de MASP-2 útil en los métodos descritos en este documento es un agente inhibidor de MASP-2 específico que se une específicamente a un polipéptido que comprende la SEC ID NO:6 con una afinidad de por lo menos 10 veces más que otros antígenos del sistema del complemento. Un agente inhibidor de MASP-2 puede unirse específicamente a un polipéptido que comprende la SEC ID NO:6 con una afinidad de unión de por lo menos 100 veces más que otros antígenos en el sistema del complemento. La afinidad de unión del agente inhibidor de MASP-2 se puede determinar usando un ensayo de unión adecuado.

30 El polipéptido de MASP-2 exhibe una estructura molecular similar a MASP-1, MASP-3, y Clr y Cls, las proteasas del sistema del complemento Cl. La molécula de ADNc expuesta en la SEC ID NO:4 codifica un ejemplo representativo de MASP-2 (que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:5) y proporciona el polipéptido de MASP-2 humano con una secuencia líder (aa 1-15) que se escinde después de la segregación, resultando en la forma madura de MASP-2 humana (SEC ID NO:6). Como se muestra en la FIGURA 2, el gen *MASP 2* humano abarca doce exones. El ADNc de MASP-2 humano es codificado por los exones B, C, D, F, G, H, I, J, K y L. Un empalme alternativo produce la proteína de 20 kDa denominada proteína asociada a MBL 19 ("MAp19", también denominada "sMAP") (SEC ID NO:2), codificada por (SEC ID NO:1) que surge de los exones B, C, D y E, como se muestra en la FIGURA 2. La molécula de ADNc expuesta en la SEC ID NO:50 codifica la MASP-2 de murino (que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:51) y proporciona el polipéptido de MASP-2 murino con una secuencia líder que se escinde después de la segregación, resultando en la forma madura de MASP-2 murina (SEC ID NO:52). La molécula de ADNc expuesta en la SEC ID NO:53 codifica la MASP-2 de rata (que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:54) y proporciona el polipéptido MASP-2 de rata con una secuencia líder que se escinde después de la segregación, resultando en la forma madura de MASP-2 de rata (SEC ID NO:55).

45 Los expertos en la técnica reconocerán que las secuencias descrita en las SEC ID NO:4, SEC ID NO:50 y SEC ID NO:53 representan alelos sencillos de MASP-2 humana, murina y de rata, respectivamente, y que se espera que ocurran la variación alélica y el empalme alternativo. Las variantes alélicas de las secuencias de nucleótidos que se muestran en las SEC ID NO:4, SEC ID NO:50 y SEC ID NO:53, incluidas aquellas que contienen mutaciones silenciosas y en las que las mutaciones producen cambios en las secuencias de aminoácidos, se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Las variantes alélicas de la secuencia de MASP-2 se pueden clonar por sonda de ADNc o bibliotecas genómicas de distintos individuos de acuerdo con procedimientos estándar.

55 Los dominios de la proteína MASP-2 humana (SEC ID NO:6) se muestran en la FIGURA 3A e incluyen un dominio de la proteína morfogénica Clr/ClS/de erizo de mar Vegf/ósea N-terminal (CUB1) (aa 1-121 de SEC ID NO:6), un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico (aa 122-166), un segundo dominio CUB1 (aa 167-293), además de un tándem de dominios de proteínas de control del complemento y un dominio de serina proteasa. El empalme alternativo del gen *MASP 2* resultante en MAp19 que se muestra en la FIGURA 3B. MAp19 es una proteína no enzimática que contiene la región CUB1-EGF N-terminal de MASP-2 con cuatro residuos adicionales (EQSL) derivados del exón E, como se muestra en la FIGURA 2.

Se ha demostrado que varias proteínas se unen a, o interactúan con MASP-2 a través de interacciones de proteína a

proteína. Por ejemplo, se sabe que MASP-2 se une y forma complejos dependientes del Ca²⁺ con proteínas lectina MBL, H-ficolina y L-ficolina. Se ha demostrado que cada complejo MASP-2/lectina activa el complemento a través de la escisión dependiente de MASP-2 de las proteínas C4 y C2 (Ikeda, K., et al., *J. Biol. Chem.* 2(52:7451-7454, 1987; Matsushita, M. et al., *J. Exp. Med.* 775:1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 755:3502-3506, 2002). Los estudios han demostrado que los dominios CUBI-EGF de MASP-2 son esenciales para la asociación de MASP-2 con MBL (Thielens, N.M., et al., *J. Immunol.* 755:5068, 2001). Se ha demostrado también que los dominios CUB1EGFCUBII median la dimerización de MASP-2, que se requiere para la formación de un complejo activo de MBL (Wallis, R., et al., *J. Biol. Chem.* 275:30962-30969, 2000). En consecuencia, se pueden identificar agentes inhibidores de MASP-2 que se unen a o interfieren con la regiones diana de MASP-2 conocidas por ser importantes para la activación del complemento dependiente de MASP-2.

Anticuerpos anti-MASP-2

El agente inhibidor de MASP-2 para uso en la presente invención comprende un anticuerpo anti-MASP-2 que inhibe el sistema de activación del complemento dependiente de MASP-2. Los anticuerpos anti-MASP-2 útiles en este aspecto de la invención incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales o recombinantes derivados de cualquier mamífero que produzca anticuerpos y pueden ser fragmentos multiespecíficos, quiméricos, humanizados, anti-idiotipo y de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, fragmentos de Fv, fragmentos de scFv y anticuerpos monocatenarios como se describe en este documento.

Se han descrito varios anticuerpos anti-MASP-2 en la bibliografía, algunos de los cuales se mencionan a continuación en la TABLA 1. Estos anticuerpos anti-MASP-2 previamente descritos se pueden ensayar por su capacidad de inhibir el sistema de activación del complemento dependiente de MASP-2 usando los ensayos aquí descritos. Por ejemplo, se ha identificado que los anticuerpos anti rata MASP-2 Fab2 bloquean la activación del complemento dependiente de MASP-2, como se describe en más detalle en los Ejemplos 24 y 25 de la presente memoria. Una vez que se identifica un anticuerpo anti-MASP-2 que funciona como un agente inhibidor de MASP-2, se puede usar para producir anticuerpos anti-idiotipo y usarse para identificar otras moléculas de unión a MASP-2, como se describirá en más detalladamente a continuación.

Tabla 1: Anticuerpos específicos de MASP-2 de la bibliografía

ANTÍGENO	TIPO DE ANTICUERPO	REFERENCIA
MASP-2 recombinante	Policlonal de rata	Peterson, S.V., et al., <i>Mol. Immunol.</i> 37:803-811, 2000
Fragmento CCP1/2-SP (MoAb 8B5) recombinante humano	MoAb de rata (subclase IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., <i>J. of Immunol. Methods</i> 282:159-167, 2003
MAp19 (MoAb 6G12) recombinante humano (reacción cruzada con MASP-2)	MoAb de rata (subclase IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., <i>J. of Immunol. Methods</i> 282:159-167, 2003
hMASP-2	MoAb de ratón (S/P) MoAb de ratón (N-terminal)	Peterson, S.V., et al., <i>Mol. Immunol.</i> 35:409, Abril 1998
hMASP-2 (dominio CCP1-CCP2-SP)	MoAb: Nimoab101 de rata, producido por la línea celular de hibridoma 03050904 (ECACC)	WO 2004/106384
hMASP-2 (his marcado de longitud total)	MoAbs murino: NimoAb104, producido por la línea celular de hibridoma M0545YM035 (DSMZ) NimoAb108, producido por la línea celular de hibridoma M0545YM029 (DSMZ) NimoAb109 producido por la línea celular de hibridoma M0545YM046 (DSMZ)	WO 2004/106384

Anticuerpos anti-MASP-2 con función efectora reducida

Los anticuerpos anti-MASP-2 para uso pueden tener función efectora reducida para reducir la inflamación que puede surgir de la activación de la vía del complemento clásica. Se ha demostrado que la capacidad de las moléculas de IgG de desencadenar la vía del complemento clásica reside dentro de la porción Fc de la molécula (Duncan, A.R., et al., *Nature* 532:738-740 1988). Las moléculas IgG en las que la porción Fc de la molécula ha sido extraída por escisión enzimática están desprovistas de esta función efectora (véase Harlow, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988). Por consiguiente, los anticuerpos con función efectora reducida pueden generarse como consecuencia de la ausencia de la porción Fc de la molécula, teniendo una secuencia Fc genéticamente modificada que minimiza la función efectora, o siendo o bien el isotipo IgG2 o IgG4 humano.

Los anticuerpos con función efectora reducida pueden producirse por manipulación biológica molecular estándar de la porción Fc de las cadenas pesadas de IgG, como se describe en el Ejemplo 9 del presente documento y también en Jolliffe, et al., *hit! Rev. Immunol.* 10:241-250, 11993, y en Rodrigues, et al., *J. Immunol.* 151:6954-6961, 1998. Los anticuerpos con función efectora reducida también incluyen los isotipos IgG2 e IgG4 humanos que tienen la capacidad reducida de activar el complemento y/o interactuar con los receptores de Fc (Ravetch, J.V., et al., *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492, 1991; Isaacs, J.D., et al., *J. Immunol.* 748:3062-3071, 1992; van de Winkel, J.G., et al., *Immunol. Today* 74:215-221, 1993). Los anticuerpos humanizados o completamente humanos específicos de MASP-2 humana comprendidos por los isotipos IgG2 o IgG4 se pueden producir mediante uno de los diversos métodos conocidos por el experto en la técnica, como se describe en Vaughan, T.J., et al., *Nature Biotechnical* 7(5):535-539, 1998.

Producción de anticuerpos anti-MASP-2

Los anticuerpos anti-MASP-2 se pueden producir usando polipéptidos MASP-2 (p. je., MASP-2 de longitud total) o usando péptidos que portan el epítipo de MASP-2 antigénico (p. ej., una porción del polipéptido MASP-2). Los péptidos inmunogénicos pueden ser tan pequeños como de tan solo cinco residuos de aminoácidos. Por ejemplo, el polipéptido MASP-2, incluida la secuencia de aminoácidos completa de SEC ID NO:6, se pueden usar para inducir anticuerpos anti-MASP-2 útiles en el método de la invención. Dominios de MASP-2 particulares conocidos por estar implicados en las interacciones proteína-proteína, tal como los dominios CUBI y CUBIEGF, así como también la región que abarca el sitio activo de serina proteasa, se pueden expresar como polipéptidos recombinantes, como se describe en el Ejemplo 5, y usarse como antígenos. A su vez, los péptidos que comprenden una porción de por lo menos 6 aminoácidos del polipéptido MASP-2 (SEC ID NO:6) son también útiles para inducir anticuerpos MASP-2. Ejemplos adicionales de antígenos derivados de MASP-2 útiles para inducir los anticuerpos de MASP-2 se dan a conocer en la TABLA 2 a continuación. Los péptidos y polipéptidos MASP-2 utilizados para crear anticuerpos se pueden aislar como polipéptidos naturales o como péptidos recombinantes o sintéticos y como polipéptidos recombinantes catalíticamente inactivos, tal como MASP-2A, como se describe en más detalle en los Ejemplos 5-7. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, los anticuerpos anti-MASP-2 se obtienen usando una cepa de ratón transgénico, como se describe en los Ejemplos 8 y 9 como se describirá en detalle a continuación.

Los antígenos útiles para producir anticuerpos anti-MASP-2 también incluyen polipéptidos de fusión, tales como fusiones de MASP-2 o su porción con un polipéptido de inmunoglobulina o con proteína unida a maltosa. El inmunógeno del polipéptido puede ser una molécula de longitud total o su porción. Si la porción del polipéptido es de tipo hapteno, dicha porción puede unirse o enlazarse ventajosamente a un vehículo macromolecular (como una hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o toxoide de tétano) para inmunización.

Tabla 2: Antígenos derivados de MASP-2

SEC ID NO:	Secuencia de aminoácidos
SEC ID NO:6	Proteína MASP-2 humana
SEC ID NO:51	Proteína MASP-2 murina
SEC ID NO:8	Dominio CUBI de MASP-2 humana (aa 1-121 de SEC ID NO:6)
SEC ID NO:9	Dominios CUBIEGF de MASP-2 humana (aa 1-166 de SEC ID NO:6)
SEC ID NO: 10	Dominios CUBIEGFCUBII de MASP-2 humana (aa 1-293 de SEC IDNO:6)
SEC ID NO: 11	Dominio EGF de MASP-2 humana (aa 122-166 de SEC ID NO:6)
SEC ID NO: 12	Dominio serina proteasa de MASP-2 humana (aa 429-671 de SEC ID NO:6)
SEC ID NO: 13 GKDSCRGDAGGALVFL	Forma mutante inactivada de serina-proteasa (aa 610-625 de SEC ID NO:6 con Ser 618 mutado)

SEC ID NO: 14 TPLGPKWPEPVFGRL	Péptido CUBI humano
SEC ID NO: 15: TAPPGYRLRLYFTHFDLEL SHLCEYDFVKLSSGAKVL ATLCGQ	Péptido CUBI humano
SEC ID NO: 16: TFRSDYSN	Región de unión a MBL en el dominio CUBI humano
SEC ID NO: 17: FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF	Región de unión a MBL en el dominio CUBI humano
SEC ID NO: 18 IDECQVAPG	Péptido EGF
SEC ID NO: 19 ANMLCAGLES GGK DSCR GDSSGALY	Péptido del sitio activo serina-proteasa

Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales contra MASP-2 se pueden preparar inmunizando a un animal con el polipéptido MASP-2 o con su porción inmunogénica, usando métodos conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. Véase, por ejemplo, Green, et al., "Production of Polyclonal Antisera", en *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.), página 105, y como se describe en el Ejemplo 6. La inmunogenicidad de un polipéptido MASP-2 se puede incrementar a través del uso de un adyuvante, incluidos geles minerales, tales como hidróxido de aluminio o adyuvante de Freund (completo o incompleto), sustancias activas superficiales tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. Los anticuerpos policlonales típicamente se generan en animales tales como caballos, vacas, perros, pollos, ratas, ratones, conejos, cobayas, cabras u ovejas. Alternativamente, un anticuerpo anti-MASP-2 útil en la presente invención puede también derivar de un primate subhumano. Las técnicas generales para generar diagnóstica y terapéuticamente anticuerpos útiles en babuinos se pueden encontrar, por ejemplo, en Goldenberg et al., publicación de patente internacional núm. WO 91/11465, y en Losman, M.J., et al., *Int. J. Cancer* 46:310, 1990. Los sueros que contienen anticuerpos inmunológicamente activos se producen luego de la sangre de dichos animales inmunizados, usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

Anticuerpos monoclonales

En algunas realizaciones, el agente inhibidor de MASP-2 es un anticuerpo monoclonal anti-MASP-2. Los anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 son altamente específicos, dirigiéndose contra un solo epitopo de MASP-2. Tal como se emplea en la presente invención, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se interpretará que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos por líneas celulares continuas en cultivo, tal como el método del hibridoma descrito por Kohler, G., et al., *Nature* 256:495, 1975, o se pueden elaborar por métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., la patente de EE. UU. núm. 4.816.567 para Cabilly). Los anticuerpos monoclonales pueden también aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson, T., et al., *Nature* 352:624-628, 1991, y Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991. Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluidas IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquiera de sus subclases.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener inyectando a un mamífero adecuado (p. ej., un ratón BALB/c) una composición que comprende un polipéptido de MASP-2 o su porción. Después de un periodo de tiempo predeterminado, los esplenocitos se extraen del ratón y se suspenden en un medio de cultivo celular. Los esplenocitos luego se condensan con una línea celular inmortal para formar un hibridoma. Los hibridomas formados se desarrollan en cultivo celular y se estudian por su capacidad de producir anticuerpo monoclonal contra MASP-2. Un ejemplo que describe mejor la producción de anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 se provee en el Ejemplo 7. (Véase también *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1., John Wiley & Sons, páginas 2.5.1-2.6.7, 1991).

Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden obtener mediante el uso de ratones transgénicos que han sido modificados para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una exposición antigénica. En esta técnica, los elementos de locus de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana se introducen en cepas de ratones de líneas de células madre derivadas de embriones que contienen rupturas dirigidas de los locus de cadena pesada y de cadena ligera de la inmunoglobulina endógena. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, tales como los antígenos de MASP-2 descritos en este documento, y los ratones se pueden usar para producir hibridomas que segregan el anticuerpo de MASP-2 humano, condensando células B de dichos animales a líneas celulares adecuadas de mieloma usando tecnología de Kohler-Milstein convencional, como se describe en el Ejemplo 7. Los ratones transgénicos con un genoma de inmunoglobulina humana se comercializan (p. ej., de Abgenix, Inc., Fremont, CA y Medarex, Inc., Annandale, N.J.). Los métodos para obtener anticuerpos humanos de ratones transgénicos se describen, por ejemplo, en Green, L.L., et al., *Nature Genet.* 7:13, 1994; Lonberg, N., et al., *Nature* 368:856, 1994; y Taylor, L.D., et al., *Int. Immun.* 6:579, 1994.

Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar y purificar de cultivos de hibridoma mediante una diversidad de

técnicas bien consolidadas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con Proteína A Sepharose, cromatografía de exclusión de tamaño y cromatografía de intercambio iónico (véase, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y en las páginas 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en *Methods in Molecular Biology*, The Humana Press, Inc., Vol. 10, páginas 79-104, 1992).

- 5 Una vez producidos, los anticuerpos policlonales, monoclonales o derivados de fagos se ensayan primero por su unión a MASP-2 específica. Se puede utilizar una diversidad de ensayos conocidos por los expertos en la técnica para detectar anticuerpos que se unen específicamente a MASP-2. Los ensayos ilustrativos incluyen inmunotransferencia Western o análisis de inmunoprecipitación por métodos convencionales (p. ej., como se describe en Ausubel et al.), inmunoelectroforesis, ensayos inmunosorbentes unidos a enzimas, membrana de transferencia puntual, ensayos de inhibición o competición y ensayos sándwich (como se describe en Harlow y Land, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Una vez que se identifican los anticuerpos que se unen específicamente a MASP-2, los anticuerpos anti-MASP-2 se ensayan por su capacidad de funcionar como agentes inhibidores de MASP-2 en uno de varios ensayos tales como, por ejemplo, un ensayo de escisión de C4 específica de lectinas (descrito en el Ejemplo 2), un ensayo de deposición de C3b (descrito en el Ejemplo 2) o un ensayo de deposición de C4b (descrito en el Ejemplo 2).

El experto en la técnica puede determinar fácilmente la afinidad de los anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 (véase, p. ej., Scatchard, A., *NY Acad. Sci.* 57:660-672, 1949). En una realización, los anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 útiles para los métodos de la invención se unen a MASP-2 con una afinidad de unión de <100 nM, preferiblemente <10 nM y lo más preferiblemente <2 nM.

20 Anticuerpos quiméricos/humanizados

Los anticuerpos monoclonales útiles en el método descrito en este documento incluyen anticuerpos quiméricos en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como también fragmentos de dichos anticuerpos (patente estadounidense núm. 4.816.567 para Cabilly, y Morrison, S.L., et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE, UU.* 81:6851-6855, 1984).

Una forma de anticuerpo quimérico útil en la invención es un anticuerpo anti-MASP-2 monoclonal humanizado. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son anticuerpos quiméricos, que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos monoclonales humanizados se producen transfiriendo las regiones determinantes de complementaridad (CDR) no humanas (p. ej. de ratón), de cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina del ratón a un dominio variable humano. Típicamente, los residuos de anticuerpos humanos se sustituyen luego en las regiones marco de las contrapartes no humanas. Asimismo, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo del receptor o en el anticuerpo del donante. Estas modificaciones se realizan para refinar más el desempeño del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá prácticamente todo de por lo menos uno, y habitualmente dos dominios variables, en donde todos o prácticamente todos los bucles corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o prácticamente todas las regiones marco Fv son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente comprenderá también por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones, P.T., et al., *Nature* 321:522-525, 1986; Reichmann, L., et al., *Nature* 332:323-329, 1988; y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596, 1992.

Los anticuerpos humanizados útiles en la invención incluyen anticuerpos monoclonales humanos que incluyen por lo menos una región CDR3 de unión a MASP-2. Además, las porciones de Fc se pueden reemplazar como para producir IgA o IgM, además de anticuerpos de IgG humanos. Dichos anticuerpos humanizados tendrán utilidad clínica particular porque reconocerán específicamente MASP-2 humana, pero no evocarán una respuesta inmune en seres humanos contra el anticuerpo propiamente dicho. En consecuencia, son más adecuados para administraciones *in vivo* en seres humanos, especialmente cuando es necesaria la administración repetida o a largo plazo.

50 Un ejemplo de la generación de un anticuerpo anti-MASP-2 humanizado de un anticuerpo monoclonal anti-MASP-2 murino se provee en el Ejemplo 10. Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales también se describen, por ejemplo, en Jones, P.T., et al., *Nature* 321:522, 1986; Carter, P., et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE. UU.* 89:4285, 1992; Sandhu, J.S., *Crit. Rev. Biotech.* 12:431, 1992; Singer, I.I., 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.), John Wiley & Sons, Inc., páginas 399-434, 1996; y en la patente estadounidense núm. 5.693.762 para Queen, 1997. Además, existen entidades comerciales que sintetizan anticuerpos humanizados de regiones específicas de anticuerpos murinos, como Protein Design Labs (Mountain View, CA).

Anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos anti-MASP-2 también se pueden preparar usando métodos recombinantes. Por ejemplo, los anticuerpos humanos se pueden preparar usando bibliotecas de expresión de inmunoglobulina humana (disponibles, por ejemplo, de Stratagene, Corp., La Jolla, CA) para producir fragmentos de anticuerpos humanos (V_H, V_L, F_v, F_d, Fab o F(ab')₂). Estos fragmentos se usan luego para construir anticuerpos humanos completos similares a aquellos usados para producir anticuerpos quiméricos.

Anticuerpos anti-idiotipo

Una vez que se identifican los anticuerpos anti-MASP-2 con la actividad inhibidora deseada, estos anticuerpos se pueden utilizar para generar anticuerpos anti-idiotipo que se asemejan a una porción de MASP-2 usando técnicas conocidas en el campo. Véase, p. ej., Greenspan, N.S., et al., *FASEB J.* 7:437, 1993. Por ejemplo, los anticuerpos que se unen a MASP-2 e inhiben competitivamente una interacción de las proteínas MASP-2 requerida para la activación del complemento se pueden utilizar para generar anti-idiotipos que se asemejan al sitio de unión a MBL en la proteína MASP-2 y por ende se unen y neutralizan un ligando de unión de MASP-2, tal como, por ejemplo, MBL.

15 Fragmentos de inmunoglobulina

Los agentes inhibidores de MASP-2 útiles en los métodos descritos en la presente invención abarcan no solamente moléculas de inmunoglobulina intactas, sino también fragmentos conocidos, incluidos fragmentos de Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ y F_v, scF_v, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Se sabe bien en la técnica que solamente una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el paratopo, está implicada en la unión del anticuerpo a su epítipo (véase, p. ej., Clark, W.R., *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986). Las regiones pFc' y Fc del anticuerpo son efectoras de la vía del complemento clásica, pero no están implicadas en la unión al antígeno. Un anticuerpo del cual la región pFc' ha sido enzimáticamente escindida, o que ha sido producido sin la región pFc', se denomina fragmento F(ab')₂ y retiene ambos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo intacto. Un fragmento de F(ab')₂ aislado se denomina fragmento monoclonal bivalente debido a sus dos sitios de unión al antígeno. De modo similar, un anticuerpo del cual la región Fc ha sido enzimáticamente escindida, o que ha sido producido sin la región Fc, se denomina fragmento Fab, y retiene uno de los sitios de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo intacta.

Los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener por hidrólisis proteolítica, tal como por digestión de pepsina o papaína de anticuerpos enteros por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden producir por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proveer un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede además escindirse empleando un agente reductor de tiol para producir fragmentos monovalentes 3.5S Fab'. Opcionalmente, la reacción de escisión puede realizarse usando un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de enlaces disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática que usa pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. núm. 4.331.647 para Goldenberg; Nisonoff, A., et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230, 1960; Porter, R.R., *Biochem. J.* 73:119, 1959; Edelman, et al., en *Methods in Enzymology*, 1:422, Academic Press, 1967; y en Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4.

En algunas realizaciones, el uso de los fragmentos de anticuerpo que carecen de la región Fc se prefieren para evitar la activación de la vía del complemento clásica que se inicia tras la unión de Fc al receptor de Fc_γ. Hay varios métodos mediante los cuales uno puede producir un MoAb que evita las interacciones con el receptor de Fc_γ. Por ejemplo, la región Fc de un anticuerpo monoclonal puede eliminarse químicamente usando digestión parcial por enzimas proteolíticas (tales como digestión de ficina), generando así, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno, tales como fragmentos Fab o F(ab)₂ (Mariani, M., et al., *Mol. Immunol.* 28:69-71, 1991).

Alternativamente, el isotipo de IgG humano γ 4 IgG, que no se une a los receptores de Fc_γ, se puede usar durante la construcción de un anticuerpo humanizado como se describe en este documento. Los anticuerpos, anticuerpos monocatenarios y dominios de unión al antígeno que carecen del dominio Fc pueden también modificarse usando técnicas recombinantes como se describe en la presente memoria.

Fragmentos de anticuerpos monocatenarios

Alternativamente, uno puede crear moléculas de unión a péptidos sencillos específicas de MASP-2 en donde las regiones F_v de las cadenas pesada y ligera están conectadas. Los fragmentos F_v pueden estar conectados por un enlazador peptídico para formar una proteína de unión al antígeno monocatenaria (scF_v). Estas proteínas de unión al antígeno monocatenarias se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L que están conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula hospedante tal como *E. coli*. Las células hospedantes recombinantes sintetizan una cadena de polipéptido sencilla con un péptido enlazador que une los dos dominios V. Los métodos para producir scF_v se describen, por ejemplo, en Whitlow, et al., "Methods: A Companion

to Methods in Enzymology" 2:97, 1991; Bird, et al., *Science* 242:423, 1988; patente estadounidense núm. 4.946.778 para Ladner; Pack, P., et al., *Bio/Technology* 11:1271, 1993.

5 Como un ejemplo ilustrativo, un scFv específico de MASP-2 se puede obtener exponiendo los linfocitos al polipéptido de MASP-2 *in vitro* y seleccionando bibliotecas que exhiben anticuerpos en fago o vectores similares (por ejemplo, a través del uso de proteína o péptido de MASP-2 inmovilizado o marcado). Los genes que codifican los polipéptidos que tienen dominios de unión a polipéptidos de MASP-2 potenciales se pueden obtener ensayando bibliotecas de péptidos aleatorias exhibidas en fago o en bacterias tales como *E. coli*. Estas bibliotecas que exhiben péptidos aleatorios se pueden usar para detectar péptidos que interactúan con MASP-2. Las técnicas para crear y detectar dichas bibliotecas que exhiben péptidos se conocen en la técnica (patente estadounidense núm. 5.223.409 para Lardner; patente estadounidense núm. 4.946.778 para Ladner; patente estadounidense núm. 5.403.484 para Lardner; patente estadounidense núm. 5.571.698 para Lardner; y Kay et al., *Phage Display of Peptides and Proteins* Academic Press, Inc., 1996), y las bibliotecas que exhiben péptidos aleatorios y kits para ensayar dichas bibliotecas están comercialmente disponibles, por ejemplo, de CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif), Invitrogen Inc. (San Diego, Calif.), New England Biolabs, Inc. (Beverly, Mass.) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, N.J.).

10 Otra forma de un fragmento de anticuerpo anti-MASP-2 útil en este aspecto de la invención es un péptido que codifica una región determinante de complementaridad (CDR) que se une a un epítipo en un antígeno de MASP-2 e inhibe la activación del complemento dependiente de MASP-2. Los péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimo") se pueden obtener construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable de ARN de células que producen anticuerpos (véase, por ejemplo, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies" en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), página 166, Cambridge University Press, 1995; y Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al. (eds.), página 137, Wiley-Liss, Inc., 1995).

15 Los anticuerpos de MASP-2 descritos en este documento se administran a un sujeto que lo necesita para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2. En algunas realizaciones, el agente inhibidor de MASP-2 es un anticuerpo anti-MASP-2 monoclonal de gran afinidad humano o humanizado con función efectora reducida.

Inhibidores de péptidos

20 Se describen en este documento agentes inhibidores de MASP-2 que comprenden inhibidores de péptidos de MASP-2 aislados, incluidos inhibidores de péptidos naturales e inhibidores de péptidos sintéticos aislados que inhiben el sistema de activación del complemento dependiente de MASP-2. Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "inhibidores del péptido de MASP-2 aislados" se refiere a péptidos que inhiben la activación del complemento dependiente de MASP-2 por unión a, compitiendo con MASP-2 para la unión a otra molécula de reconocimiento (p. ej., MBL, H-ficolina, M-ficolina o L-ficolina) en la vía de lectinas, y/o interactuando directamente con MASP-2 para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 que son sustancialmente puros y están esencialmente libres de otras sustancias con las que se pueden hallar en la naturaleza hasta un grado práctico y adecuado para el uso destinado.

25 Los inhibidores de péptidos se han utilizado exitosamente *in vivo* para interferir con las interacciones proteína-proteína y los sitios catalíticos. Por ejemplo, los inhibidores de péptidos para moléculas de adhesión estructuralmente relacionadas con LFA-1 se han aprobado recientemente para uso clínico en coagulopatías (Ohman, E.M., et al., *European Heart J.* 16:50-55, 1995). Se han descrito péptidos lineales cortos (<30 aminoácidos) que previenen o interfieren con la adhesión dependiente de integrina (Murayama, O., et al., *J. Biochem.* 720:445-51, 1996). Péptidos más largos, en el intervalo de 25 a 200 residuos de aminoácidos, se han usado exitosamente para bloquear la adhesión dependiente de integrina (Zhang, L., et al., *J. Biol. Chem.* 277(47):29953-57, 1996). En general, los inhibidores de péptidos más largos tienen afinidades superiores y/o constantes de disociación más lentas que los péptidos cortos y por lo tanto pueden ser inhibidores más potentes. También se ha demostrado que los inhibidores de péptidos cíclicos son inhibidores eficaces de integrinas *in vivo* para el tratamiento de enfermedad inflamatoria humana (Jackson, D.Y., et al., *J. Med. Chem.* 40:3359-68, 1997). Un método para producir péptidos cíclicos implica la síntesis de péptidos en los que los aminoácidos terminales del péptido son cisteínas, permitiendo así que el péptido exista en una forma cíclica por enlace disulfuro entre los aminoácidos terminales, lo que se ha demostrado que mejora la afinidad y la semivida *in vivo* para el tratamiento de neoplasmas hematopoyéticos (p. ej., patente estadounidense núm. 6.649.592 para Larson).

Inhibidores del péptido MASP-2 sintético

30 Los péptidos inhibidores de MASP-2 útiles en los métodos descritos en este documento se ejemplifican con secuencias de aminoácidos que imitan las regiones diana importantes para la función de la MASP-2. Los péptidos inhibidores útiles en la práctica de los métodos de la invención oscilan en tamaño de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 300 aminoácidos. La TABLA 3 expone una lista de péptidos inhibidores ilustrativos que pueden ser útiles en la práctica de este aspecto de la presente invención. Un péptido inhibidor de MASP-2

candidato se puede ensayar por su capacidad de funcionar como agente inhibidor de MASP-2 en uno de varios ensayos, incluido por ejemplo, un ensayo de escisión de C4 específico de lectinas (descrito en el Ejemplo 2) y un ensayo de deposición de C3b (descrito en el Ejemplo 2).

Dichos péptidos inhibidores de MASP-2 pueden derivar de polipéptidos de MASP-2 y se seleccionan de la proteína MASP-2 madura de longitud total (SEC ID NO:6) o de un dominio particular de la proteína MASP-2 tal como, por ejemplo, el dominio CUBI (SEC ID NO:8), el dominio CUBIEGF (SEC ID NO:9), el dominio EGF (SEC ID NO: 11) y el dominio de serina proteasa (SEC ID NO:12). Como se describió previamente, se ha demostrado que las regiones CUBEGFCUBII se requieren para la dimerización y unión con MBL (Thielens et al., *supra*). En particular, se ha demostrado que la secuencia peptídica TFRSDYN (SEC ID NO: 16) en el dominio CUBI de MASP-2 está implicada en la unión a MBL en un estudio que identificó a un humano que portaba una mutación homocigota en Asp 105 a Gly105, resultando en la pérdida de MASP-2 del complejo de MBL (Stengaard-Pedersen, K., et al., *New England J. Med.* 349:554-560, 2003).

Los péptidos inhibidores de MASP-2 pueden también derivar de MAP19 (SEC ID NO:3). Como se describe en el Ejemplo 30, MAP19 (SEC ID NO:3) (también denominada sMAP), tiene la capacidad de reducir la vía de lectinas, que es activada por el complejo de MBL. Iwaki et al., *J. Immunol.* 177:8626-8632, 2006. Si bien no deseamos estar influenciados por la teoría, es probable que la sMAP sea capaz de ocultar el sitio de unión de MASP-2/sMAP en MBL y de prevenir que MASP-2 se una a MBL. También se ha descrito que sMAP compete con MASP-2 en asociación con ficolina A y que inhibe la activación del complemento por parte del complejo ficolina A/MASP-2. Endo Y. et al., *Immunogenetics* 57: 837-844 (2005).

Los péptidos inhibidores de MASP-2 pueden derivar de las proteínas de lectina que se unen a MASP-2 y están implicados en la vía del complemento de lectinas. Se han identificado varias lectinas diferentes que están implicadas en esta vía, incluida la lectina de unión a manano (MBL), L-ficolina, M-ficolina y H-ficolina. (Ikeda, K., et al., *J. Biol. Chem.* 252:7451-7454, 1987; Matsushita, M et al., *J. Exp. Med.* 176: 1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 755:3502-3506, 2002). Estas lectinas están presentes en el suero como oligómeros de subunidades homotriméricas, en donde cada una tiene fibras de tipo colágeno N-terminales con dominios de reconocimiento de carbohidratos. Se ha demostrado que estas lectinas diferentes se unen a MASP-2, y el complejo lectina/MASP-2 activa el complemento a través de la escisión de las proteínas C4 y C2. La H-ficolina contiene una región amino-terminal de 24 aminoácidos, un dominio de tipo colágeno con 11 repeticiones Gly-Xaa-Yaa, un dominio cuello de 12 aminoácidos y un dominio de tipo fibrinógeno de 207 aminoácidos (Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 755:3502-3506, 2002). La H-ficolina se une a GlcNAc y aglutina eritrocitos humanos recubiertos con LPS derivado de *S. typhimurium*, *S. minnesota* y *E. coli*. Se ha demostrado que la H-ficolina está asociada con MASP-2 y MAP19, y que activa la vía de lectinas. *Id.* L-ficolina/P35 también se une a GlcNAc y se ha demostrado que está asociado con MASP-2 y MAP19 en suero humano, y se ha demostrado que este complejo activa la vía de lectinas (Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 164:2281, 2000). Por consiguiente, los péptidos inhibidores de MASP-2 útiles en la presente invención pueden comprender una región de por lo menos 5 aminoácidos seleccionados entre la proteína MBL (SEC ID NO:21), la proteína H-ficolina (número de acceso en Genbank NM_173452), la proteína M-ficolina (número de acceso en Genbank 000602) y la proteína L-ficolina (número de acceso en Genbank NM 015838).

Más específicamente, los científicos han identificado que el sitio de unión a MASP-2 en MBL está dentro de los 12 tripletes Gly-X-Y "GKD GRD GTK GEK GEP GQG LRG LQG POG KLG POG NOG PSG SOG PKG QKG DOG KS" (SEC ID NO:26) que yacen entre la bisagra y el cuello en la porción C-terminal del dominio de colágeno de MBP (Wallis, R., et al., *J. Biol. Chem.* 279:14065, 2004). Esta región del sitio de unión a MASP-2 está también altamente conservada en H-ficolina humana y en L-ficolina humana. Se ha descrito un sitio de unión de consenso que está presente en las tres proteínas lectina, que comprende la secuencia de aminoácidos "OGK-X-GP" (SEC ID NO:22) en donde la última "O" representa hidroxiprolina y la letra "X" es un residuo hidrófobo (Wallis et al., 2004, *supra*). Por consiguiente, en algunas realizaciones, los péptidos inhibidores de MASP-2 útiles en este aspecto de la invención tienen por lo menos 6 aminoácidos de longitud y comprenden la SEC ID NO:22. Se ha demostrado que los péptidos derivados de MBL que incluyen la secuencia de aminoácidos "GLR GLQ GPO GKL GPO G" (SEC ID NO:24) se unen a MASP-2 *in vitro* (Wallis, et al., 2004, *supra*). Para potenciar la unión a MASP-2, los péptidos pueden sintetizarse flanqueados por dos tripletes GPO en cada extremo ("GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GGP OGP O" SEC ID NO:25) a fin de potenciar la formación de hélices triples, como los que se encuentran en la proteína MBL nativa (como se describe además en Wallis, R., et al., *J. Biol. Chem.* 279:14065, 2004).

Los péptidos inhibidores de MASP-2 pueden también derivar de la H-ficolina humana, e incluyen la secuencia "GAO GSO GEK GAO GPQ GPO GPO GKM GPK GEO GDO" (SEC ID NO:27) de la región de unión a MASP-2 de consenso en H-ficolina. También se incluyen péptidos derivados de L-ficolina humana que incluyen la secuencia "GCO GLO GAO GDK GEA GTN GKR GER GPO GPO GKA GPO GPN GAO GEO" (SEC ID NO:28) de la región de unión a MASP-2 de consenso en L-ficolina.

Los péptidos inhibidores de MASP-2 pueden también derivar del sitio de escisión C4 tal como "LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI" (SEC ID NO:29) que es el sitio de escisión C4 unido a la porción C-terminal de antitrombina III (Glover, G.I., et al., *Mol. Immunol.* 25:1261 (1988)).

Tabla 3: Péptidos inhibidores de MASP-2 ilustrativos

SEC ID NO	Origen
SEC ID NO:6	Proteína MASP-2 humana
SEC ID NO:8	Dominio CUBI de MASP-2 (aa 1 -121 de SEC ID NO:6)
SEC ID NO:9	Dominios CUBIEGF de MASP-2 (aa 1-166 de SEC ID NO:6)
SEC ID NO: 10	Dominios CUBIEGFCUBII de MASP-2 (aa 1-293 de SEC ID NO:6)
SEC ID NO: 11	Dominio EGF de MASP-2 (aa 122-166)
SEC ID NO: 12	Dominio serina-proteasa de MASP-2 (aa 429-671)
SEC ID NO: 16	Región de unión a MBL en MASP-2
SEC ID NO:3	MAp19 humano
SEC ID NO:21	Proteína MBL humana
SEC ID NO:22 OGK-X-GP, En donde "O" = hidroxiprolina y "X" es un residuo de aminoácidos hidrófobos	Péptido sintético Sitio de unión de consenso de MBL humanas y ficolinas humanas
SEC ID NO:23 OGKLG	Sitio de unión al núcleo de MBL humanas
SEC ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G	Tripletes de MBP humanos 6-10 demostraron unión a MASP-2
SEC ID NO:25 GPOGPOGLRGLQGPOGKLGPOGGPOGPO	Tripletes de MBP humanos con GPO añadido para potenciar la formación de hélices triples
SEC ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEPPGQGLRGLQGPOGKLGPOGNOGPSGSOGPKGQKGDGKSG	Tripletes de MBP humanos 1-17
SEC ID NO:27 GAOGSOGEKGAOGPQ GPOGPOGKMGPKGEO GDO	H-Ficolina humana (Hataka)
SEC ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGE AGTN GKRGERGPOGP OGKAGPOGPNGAOGEO 0	L-Ficolina humana P35
SEC ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI	Sitio de escisión de C4 humana

Nota: La letra "O" representa hidroxiprolina. La letra "X" es un residuo hidrófobo.

5 Los péptidos derivados del sitio de escisión de C4 así como también otros péptidos que inhiben el sitio de MASP-2 serina proteasa pueden modificarse químicamente para ser irreversibles a los inhibidores de proteasa. Por ejemplo, las modificaciones apropiadas pueden incluir, aunque sin necesariamente limitarse a ello, halometil cetonas (Br, Cl, I, F) en el término C, Asp o Glu, o anexarse a cadenas laterales funcionales, grupos haloacetilo (u otro α -haloacetilo) en grupos amino u otras cadenas laterales funcionales; grupos que contienen epóxido o imina en los términos amino o carboxi o en cadenas laterales funcionales; o imidato ésteres en los términos amino o carboxi o en las cadenas laterales funcionales. Dichas modificaciones producirían la ventaja de inhibir permanentemente la enzima por unión covalente del péptido. Esto podría resultar en dosis eficaces inferiores y/o en la necesidad de administración menos frecuente del inhibidor de péptidos.

15 Además de los péptidos inhibidores anteriormente descritos, los péptidos inhibidores de MASP-2 útiles en el método descrito en este documento incluyen péptidos que contienen la región CDR3 de unión a MASP-2 de anti-MASP-2 MoAb obtenida como se describe en la presente memoria. La secuencia de las regiones CDR para uso en la síntesis de los péptidos se puede determinar por métodos conocidos en la técnica. La región variable de la cadena pesada es un péptido que en general oscila entre 100 y 150 aminoácidos de longitud. La región variable de la cadena ligera es un péptido que en general oscila entre 80 y 130 aminoácidos de longitud. Las secuencias de CDR dentro de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera incluyen solamente aproximadamente 3-25 secuencias de aminoácidos que puede secuenciar fácilmente el experto en la técnica.

25 Los expertos en la técnica reconocerán que variaciones sustancialmente homólogas de los péptidos inhibidores de MASP-2 descritos anteriormente también exhibirán actividad inhibidora de MASP-2. Las variaciones ilustrativas incluyen, aunque sin necesariamente limitarse a ello, péptidos que tienen inserciones, eliminaciones, reemplazos y/o aminoácidos adicionales en las porciones del término carboxi o en las porciones del término amino de los péptidos en cuestión y sus mezclas. Por consiguiente, esos péptidos homólogos que tienen actividad inhibidora de MASP-2 se consideran útiles en los métodos de la presente invención. Los péptidos descritos pueden también incluir motivos

duplicadores y otras modificaciones con sustituciones conservadoras. Las variantes conservadoras se describen en este documento e incluyen el intercambio de un aminoácido por otro de carga, tamaño o hidrofobicidad similar, y similares.

5 Los péptidos inhibidores de MASP-2 se pueden modificar para incrementar la solubilidad y/o maximizar la carga positiva o negativa con el fin de asemejarse más al segmento en la proteína intacta. El derivado puede o no tener la estructura primaria de aminoácidos exacta de un péptido descrito en la presente invención, siempre y cuando la funcionalidad del derivado retenga la propiedad deseada de la inhibición de MASP-2. Las modificaciones pueden incluir sustitución de aminoácidos con uno de los veinte aminoácidos comúnmente conocidos o con otros aminoácidos, con un aminoácido derivado o sustituido con características deseables auxiliares, tales como resistencia a la degradación enzimática o con un D-aminoácido o sustitución con otra molécula o compuesto, tal como un carbohidrato, que imita la confirmación y función natural del aminoácido, aminoácidos o péptido, eliminación de aminoácidos; inserción de aminoácidos con uno de los veinte aminoácidos comúnmente conocidos o con otros 10 aminoácidos, con un aminoácido derivado o sustituido con características deseables auxiliares, tales como resistencia a degradación enzimática o con un D-aminoácido o sustitución con otra molécula o compuesto, tal como un carbohidrato, que imita la confirmación y función naturales del aminoácido, aminoácidos o péptidos; o sustitución con otra molécula o compuesto, tal como un carbohidrato o monómero de ácido nucleico, que imita la confirmación, distribución de carga y función natural del péptido madre. Los péptidos pueden también modificarse por acetilación o amidación.

20 La síntesis de los péptidos inhibidores derivados se puede basar en técnicas conocidas de biosíntesis de péptidos, biosíntesis de carbohidratos y similares. Como punto de partida, el experto puede basarse en un programa de ordenador adecuado para determinar la conformación de un péptido de interés. Una vez que se sabe la conformación del péptido descrito aquí, entonces el experto puede determinar en un diseño racional qué clases de sustituciones se pueden realizar en uno o más sitios para crear un derivado que retenga la conformación básica y la distribución de carga del péptido madre, pero que posea características que no están presentes o que estén 25 potenciadas en comparación con aquellas encontradas en el péptido madre. Una vez que las moléculas del derivado candidatas son identificadas, los derivados pueden ser ensayados para determinar si funcionan como agentes inhibidores de MASP-2 usando los ensayos que se describen en la presente memoria.

Selección de péptidos inhibidores de MASP-2

30 Uno puede usar modelado molecular y diseño molecular para generar y seleccionar péptidos que imitan estructuras moleculares de regiones de unión clave de 25 MASP-2 e inhibir las actividades del complemento de MASP-2. Las estructuras moleculares utilizadas para modelar incluyen las regiones CDR de anticuerpos monoclonales anti-MASP-2, así como también las regiones diana conocidas por ser importantes para la función de la MASP-2, incluida la región requerida para la dimerización, la región implicada en la unión a MBL y el sitio activo de serina proteasa, como se describió previamente. Los métodos para identificar péptidos que se unen a una diana particular se 35 conocen en la técnica. Por ejemplo, se puede usar impresión molecular para la construcción *de novo* de estructuras macromoleculares tales como péptidos que se unen a una molécula particular. Véase, por ejemplo, Shea, K.J., "Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymers: The De Novo synthesis of Macromolecular Binding and Catalytic Sites", *TRIP* 2:(5) 1994.

40 Como ejemplo ilustrativo, un método para preparar miméticos de péptidos de unión a MASP-2 es el siguiente. Se polimerizan monómeros funcionales de un péptido de unión a MASP-2 conocido o la región de unión de un anticuerpo anti-MASP-2 que exhibe inhibición de MASP-2 (el molde). El molde luego se quita, seguido por polimerización de una segunda clase de monómeros en el vacío que dejó el molde, para proveer una nueva molécula que exhibe una o más propiedades deseadas similares al molde. Además de preparar péptidos de esta manera, también se pueden preparar otras moléculas de unión a MASP-2 que son agentes inhibidores de MASP-2 45 tales como polisacáridos, nucleósidos, fármacos, nucleoproteínas, lipoproteínas, carbohidratos, glucoproteínas, esteroides, lípidos y otros materiales biológicamente activos. Este método es útil para diseñar una amplia variedad de miméticos biológicos que son más estables que sus contrapartes naturales, ya que típicamente se preparan por polimerización de radicales libres de monómeros funcionales, lo que produce un compuesto con un esqueleto no biodegradable.

50 Síntesis de péptidos

Los péptidos inhibidores de MASP-2 se pueden preparar usando técnicas conocidas en el campo, tales como la técnica sintética de fase sólida inicialmente descrita por Menifield, en *J.Amer. Chem. Soc.* 85:2149-2154, 1963. Se pueden lograr síntesis automáticas, por ejemplo, empleando el sintetizador de péptidos Applied Biosystems 431A (Foster City, Calif) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Otras técnicas se pueden 55 hallar, por ejemplo, en Bodanszky, M., et al., *Peptide Synthesis*, segunda edición, John Wiley & Sons, 1976, así como también en otras obras de referencia conocidas por el experto en la materia.

Los péptidos pueden también prepararse usando técnicas de modificación genética convencionales conocidas por el experto en la técnica. Por ejemplo, el péptido se puede producir enzimáticamente insertando ácido nucleico que codifica el péptido en un vector de expresión, expresando el ADN y traduciendo el ADN al péptido en presencia de

los aminoácidos requeridos. El péptido luego se purifica utilizando técnicas cromatográficas o electroforéticas, o mediante una proteína portadora que se condensa a, y posteriormente se escinde del péptido insertando en el vector de expresión en fase con el péptido que codifica una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína portadora. La fusión proteína-péptido se puede aislar usando técnicas cromatográficas, electroforéticas o inmunológicas (tales como unión a resina mediante un anticuerpo a la proteína portadora). El péptido se puede escindir usando metodología química o enzimática, como por ejemplo, hidrolasas.

Los péptidos inhibidores de MASP-2 que son útiles en el método de la invención también se pueden producir en células hospedantes recombinantes siguiendo técnicas convencionales. Para expresar una secuencia que codifica el péptido inhibidor de MASP-2, una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido debe unirse operativamente a las secuencias reguladoras que controlan la expresión de la transcripción en un vector de expresión y luego introducirse en la célula hospedante. Además de las secuencias reguladoras de la transcripción, tales como promotores y potenciadores, los vectores de expresión pueden incluir secuencias reguladoras de traducción y un gen marcador, que son adecuados para la selección de células que portan el vector de expresión.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican un péptido inhibidor de MASP-2 se pueden sintetizar con "máquinas de genes", usando protocolos tales como el método de fosoramidita. Si se sintetiza químicamente, se requiere ADN bicatenario para una aplicación tal como la síntesis de un gen o fragmento de gen, luego cada hebra complementaria se elabora separadamente. La producción de genes cortos (60 a 80 pares de bases) es técnicamente simple y se puede lograr sintetizando las hebras complementarias y luego alineándolas. Para la producción de genes más largos, se ensamblan genes sintéticos (bicatenarios) en forma modular de fragmentos monocatenarios que tienen entre 20 y 100 nucleótidos de longitud. Para revisiones de síntesis de polinucleótidos, véanse, por ejemplo, Glick y Pasternak, "Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA", ASM Press, 1994; Itakura, K., et al., *Annu. Rev. Biochem.* 53:323, 1984; y Climie, S., et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE. UU.* 87:633, 1990.

Inhibidores de moléculas pequeñas

En algunas realizaciones, los agentes inhibidores de MASP-2 son inhibidores de moléculas pequeñas que incluyen sustancias naturales y sintéticas que tienen bajo peso molecular, tal como por ejemplo péptidos, peptidomiméticos e inhibidores no peptídicos (incluidos oligonucleótidos y compuestos orgánicos). Los inhibidores de moléculas pequeñas de MASP-2 se pueden generar en base a la estructura molecular de las regiones variables de los anticuerpos anti-MASP-2.

Los inhibidores de moléculas pequeñas pueden también diseñarse y generarse en base a la estructura cristalina de la MASP-2, usando un diseño de fármacos de ordenador (Kuntz I.D., et al., *Science* 257:1078, 1992). Se ha descrito la estructura cristalina de MASP-2 de rata (Feinberg, H., et al., *EMBOJ.*22:2348-2359, 2003). Usando el método descrito por Kuntz et al., se usan coordenadas de la estructura cristalina de la MASP-2 como datos de entrada para un programa de ordenador tal como DOCK, que produce una lista de estructuras de moléculas pequeñas que se espera se unan a MASP-2. Los expertos en la técnica conocen el uso de dichos programas de ordenador. Por ejemplo, la estructura cristalina del inhibidor de proteasa del VIH-1 se usó para identificar ligandos no peptídicos únicos que son inhibidores de proteasa del VIH-1, evaluando la adecuación de los compuestos hallados en la base de datos de Cambridge Crystallographic al sitio de unión de la enzima, empleando el programa DOCK (Kuntz, I.D., et al., *J. Mol. Biol.* 161:269-288, 1982; DesJarlais, R.L., et al., *PNAS* 87:6644-6648, 1990).

La lista de estructuras de moléculas pequeñas que se identifican con un método de ordenador como inhibidores potenciales de MASP-2 se selecciona usando un ensayo de unión a MASP-2 tal como aquel descrito en el Ejemplo 7. Las moléculas pequeñas que se encuentran que se unen a MASP-2 se ensayan luego en un ensayo funcional tal como se describe en el Ejemplo 2 a fin de determinar si inhiben la activación del complemento dependiente de MASP-2.

Receptores de MASP-2 solubles

Se cree que otros agentes inhibidores de MASP-2 adecuados incluyen receptores solubles de MASP-2, que se pueden producir usando técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Inhibidores de expresión de MASP-2

En otra realización de este aspecto de la invención, el agente inhibidor de MASP-2 es un inhibidor de expresión de MASP-2 capaz de inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2. En la práctica de este aspecto de la presente invención, los inhibidores de expresión de MASP-2 representativos incluyen moléculas de ácido nucleico antisentido de MASP-2 (como ARNm antisentido, ADN antisentido u oligonucleótidos antisentido), ribozimas de MASP-2 y moléculas de ARNi de MASP-2.

Las moléculas de ARN y ADN antisentido actúan directamente para bloquear la traducción de ARNm de MASP-2, hibridando a ARNm de MASP-2 y previniendo la traducción de la proteína MASP-2. Una molécula de ácido nucleico antisentido puede construirse en una serie de formas distintas, siempre que sea capaz de interferir con la expresión de MASP-2. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico antisentido se puede construir invirtiendo la región codificadora (o una porción de esta) de ADNc de MASP-2 (SEC ID NO:4) en relación a su orientación normal para la

transcripción a fin de permitir la transcripción de su complemento.

La molécula de ácido nucleico antisentido habitualmente es sustancialmente idéntica a por lo menos una porción del gen o los genes diana. El ácido nucleico, no obstante, no necesita ser perfectamente idéntico para inhibir la expresión. En general, se puede usar homología superior para compensar el uso de una molécula de ácido nucleico antisentido más corta. El porcentaje de identidad mínimo es típicamente mayor que aproximadamente 65%, pero un porcentaje de identidad mayor puede ejercer una represión más eficaz de la expresión de la secuencia endógena. Típicamente se prefiere un porcentaje de identidad sustancialmente mayor, de más de aproximadamente 80%, aunque habitualmente lo más preferible es aproximadamente 95% de identidad absoluta.

No es necesario que la molécula de ácido nucleico antisentido tenga el mismo patrón de intrones o exones que el gen diana, y los segmentos no codificadores del gen diana pueden ser igual de eficaces para lograr la supresión antisentido de la expresión del gen diana como segmentos codificadores. Se puede utilizar una secuencia de ADN de por lo menos aproximadamente 8 nucleótidos como la molécula de ácido nucleico antisentido, aunque es preferible una secuencia más larga. En la presente invención, un ejemplo representativo de un agente inhibidor útil de MASP-2 es una molécula de ácido nucleico de MASP-2 antisentido que es por lo menos noventa y nueve por ciento idéntica al complemento del ADNc de MASP-2 que consiste en la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEC ID NO:4. La secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEC ID NO:4 codifica la proteína MASP-2 que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:5.

El direccionamiento de oligonucleótidos antisentido para unión de ARNm de MASP-2 es otro mecanismo que se puede usar para reducir el nivel de síntesis de proteína MASP-2. Por ejemplo, la síntesis de poligalacturonasa y el receptor de acetilcolina muscarínico de tipo 2 es inhibida por oligonucleótidos antisentido dirigidos a sus respectivas secuencias de ARNm (patente estadounidense núm. 5.739.119 para Cheng, y patente estadounidense núm. 5.759.829 para Shewmaker). Asimismo, se han demostrado ejemplos de inhibición antisentido con la proteína nuclear cilina, el gen de resistencia a fármacos múltiples (MDG1), ICAM-1, E-selectina, STK-1, receptor GABA_A estratral y EGF humano (véase, p.ej., patente estadounidense núm. 5.801. 154 para Baracchini; patente estadounidense núm. 5.789.573 para Baker; patente estadounidense núm. 5.718.709 para Considine; y patente estadounidense núm. 5.610.288 para Reubenstein).

Se ha descrito un sistema que permite al experto en la técnica determinar qué oligonucleótidos son útiles en los métodos que se describen en la presente invención, el cual implica sondear sitios adecuados en el ARNm diana usando escisión de Rnase H como un indicador de la accesibilidad de las secuencias dentro de las transcripciones. Scherr, M., et al., *Nucleic Acids Res.* 26:5079-5085, 1998; Lloyd, et al., *Nucleic Acids Res.* 29:3665-3673, 2001. Se añade a los extractos celulares que expresan MASP-2, una mezcla de oligonucleótidos antisentido que son complementarios a determinadas regiones de la transcripción de MASP-2, como hepatocitos, y se hibrida con el fin de crear un sitio vulnerable a RNaseH. Este método se puede combinar con selección de secuencias asistida por ordenador que puede pronosticar la selección de secuencias para composiciones antisentido en función de su capacidad relativa para formar dímeros, horquillas u otras estructuras secundarias que reducirían o prohibirían la unión específica al ARNm diana en una célula hospedante. Este análisis de estructuras secundarias y las consideraciones de selección de sitios diana se pueden efectuar usando el software de análisis de cebadores OLIGO (Rychlik, I., 1997) y el software de algoritmos BLASTN 2.0.5 (Altschul, S.F., et al., *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402, 1997). Los compuestos antisentido dirigidos a la secuencia diana preferiblemente comprenden entre aproximadamente 8 y aproximadamente 50 nucleótidos de largo. Los oligonucleótidos antisentido que comprenden entre aproximadamente 9 y aproximadamente 35 nucleótidos se prefieren particularmente. Los inventores contemplan que todas las composiciones de oligonucleótidos en el intervalo de 9 a 35 nucleótidos (es decir, aquellas de alrededor de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 bases de longitud) se prefieren altamente para la práctica de métodos basados en oligonucleótidos antisentido de la invención. Las regiones diana altamente preferidas del ARNm de MASP-2 son aquellas que se encuentran en o cerca del codón de inicio de la traducción AUG, y aquellas secuencias que son sustancialmente complementarias a las regiones 5' del ARNm, p. ej., entre las regiones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen MASP-2 (SEC ID NO:4). Los inhibidores de expresión de MASP-2 ilustrativos se exponen en la TABLA 4.

Tabla 4: Inhibidores de expresión de MASP-2 ilustrativos

SEC ID NO:30 (nucleótidos 22-680 de SEC ID NO:4)	Secuencia de ácido nucleico de ADNc de MASP-2 (SEC ID NO:4) que codifica CUBIEGF
SEC ID NO:31 5 CGGGCACACCATGAGGCTGCTG ACCCTCCTGGGC3	Nucleótidos 12-45 de SEC ID NO:4 que incluye el sitio de inicio de la traducción de MASP-2 (sentido)
SEC ID NO:32 5 'GACATT ACCTTCCGCTCCGACTC CAACGAGAAG3'	Nucleótidos 361-396 de la SEC ID NO:4 que codifica una región que comprende el sitio de unión a MBL de MASP-2 MBL (sentido)

SEC ID NO:33 5 AGCAGCCCTGAAT ACCCACGGCC GT ATCCC A A A3'	Nucleótidos 610-642 de la SEC ID NO:4 que codifica una región que comprende el dominio CUBII
--	--

Como se observó anteriormente, el término "oligonucleótido", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o sus miméticos.

5 Este término también abarca aquellas oligonucleobases compuestas por enlaces de nucleótidos naturales, azúcares e internucleósidos covalentes (esqueleto), además de oligonucleótidos que tienen modificaciones naturales. Estas modificaciones permiten introducir ciertas propiedades deseables que no se ofrecen a través de los oligonucleótidos naturales, tales como menos propiedades tóxicas, más estabilidad contra la degradación de nucleasas y mayor absorción celular. En realizaciones ilustrativas, los compuestos antisentido de la invención difieren del ADN nativo por la modificación del esqueleto de fosfodiéster para extender la vida del oligonucleótido antisentido en el que los sustituyentes de fosfato se reemplazan con fosforotioatos. Asimismo, uno o ambos extremos del oligonucleótido se pueden sustituir con uno o más derivados de acridina que se intercalan entre pares de bases adyacentes dentro de una hebra de ácido nucleico.

15 Otra alternativa al antisentido es el uso de "interferencia de ARN" (ARNi). Los ARN bicatenarios (ARNbc) pueden provocar el silenciamiento de genes en mamíferos *in vivo*. La función natural del ARNi y la co-supresión parecen ser una protección del genoma contra la invasión por elementos genéticos móviles, tales como retrotransposones y virus que producen ARN o ARNbc aberrante en la célula hospedante cuando se activan (véase, p. ej., Jensen, J., et al., *Nat. Genet.* 21:209-12, 1999). La molécula de ARN bicatenario se puede preparar sintetizando dos hebras de ARN capaces de formar una molécula de ARN bicatenario, en donde cada una tiene una longitud de aproximadamente 19 a 25 (p. ej., 19-23 nucleótidos). Por ejemplo, una molécula de ARNbc útil en los métodos de la invención puede comprender el ARN correspondiente a una secuencia y su complemento mencionado en la TABLA 4. Preferiblemente, por lo menos una hebra de ARN tiene proyección 3' de 1-5 nucleótidos. Las hebras de ARN sintetizadas se combinan bajo condiciones que forman una molécula bicatenaria. La secuencia de ARN puede comprender por lo menos una porción de 8 nucleótidos de la SEC ID NO:4 con una longitud total de 25 nucleótidos o menos. El diseño de las secuencias de ARNi para una diana determinada está dentro de la pericia del experto en la técnica. Existen servicios comerciales que diseñan la secuencia siRNA y garantizan por lo menos 70% de reducción de expresión (Qiagen, Valencia, Calif).

25 El ARNbc se puede administrar como una composición farmacéutica y efectuarse por métodos conocidos, en donde un ácido nucleico se introduce en una célula diana deseada. Los métodos de transferencia de genes utilizados incluyen fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, microinyección y métodos virales. Dichos métodos se describen en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 1993.

30 También se pueden utilizar ribozimas para reducir la cantidad y/o actividad biológica de MASP-2, como ribozimas que dirigen ARNm de MASP-2. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas que pueden escindir moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia completa o parcialmente homóloga a la secuencia de la ribozima. Es posible diseñar transgenes de ribozimas que codifican las ribozimas de ARN que se acoplan específicamente al ARN diana y escindir el esqueleto de fosfodiéster en una ubicación específica, inactivando funcionalmente de esta manera el ARN diana. Para llevar a cabo esta escisión, no se altera la ribozima propiamente dicha, y por lo tanto es capaz de reciclar y escindir otras moléculas. La inclusión de secuencias de ribozimas dentro de los ARN antisentido confiere actividad de escisión del ARN, aumentando de este modo la actividad de los constructos antisentido.

35 Las ribozimas útiles en la práctica de la invención típicamente comprenden una región hibridante de por lo menos aproximadamente nueve nucleótidos que es complementaria en secuencia de nucleótidos a por lo menos parte del ARNm de MASP-2 diana, y una región catalítica que se adapta para escindir el ARNm de MASP-2 diana (véanse en general, EPA núm. 0 321 201; W088/04300; Haseloff, J., et al., *Nature* 334:585-591, 1988; Fedor, M.J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 87:1668-1672, 1990; Cech, T.R., et al, *Ann. Rev. Biochem.* 55:599-629, 1986).

40 Las ribozimas se pueden dirigir o bien directamente a las células en la forma de oligonucleótidos de ARN que incorporan secuencias de ribozimas, o se pueden introducir en las células como un vector de expresión que codifica el ARN ribosómico deseado. Las ribozimas se pueden usar y aplicar de la misma manera descrita para los polinucleótidos antisentido.

45 Las moléculas ARN y ADN antisentido, ribozimas y ARNi útiles en los métodos descritos en este documento se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica para síntesis de moléculas de ADN y ARN. Estas incluyen técnicas para sintetizar químicamente oligodesoxirribonucleótidos y oligorribonucleótidos conocidas en el campo, tales como por ejemplo síntesis química de fosforamídita de fase sólida. Alternativamente, se pueden generar moléculas de ARN por transcripción de secuencias de ADN *in vitro* e *in vivo* que codifican la molécula de ARN antisentido. Dichas secuencias de ADN se pueden incorporar a una diversidad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Alternativamente, constructos de ADNc antisentido que sintetizan ARN antisentido de manera constitutiva o inducible, dependiendo del

50

55

promotor empleado, se pueden introducir establemente a las líneas celulares.

Se pueden introducir diversas modificaciones conocidas de las moléculas de ADN como modo de incrementar la estabilidad y la semivida. Las modificaciones útiles incluyen, aunque sin limitarse a ello, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula o el uso de fosforotioato o 2' O-metilo en lugar de enlaces fosfodiesterasa dentro del esqueleto de oligodesoxirribonucleótidos.

V. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

Dosis

En otro aspecto, la invención da a conocer composiciones para inhibir los efectos adversos de la activación del complemento dependiente de MASP-2, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 especificado y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El agente inhibidor de MASP-2 se puede administrar a un sujeto que lo necesita en una dosis terapéuticamente eficaz para tratar o aliviar afecciones asociadas con la activación del complemento dependiente de MASP-2. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad del agente inhibidor de MASP-2 suficiente para generar un alivio de los síntomas de la afección.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los agentes inhibidores de MASP-2 se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos convencionales que emplean modelos animales, como el modelo de ratón MASP-2 -/- murino que expresa el transgen de MASP-2 humano descrito en el Ejemplo 3. Con el uso de dichos modelos animales, se pueden determinar el NOAEL (nivel de efecto adverso no observado) y la MED (dosis mínimamente eficaz) empleando métodos convencionales. La relación de dosis entre los efectos NOAEL y MED es la relación terapéutica, que se expresa como la relación NOAEL/MED. Los agentes inhibidores de MASP-2 que exhiben grandes relaciones o índices terapéuticos son los que más se prefieren. Los datos obtenidos de ensayos de cultivos celulares y estudios animales se pueden usar para formular una gama de dosis para uso en seres humanos. La dosis del agente inhibidor de MASP-2 preferiblemente yace dentro del intervalo de concentraciones circulantes que incluyen MED con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de la forma de dosificación y la ruta de administración que se utilicen.

Para cualquier formulación de compuestos, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar usando modelos animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis en un modelo animal para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluya la MED. Los niveles cuantitativos del agente inhibidor de MASP-2 en el plasma también pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Además de los estudios de toxicidad, la dosis eficaz puede también estimarse en base a la cantidad de proteína MASP-2 presente en un sujeto vivo y a la afinidad de unión del agente inhibidor de MASP-2. Se ha demostrado que los niveles de MASP-2 en sujetos humanos normales está presente en el suero en niveles bajos en el intervalo de 500 ng/ml, y los niveles de MASP-2 en un sujeto particular, se pueden determinar usando un ensayo cuantitativo para MASP-2 descrito en Moller-Kiistensen M., et al., *J. Immunol. Methods* 282:159-167, 2003.

En general, la dosis de las composiciones administradas que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 varía dependiendo de factores tales como la edad, el peso, la estatura, el sexo y el estado médico general del sujeto, y de los antecedentes médicos previos. A modo ilustrativo, los agentes inhibidores de MASP-2, tales como anticuerpos anti-MASP-2, se pueden administrar en intervalos de dosis de aproximadamente 0,010 a 10,0 mg/kg, preferiblemente de 0,010 a 1,0 mg/kg, más preferiblemente 0,010 a 0,1 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la composición comprende una combinación de anticuerpos anti-MASP-2 y péptidos inhibidores de MASP-2.

La eficacia terapéutica de las composiciones y métodos inhibidores de MASP-2 de la presente invención en un sujeto determinado, y las dosis adecuadas, se pueden determinar de acuerdo con ensayos del complemento conocidos por el experto en la técnica. El complemento genera diversos productos específicos. Durante la última década, se han desarrollado y se encuentran disponibles en el mercado ensayos sensibles y específicos para la mayoría de estos productos de activación, incluidos los pequeños fragmentos de activación C3a, C4a y C5a y los grandes fragmentos de activación iC3b, C4d, Bb y sC5b-9. La mayoría de estos ensayos utilizan anticuerpos monoclonales que reaccionan con antígenos nuevos (neoantígenos) expuestos en el fragmento, pero no en las proteínas naturales de las cuales están formados, lo que hace que estos ensayos sean muy simples y específicos. La mayoría se basan en tecnología ELISA, aunque el radioinmunoensayo es todavía utilizado en ocasiones para C3a y C5a. Estos últimos ensayos miden tanto los fragmentos no procesados como sus fragmentos 'desArg', que son las formas importantes encontradas en la circulación. Los fragmentos no procesados y C5ad_{es}Arg son rápidamente aclarados por la unión a los receptores de la superficie celular y en consecuencia están presentes en concentraciones muy reducidas, mientras que C3ad_{es}Arg no se une a las células y se acumula en el plasma. La medición de C3a proporciona un indicador sensible de la activación del complemento independiente de la vía. La activación de la vía alternativa se puede evaluar midiendo el fragmento Bb. La detección del producto de fase fluida de activación de la vía de ataque a la membrana, sC5b-9, aporta datos de que el complemento está siendo activado hasta la culminación. Dado que tanto la vía de lectinas como la clásica generan los mismos productos de activación, C4a y C4d, la medición de estos dos fragmentos no provee ninguna información sobre cuál de estas dos vías ha

generado los productos de activación.

Agentes adicionales

Las composiciones y métodos que comprenden los agentes inhibidores de MASP-2 pueden opcionalmente comprender uno o más agentes terapéuticos adicionales, que pueden aumentar la actividad del agente inhibidor de MASP-2 o que proveen funciones terapéuticas relacionadas en un modo aditivo o sinérgico. Por ejemplo, uno o más agentes inhibidores de MASP-2 pueden administrarse en combinación con uno o más agentes antiinflamatorios y/o analgésicos. Se determinará la inclusión y selección de un agente(s) adicional para lograr un resultado terapéutico deseado. Los agentes antiinflamatorios y/o analgésicos adecuados incluyen: antagonistas de los receptores de serotonina; agonistas de los receptores de serotonina; antagonistas de los receptores de histamina; agonistas de los receptores de bradiquinina; inhibidores de caliceína; antagonistas de los receptores de taquinina, incluidos antagonistas de subtipo de receptores neuroquinina y neuroquinina₂; antagonistas de los receptores del péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP); antagonistas de los receptores de interleucina; inhibidores de enzimas activos en la vía sintética para metabolitos de ácido araquidónico, incluidos inhibidores de la isoforma PLA₂ e inhibidores de la isoforma PLC γ , inhibidores de ciclooxigenasa (COX) (que pueden ser o bien COX-1, COX-2 o inhibidores de COX-1 y -2 no selectivos), inhibidores de lipooxigenasa; antagonistas de los receptores de prostanoïdes incluidos antagonistas de los subtipos de receptores de ecosanoïdes EP-1 y EP-4 y antagonistas de los subtipos de receptores de tromboxano; antagonistas de los receptores de leucotrienos incluidos los antagonistas de los subtipos de receptores de leucotrienos B4 y antagonistas de los subtipos de receptores de leucotrienos D4; agonistas de los receptores de opioides, incluidos agonista de los subtipos de receptores de μ -opioides, δ -opioides y κ -opioides; agonistas y antagonistas de purinoceptores incluidos antagonistas de receptores P_{2X} y P_{2Y}; abridores de los canales de potasio sensibles a trifosfato (ATP); inhibidores de MAP cinasa; inhibidores de acetilcolina nicotínicos; y agonistas de los receptores alfa adrenérgicos (incluidos agonistas de alfa-1, alfa-2 y alf-1 y 2 no selectivos).

Cuando se usa en la prevención o el tratamiento de restenosis, el agente inhibidor de MASP-2 de la presente invención puede combinarse con uno o más agentes anti-restenosis para administración concomitante. Los agentes anti-restenosis adecuados incluyen: agentes antiplaquetarios incluidos inhibidores y antagonistas de receptores de trombinas, antagonistas de los receptores de adenosina difosfato (ADP) (también conocidos como antagonistas de los receptores del purinoceptor₁), inhibidores y antagonistas de los receptores de tromboxano y antagonistas de los receptores de glucoproteínas de la membrana plaquetaria; inhibidores de las moléculas de adhesión celular, incluidos inhibidores de selectina e inhibidores de integrina; agentes anti-quimiotácticos; antagonistas de los receptores de interleucina; e inhibidores de señalización intracelular incluidos: inhibidores de la proteína cinasa C (PKC) y proteína tirosina fosfatasa, moduladores de proteína tirosina cinasa intracelular, inhibidores de dominios de homología₂ de src (SH2) y antagonistas de los canales de calcio.

Los agentes inhibidores de MASP-2 de la presente invención se pueden administrar también en combinación con uno o más de otros inhibidores del complemento. Ningún inhibidor del complemento está actualmente aprobado para uso en seres humanos, no obstante, se ha demostrado que algunos agentes farmacológicos bloquean el complemento *in vivo*. Muchos de estos agentes son también tóxicos o son inhibidores solamente parciales (Asghar, S.S., *Pharmacol. Rev.* 36:223-44, 1984), y el uso de los mismos ha sido limitado al uso como herramientas de investigación. K76COOH y mesilato de nafamstat son dos agentes que han demostrado cierta eficacia en modelos animales de trasplante (Miyagawa, S., et al., *Transplant Proc.* 24:483-484, 1992). También se ha demostrado que las heparinas de bajo peso molecular son eficaces para regular la actividad del complemento (Edens, R.E., et al., *Complement Today*, pág. 96-120, Basel: Karger, 1993). Se cree que estos inhibidores de moléculas pequeñas pueden ser útiles como agentes para usar en combinación con los agentes inhibidores de MASP-2 de la presente invención.

Otros inhibidores del complemento naturales pueden ser útiles en combinación con los agentes inhibidores de MASP-2 de la presente invención. Los inhibidores biológicos del complemento incluyen el factor del complemento soluble 1 (sCRI). Este inhibidor natural se puede hallar en la membrana exterior de las células humanas. Otros inhibidores de membranas incluyen DAF, MCP y CD59. Se han ensayado formas recombinantes por su actividad anti-complemento *in vitro* e *in vivo*. Se ha demostrado que sCRI es eficaz en el xenotrasplante, en donde el sistema del complemento (tanto de la vía alternativa como de la clásica) desencadena el síndrome de rechazo hiperactivo al cabo de minutos de perfundir la sangre por el órgano recién trasplantado (Platt J.L., et al., *Immunol. Today* 77:450-6, 1990; Marino I.R., et al., *Transplant Proc.* 1071:6, 1990; Johnstone, P.S., et al., *Transplantation* 54:573-6, 1992). El uso de sCRI protege y extiende el tiempo de supervivencia del órgano trasplantado, implicando a la vía del complemento en la patogénesis de la supervivencia del órgano (Leventhal, J.R. et al., *Transplantation* 55:857-66, 1993; Pruitt, S.K., et al., *Transplantation* 57:363-70, 1994).

Los inhibidores del complemento adicionales adecuados para uso en combinación con las composiciones de la presente invención también incluyen, a modo de ejemplo, MoAb tales como aquellos desarrollados por Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut, y MoAb anti-properdina.

Cuando se usan en el tratamiento de las artritis (p. ej., artrosis y artritis reumatoïdea), los agentes inhibidores de MASP-2 de la presente invención se pueden combinar con uno o más agentes condroprotectores, que pueden incluir uno o más promotores de anabolismo del cartílago y/o uno o más inhibidores de catabolismo del cartílago, y

adecuadamente tanto un agente anabólico como un agente inhibidor catabólico, para administración concomitante. Los agentes condroprotectores de promoción anabólica adecuados incluyen agonistas de los receptores de interleucina (IL) incluidos IL-4, IL-10, IL-13, rhIL-4, rhIL-10 y rhIL-13, e IL-4, IL-10 o IL-13 quimérica; agonistas de la superfamilia del factor- β de crecimiento transformador, incluidos TGF- β , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, proteínas morfogénicas óseas incluidas BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 (OP-1) y OP-2/BMP-8, factores de diferenciación del crecimiento incluidos GDF-5, GDF-6 y GDF-7, TGF- β y BMP recombinantes, y TGF- β y BMP quiméricos; factores de crecimiento de tipo insulina incluidos IGF-1; y factores de crecimiento de fibroblastos incluidos bFGF. Los agentes condroprotectores inhibidores catabólicos adecuados incluyen antagonistas de los receptores de interleucina-1 (IL-1) (IL-1ra), incluidos los receptores de IL-1 humana soluble (shuIL-1R), rshuIL-1R, rhIL-1ra, anticuerpo anti-IL1, AF11567 y AF12198; antagonistas de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (TNF- α), incluidos los receptores solubles que incluyen sTNFR1 y sTNFR2, receptores solubles de TNF recombinante y receptores solubles de TNF quimérico incluidos rhTNFR:Fc quimérico, receptores solubles de fusión de Fc y anticuerpos anti-TNF; inhibidores de ciclooxigenasa-2 (específicos de COX-2), incluidos 697, SC-58451, celecoxib, rofecoxib, nimesulide, diclofenac, meloxicam, piroxicam, NS-398, RS-57067, SC-57666, SC-58125, flosulide, etodolac, L-745,337 y DFU-T-614; inhibidores de proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), incluidos inhibidores de ERK1, ERK2, SAPK1, SAPK2a, SAPK2b, SAPK2d, SAPK3, incluidos inhibidores de SB 203580, SB 203580 yodo, SB202190, SB 242235, SB 220025, RWJ 67657, RWJ 68354, FR 133605, L-167307, PD 98059, PD 169316; inhibidores del factor nuclear kappa B (NFkB), incluidos éster fenilético de ácido cafeico (CAPE), DM-CAPE, péptido SN-50, ditiocarbamato de himenialdisina y pirrolidona; inhibidores de óxido nítrico sintasa (NOS), incluidos N⁶-monometil-L-arginina, 1400W, difenilenoyodo, S-metil isotiourea, S-(aminoetil) isotiourea, L-N⁶-(l-iminoetil)lisina, 1,3-PBITU, 2-etil-2-tiopseudourea, aminoguanidina, N⁽¹⁾-nitro-L-arginina y N⁽¹⁾-nitro-L-arginina metil éster, inhibidores de metaloproteinasas de matriz (MMP), incluidos inhibidores de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14 y MMP-15, e incluidos U-24522, minociclina, 4-Abz-Gly-Pro-D-Leu-D-Ala-NHOH, Ac-Arg-Cys-Gly-Val-Pro-Asp-NH₂, TIMP1 humano, TIMP2 humano y fosforoamidón; moléculas de adhesión celular, incluidos agonistas y antagonistas de integrina, incluidos α V β 3 MoAb LM 609 y equistatina; agentes anti-quimiotácticos incluidos receptores de F-Met-Leu-Phe, receptores de IL-8, receptores de MCP-1 y receptores de MIP1-I/RANTES; inhibidores de señalización intracelular, incluidos (a) inhibidores de proteína cinasa, incluidos (i) inhibidores de proteína cinasa C (PKC) (isozima) incluida calfostatina C, G-6203 y GF 109203X, y (ii) inhibidores de proteína tirosina cinasa; (b) moduladores de proteína tirosina fosfatasa intracelulares (PTPases); y (c) inhibidores de dominios SH2 (dominios de Homología₂ src).

Para algunas aplicaciones, puede ser beneficioso administrar los agentes inhibidores de MASP-2 de la presente invención en combinación con un agente inhibidor de espasmos. Por ejemplo, para aplicaciones urogenitales, puede ser beneficioso incluir por lo menos un agente inhibidor de espasmos del músculo liso y/o por lo menos un agente anti-inflamación, y para procedimientos vasculares puede ser útil incluir por lo menos un inhibidor de vasoespasmos y/o por lo menos un agente anti-inflamación y/o por lo menos un agente anti-restenosis. Los ejemplos adecuados de agentes inhibidores de espasmos incluyen antagonistas de los subtipos de receptores de serotonina₂; antagonistas de los receptores de taquiquinina; donantes de óxido nítrico; abridores de los canales de calcio sensibles a ATP; antagonistas de los canales de calcio; y antagonistas de los receptores de endotelina.

Vehículos farmacéuticos y vehículos de administración

En general, las composiciones del agente inhibidor de MASP-2 de la presente invención, combinadas con cualquier otro agente terapéutico seleccionado, están adecuadamente contenidas en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo es no tóxico y biocompatible y se selecciona como para no afectar perjudicialmente la actividad biológica del agente inhibidor de MASP-2 (y cualquier otro agente combinado con estos). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ilustrativos para péptidos se describen en la patente estadounidense núm. 5.211.657 para Yamada. Los anticuerpos anti-MASP-2 y los péptidos inhibidores útiles en la invención se pueden formular en preparaciones en formas sólida, semisólida, en gel, líquida o gaseosa, tal como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, disoluciones, supositorios, inhalantes e inyecciones que permiten la administración oral, parenteral o quirúrgica. La invención también contempla la administración local de las composiciones recubriendo los dispositivos médicos y similares.

Los vehículos adecuados para administración parenteral por inyección, infusión o irrigación, o tópica incluyen agua destilada, disolución salina fisiológica tamponada con fosfato, disoluciones de Ringer normales o lactadas, disolución de dextrosa, disolución de Hank o propanodiol. Además, los aceites estériles, fijos pueden emplearse como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, puede emplearse cualquier aceite biocompatible incluidos mono o diglicéridos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables. El vehículo y el agente se pueden combinar como un líquido, suspensión, gel polimerizable o no polimerizable, pasta o bálsamo.

El vehículo puede comprender también un vehículo de administración para sostener (es decir, extender, demorar o regular) la administración del agente(s) o para potenciar la administración, absorción, estabilidad o farmacocinética del agente(s) terapéutico. Dicho vehículo de administración puede incluir, a modo de ejemplo no limitativo, micropartículas, microesferas, nanoesferas o nanopartículas compuestas por proteínas, liposomas, carbohidratos, compuestos orgánicos sintéticos, compuestos inorgánicos, hidrogeles poliméricos o copoliméricos y micelas poliméricas. Los sistemas de administración adecuados de hidrogel y micelas incluyen los copolímeros de

PEO:PHB:PEO y los complejos de copolímero/ciclodextrina descritos en el documento WO 2004/009664 A2 y PEO y los complejos de PEO/ciclodextrina descritos en el documento US 2002/0019369 A1. Dichos hidrogeles se pueden inyectar localmente en el sitio de acción destinado o por vía subcutánea o intramuscular para formar una formulación de liberación sostenida.

- 5 Para administración intra-articular, el agente inhibidor de MASP-2 se puede transportar en los vehículos líquidos o geles anteriormente descritos que son inyectables, en los vehículos de administración sostenida anteriormente descritos que son inyectables o en ácido hialurónico o un derivado de ácido hialurónico.

Para administración oral de agentes no peptidérgicos, el agente inhibidor de MASP-2 se puede transportar en una carga o diluyente inerte tal como sacarosa, almidón de maíz o celulosa.

- 10 Para administración tópica, el agente inhibidor de MASP-2 se puede transportar en un ungüento, loción, crema, gel, gota, supositorio, aerosol, líquido o polvo, o en gel o sistemas de administración microcapsular mediante un parche transdérmico.

- 15 Diversos sistemas de administración nasal y pulmonar, incluidos aerosoles, inhaladores dosificadores, inhaladores en polvo seco y nebulizadores están siendo desarrollados y pueden adaptarse adecuadamente para administración de la presente invención en un vehículo de administración en aerosol, inhalante o nebulizador, respectivamente.

Para administración intratecal (IT) o intracerebroventricular (ICV), se pueden usar los sistemas de administración apropiadamente estériles (p. ej., líquidos, geles, suspensiones, etc.) para administrar la presente invención.

- 20 Las composiciones de la presente invención pueden también incluir excipientes biocompatibles, tales como agentes de dispersión o humectantes, agentes de suspensión, diluyentes, tampones, potenciadores de penetración, emulsionantes, aglutinantes, espesantes, saporíferos (para administración oral).

Vehículos farmacéuticos para anticuerpos y péptidos

- 25 Más específicamente con respecto a anticuerpos anti-MASP-2 y péptidos inhibidores, las formulaciones ilustrativas pueden administrarse por vía parenteral como formulaciones inyectables de una disolución o suspensión del compuesto en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceites, disolución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, las sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponantes de pH y similares pueden estar presentes en composiciones que comprenden anticuerpos anti-MASP-2 y péptidos inhibidores. Los componentes adicionales de las composiciones farmacéuticas incluyen petróleo (tal como de origen animal, vegetal o sintético), por ejemplo, aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos para disoluciones inyectables.
- 30

Los anticuerpos anti-MASP-2 y los péptidos inhibidores pueden también administrarse en la forma de una inyección de liberación lenta o preparación de implante que se puede formular en un modo tal como para permitir una liberación sostenida o pulsátil de los agentes activos.

Vehículos farmacéuticamente aceptables para inhibidores de expresión

- 35 Más específicamente con respecto a los inhibidores de expresión útiles en los métodos de la invención, se dan a conocer composiciones que comprenden un inhibidor de expresión tal como se describió anteriormente y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición puede además comprender un sistema de dispersión coloidal.

- 40 Las composiciones farmacéuticas que incluyen inhibidores de expresión pueden incluir, aunque sin limitarse a ello, disoluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una diversidad de componentes que incluyen, aunque sin limitarse a ello, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes. La preparación de dichas composiciones típicamente implica combinar el inhibidor de expresión con uno o más de los siguientes tampones, antioxidantes, polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas, aminoácidos, carbohidratos incluidos glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, glutatión y otros estabilizantes y excipientes. La disolución salina tamponada neutra o la disolución salina mezclada con albumina de suero no específica son ejemplos de diluyentes adecuados.
- 45

- En algunas realizaciones, las composiciones se pueden preparar y formular como emulsiones que son típicamente sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en la forma de gotitas (véase, Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Vol. 1, Rieger and Banker (eds.), Marcek Dekker, Inc., N.Y., 1988). Los ejemplos de emulsionantes naturales en formulaciones en emulsión incluyen goma arábiga, cera de abejas, lanolina, lecitina y fosfatidas.
- 50

En una realización, las composiciones que incluyen ácidos nucleicos se pueden formular como microemulsiones. Una microemulsión, tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a un sistema de agua, aceite y anfífilos, que es una disolución líquida termodinámicamente estable y ópticamente isotrópica simple (véase Rosoff en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Vol. 1). El método de la invención también puede usar liposomas para la

transferencia y administración de oligonucleótidos antisentido al sitio deseado.

Las composiciones farmacéuticas y las formulaciones de inhibidores de expresión para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Se pueden emplear vehículos farmacéuticos convencionales, así como también bases acuosas, en polvo u oleosas, y espesantes y similares.

Modos de administración

Las composiciones farmacéuticas que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 se pueden administrar en una diversidad de formas dependiendo de si lo más adecuado es un modo local o sistémico de administración para la afección que se esté tratando. Además, como se describió anteriormente en la presente invención con respecto a los procedimientos de reperfusión extracorpórea, los agentes inhibidores de MASP-2 se pueden administrar a través de la introducción de las composiciones de la presente invención a la sangre o el plasma recirculante. A su vez, las composiciones de la presente invención se pueden administrar recubriendo o incorporando las composiciones en un dispositivo médico.

Administración sistémica

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "administración sistémica" tiene como fin incluir, aunque sin limitarse a ello, las rutas orales y parenterales, incluida la ruta intramuscular (IM), subcutánea, intravenosa (IV), intra-arterial, de inhalación, sublingual, bucal, tópica, transdérmica, nasal, rectal, vaginal y otras rutas de administración, que resulta eficazmente en la dispersión del agente administrado a uno o múltiples sitios de acción terapéutica prevista. Las rutas preferidas de administración sistémica para las presentes composiciones incluyen la ruta intravenosa, intramuscular, subcutánea y de inhalación. Se ha de apreciar que la ruta de administración sistémica exacta para los agentes seleccionados utilizados en las composiciones particulares de la presente invención se determinará en parte en función de la susceptibilidad del agente a las vías de transformación metabólica asociadas con una ruta de administración determinada. Por ejemplo, los agentes peptidérgicos pueden administrarse de la forma más adecuadas por rutas que no sean la ruta oral.

Los anticuerpos y polipéptidos inhibidores de MASP-2 se pueden administrar a un sujeto que lo necesita por cualquier medio adecuado. Los métodos de administración de anticuerpos y polipéptidos de MASP-2 incluyen la administración por las rutas de administración oral, pulmonar, parenteral (p. ej., inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (IV) o subcutánea), inhalación (como mediante la formulación de un polvo fino), transdérmica, nasal, vaginal, rectal o sublingual, y se pueden formular en formas de dosificación adecuadas para cada ruta de administración.

A modo de ejemplo representativo, los anticuerpos y péptidos inhibidores de MASP-2 se pueden introducir a un cuerpo vivo por aplicación a una membrana corporal capaz de absorber los polipéptidos, por ejemplo, las membranas nasales, gastrointestinales y rectales. Los polipéptidos típicamente se aplican a la membrana absorbente junto con un potenciador de penetración. (véanse, p. ej., Lee, V.H.L., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* 5:69, 1988; Lee, V.H.L., *J. Controlled Release* 13:213, 1990; Lee, V.H.L., Ed., *Peptide and Protein Drug Delivery*, Marcel Dekker, Nueva York (1991); DeBoer, A.G., et al., *J. Controlled Release*, 13:241, 1990). Por ejemplo, STDHF es un derivado sintético de ácido fusídico, un tensioactivo esteroideo que es similar en estructura a las sales biliares, y se ha utilizado como potenciador de penetración para administración nasal. (Lee, W.A., *Biopharm.* 22, Nov./Dic. 1990.)

Los anticuerpos y polipéptidos inhibidores de MASP-2 se pueden introducir en asociación con otra molécula, tal como un lípido, para proteger a los polipéptidos de la degradación enzimática. Por ejemplo, la unión covalente de los polímeros, especialmente polietilenglicol (PEG), se ha utilizado para proteger a ciertas proteínas de la hidrólisis enzimática en el cuerpo y prolongar así la semivida (Fuertges, F., et al., *J. Controlled Release* 11:139, 1990). Se han descrito muchos sistemas poliméricos para la administración de proteínas (Bae, Y.H., et al., *J. Controlled Release* 9:211, 1989; Hori, R., et al., *Pharm. Res.* 5:813, 1989; Yamakawa, I., et al., *J. Pharm. Sci.* 79:505, 1990; Yoshihiro, I., et al., *J. Controlled Release* 70:195, 1989; Asano, M., et al., *J. Controlled Release* 9:111, 1989; Rosenblatt, J., et al., *J. Controlled Release* 9:195, 1989; Makino, K., *J. Controlled Release* 72:235, 1990; Takakura, Y., et al., *J. Pharm. Sci.* 78:117, 1989; Takakura, Y., et al., *J. Pharm. Sci.* 78:219, 1989).

Recientemente, se han desarrollado liposomas con mejor estabilidad y semivida en la circulación en suero (véase, p. ej., la patente estadounidense núm. 5.741.516 para Webb). Asimismo, se han revisado diversos métodos de preparaciones de liposomas y de tipo liposomas como vehículos de fármacos potenciales (véanse, p. ej., la patente estadounidense núm. 5.567.434 para Szoka; patente estadounidense núm. 5.552.157 para Yagi; patente estadounidense núm. 5.565.213 para Nakamori; patente estadounidense num. 5.738.868 para Shinkarenko; y patente estadounidense núm. 5.795.587 para Gao).

Para aplicaciones transdérmicas, los anticuerpos y polipéptidos inhibidores de MASP-2 se pueden combinar con otros ingredientes adecuados, tales como vehículos y/o adyuvantes. No hay limitaciones con respecto a la naturaleza de dichos otros ingredientes, excepto que deben ser farmacéuticamente aceptables para la administración prevista, y no pueden degradar la actividad de los ingredientes activos de la composición. Los

ejemplos de vehículos adecuados incluyen ungüentos, cremas, geles o suspensiones, con o sin colágeno purificado. Los anticuerpos y polipéptidos inhibidores de MASP-2 pueden también impregnarse en parches transdérmicos, yesos y vendas, preferiblemente en forma líquida o semilíquida.

5 Las composiciones para uso en la presente invención se pueden administrar sistémicamente en forma periódica en intervalos determinados para mantener un nivel deseado de efecto terapéutico. Por ejemplo, las composiciones se pueden administrar por inyección subcutánea, cada dos a cuatro semanas o en intervalos menos frecuentes. El esquema de dosificación será determinado por el médico, teniendo en cuenta diversos factores que pueden influir en la acción de la combinación de agentes. Estos factores incluirán el grado de progreso de la afección que se esté tratando, la edad, el sexo y el peso del paciente, y otros factores clínicos. La dosis para cada agente individual
10 variará como una función del agente inhibidor de MASP-2 que se incluya en la composición, además de la presencia y naturaleza de cualquier vehículo de administración de fármacos (p. ej., un vehículo de liberación sostenida). A su vez, la cantidad de la dosis se podrá ajustar para que represente una variación en la frecuencia de la administración y en la conducta farmacocinética del agente(s) administrado.

Administración local

15 Tal como se emplea en la presente memoria, el término "local" abarca la aplicación de un fármaco en o alrededor de un sitio de acción localizada prevista, y puede incluir, por ejemplo, la administración tópica a la piel u otros tejidos afectados, administración oftálmica, intratecal (IT), intracerebroventricular (ICV), intra-articular, intracavitaria, intracraneal o intravesicular, colocación o irrigación. Se puede preferir la administración local para posibilitar la administración de una dosis inferior, a fin de evitar efectos colaterales sistémicos, y para un control más preciso del
20 tiempo de administración y concentración de los agentes activos en el sitio de administración local. La administración local proporciona una concentración conocida en el sitio diana, independientemente de la variabilidad entre pacientes en el metabolismo, el torrente circulatorio, etc. El control de la dosis mejorado también se provee mediante el modo directo de administración.

25 La administración local de un agente inhibidor de MASP-2 se puede lograr en el contexto de métodos quirúrgicos para tratar una enfermedad o afección, tal como por ejemplo durante procedimientos de cirugía de derivación arterial, aterectomía, procedimientos con láser, procedimientos ultrasónicos, angioplastia con globo y colocación de stent. Por ejemplo, un inhibidor de MASP-2 se puede administrar a un sujeto junto con un procedimiento de angioplastia con globo. Un procedimiento de angioplastia con globo implica insertar un catéter que tiene un globo desinflado en una arteria. El globo desinflado se posiciona próximo a la placa aterosclerótica y se infla de manera tal
30 que la placa queda comprimida contra la pared vascular. En consecuencia, la superficie del globo está en contacto con la capa de las células endoteliales vasculares en la superficie del vaso sanguíneo. El agente inhibidor de MASP-2 puede unirse al catéter de angioplastia con globo en un modo que permita la liberación del agente en el sitio de la placa aterosclerótica. El agente se puede unir al catéter con globo de acuerdo con procedimientos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, el agente se puede conservar en un compartimiento del catéter con globo hasta que el globo se infla, momento en el cual se libera al entorno local. Alternativamente, el agente se puede impregnar en la superficie del globo, de modo tal de entrar en contacto con las células de la pared arterial a medida que el globo se infla. El agente puede también administrarse en un catéter con globo perforado tal como aquellos descritos en Flugelman, M.Y., et al., *Circulation* 85\ 1110-1117, 1992. Véase también la solicitud PCT WO 95/23161
40 publicada para un procedimiento ilustrativo de como acoplar una proteína terapéutica a un catéter de angioplastia con globo. Asimismo, el agente inhibidor de MASP-2 puede incluirse en un gel o recubrimiento polimérico aplicado a un stent, o puede incorporarse al material del stent, de manera tal que el stent eluya el agente inhibidor de MASP-2 después de la colocación vascular.

45 Las composiciones inhibidoras de MASP-2 utilizadas en el tratamiento de artritis y otros trastornos musculoesqueléticos se pueden administrar localmente por inyección intra-articular. Dichas composiciones pueden adecuadamente incluir un vehículo de liberación sostenida. Como otro ejemplo de casos en los que puede ser conveniente la administración local, las composiciones inhibidoras de MASP-2 utilizadas en el tratamiento de afecciones urogenitales puede instilarse adecuadamente en forma intravesical o dentro de otra estructura urogenital.

Recubrimientos en un dispositivo médico

50 Los agentes inhibidores de MASP-2 tales como anticuerpos y péptidos inhibidores se pueden inmovilizar en (o dentro) de una superficie de un dispositivo médico implantable o acoplable. La superficie modificada típicamente estará en contacto con el tejido vivo después del implante al cuerpo de un animal. Por "dispositivo médico implantable o acoplable" se entiende cualquier dispositivo que se implante o acople al tejido del cuerpo de un animal, durante la operación normal del dispositivo (p. ej., stents y dispositivos de administración de fármacos implantables). Dichos dispositivos médicos implantables o acoplables pueden estar hechos de, por ejemplo, nitrocelulosa,
55 diazocelulosa, vidrio, poliestireno, polivinilcloruro, polipropileno, polietileno, dextrano, Sepharose, agar, almidón, nylon, acero inoxidable, titanio y polímeros biodegradables y/o biocompatibles. La unión de la proteína a un dispositivo se puede lograr con cualquier técnica que no destruya la actividad biológica de la proteína enlazada, por ejemplo acoplando uno o ambos residuos N-C-terminales de la proteína al dispositivo. El acoplamiento también se puede realizar en uno o más sitios internos en la proteína. Se pueden usar también múltiples acoplamientos (tanto
60 internos como en los extremos de la proteína). Una superficie de un dispositivo médico implantable o acoplable se

puede modificar para incluir grupos funcionales (p. ej., carboxilo, amida, amino, éter, hidroxilo, ciano, nitrido, sulfanamido, acetilnicotínico, epóxido, silánico, anhídrico, succinímico, azido) para inmovilizar allí las proteínas. Las químicas de acoplamiento incluyen, aunque sin limitarse a ello, la formación de ésteres, éteres, amidas, azido y derivados de sulfanamido, cianato y otros enlaces a los grupos funcionales disponibles en los anticuerpos de MASP-2 o péptidos inhibidores. Los anticuerpos o fragmentos inhibidores de MASP-2 también se pueden acoplar en forma no covalente por adición de un marcador de afinidad a la proteína, tal como GST (D.B. Smith y K.S. Johnson, *Gene* 67:31, 1988), polihistidinas (E. Hochuli et al., *J. Chromatog.* 411:11, 1987) o biotina. Dichos marcadores de afinidad se pueden usar para el acoplamiento reversible de la proteína a un dispositivo.

Las proteínas también se pueden unir en forma covalente a la superficie del cuerpo de un dispositivo, por ejemplo, por activación covalente de la superficie del dispositivo médico. A modo de ejemplo representativo, la proteína(s) matricelular se puede acoplar al cuerpo del dispositivo mediante cualquiera de los siguientes pares de grupos reactivos (en donde un miembro del par está presente en la superficie del cuerpo del dispositivo y el otro miembro del par está presente en la proteína(s) matricelular): ácido hidroxílico/carboxílico para producir un enlace éster; hidroxilo/anhídrido para producir un enlace éster; hidroxilo/isocianato para producir un enlace uretano. Una superficie del cuerpo de un dispositivo que no posee grupos reactivos útiles se puede tratar con grabado de plasma por descarga de radiofrecuencia (RFGD) para generar grupos reactivos con el fin de permitir la deposición de proteína(s) matricelular (p. ej., tratamiento de plasma con oxígeno para introducir grupos que contienen oxígeno; tratamiento de plasma con propilamino para introducir grupos amino).

Los agentes inhibidores de MASP-2 que comprenden moléculas de ácido nucleico tales como inhibidores de péptidos que codifican ARNi o ADN antisentido se pueden embeber en matrices porosas acopladas al cuerpo de un dispositivo. Las matrices porosas representativas útiles para preparar la capa superficial son aquellas preparadas a partir de tendón o colágeno dérmico, que se pueden obtener de una diversidad de fuentes comerciales (p. ej., Sigma y Collagen Corporation), o matrices de colágeno preparadas como se describe en las patentes estadounidenses núm. 4.394.370 para Jefferies y 4.975.527 para Koezuka. Un material de colágeno se denomina UltraFiber™ y se obtiene de Norian Corp. (Mountain View, California).

Ciertas matrices poliméricas pueden también emplearse, si se desea, e incluyen polímeros de éster acrílico y polímeros de ácido láctico, como se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses núm. 4.526.909 para Urist y 4.563.489 para Urist. Los ejemplos particulares de polímeros útiles son aquellos de ortoésteres, anhídridos, propileno-cofumaratos, o un polímero de uno o más monómeros de ácido α -hidroxicarboxílico, (p. ej., un ácido α -hidroxiacético (ácido glicólico) y/o un ácido α -hidroxipropiónico (ácido lactico)).

Esquemas de tratamiento

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto susceptible a, o que conlleva riesgo de, una afección asociada con la activación del complemento dependiente de MASP-2 en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo de desarrollar síntomas de la afección. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto del que se sospecha que padece, o que ya padece, una afección asociada con la activación del complemento dependiente de MASP-2 en una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para aliviar, o por lo menos reducir parcialmente, los síntomas de la afección. En ambos esquemas profilácticos y terapéuticos, las composiciones que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 se pueden administrar en varias dosis hasta lograr un resultado terapéutico suficiente en el sujeto. La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente invención se puede llevar a cabo por administración única de la composición, o en una secuencia limitada de administraciones, para el tratamiento de una afección aguda, p. ej., lesión por reperfusión u otra lesión traumática. Alternativamente, la composición se puede administrar en intervalos periódicos durante un periodo de tiempo extendido para el tratamiento de afecciones crónicas, p. ej., artritis o psoriasis.

Las composiciones para uso de la presente invención se pueden usar para inhibir la inflamación y procesos relacionados que típicamente resultan de procedimientos médicos y quirúrgicos diagnósticos y terapéuticos. Para inhibir dichos procedimientos, la composición inhibidora de MASP-2 de la presente invención se puede aplicar en un peri-procedimiento. Tal como se emplea en la presente memoria "peri-procedimiento" se refiere a la administración de la composición inhibidora pre-procedimiento y/o intra-procedimiento y/o post-procedimiento, es decir, antes del procedimiento, antes y durante el procedimiento, antes y después del procedimiento, antes, durante y después del procedimiento, durante el procedimiento, durante y después del procedimiento, o después del procedimiento. La aplicación peri-procedimiento se puede llevar a cabo por administración local de la composición al sitio quirúrgico o del procedimiento, como por inyección o irrigación continua o intermitente del sitio o por administración sistémica. Los métodos adecuados para la administración peri-operatoria local de disoluciones del agente inhibidor de MASP-2 se describen en las patentes estadounidenses núm. 6.420.432 para Demopulos y 6.645.168 para Demopulos. Los métodos adecuados para administración local de composiciones condroprotectoras incluido el agente(s) inhibidor de MASP-2 se describen en la solicitud de patente internacional PCT WO 01/07067 A2. Los métodos y composiciones adecuados para administración sistémica dirigida de composiciones condroprotectoras, incluido el agente(s) inhibidor de MASP-2, se describen en la solicitud de patente internacional PCT WO 03/063799 A2.

VI. Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran simplemente el mejor modo contemplado ahora para practicar la invención, pero no deben interpretarse como limitativos de la invención.

Ejemplo 1

- 5 Este ejemplo describe la generación de una cepa de ratón deficiente de MASP-2 (MASP-2^{-/-}) pero suficiente de MApl9 (MApl9^{+/+}).

10 **Materiales y métodos:** Se diseñó el vector de direccionamiento pKO-NTKV 1901 para alterar los tres exones que codifican el extremo C-terminal de MASP-2 murina, incluido el exón que codifica el dominio de serina proteasa, como se muestra en la FIGURA 4. Se usó PKO-NTKV 1901 para transfectar la línea celular ES, E14.1a (SV129 Ola). Se seleccionaron clones resistentes a neomicina y sensibles a timidina cinasa. Se seleccionaron 600 clones ES y, de estos, se identificaron cuatro clones diferentes y se verificó por análisis que contenían el evento de direccionamiento selectivo y la recombinación esperada, como se muestra en la FIGURA 4. Las quimeras se generaron a partir de estos cuatro clones positivos por transferencia de embriones. Las quimeras luego se retrocruzaron en el fondo de genes C57/BL6 para crear machos transgénicos. Los machos transgénicos se cruzaron con hembras para generar F1 en donde 50% de la descendencia mostró heterocigosidad para el gen *MASP-2* alterado. Los ratones heterocigotos se entrecruzaron para generar descendencia deficiente de MASP-2 de homocigotos, resultando en ratones heterocigotos y de tipo salvaje en la proporción de 1:2:1, respectivamente.

20 **Resultados y fenotipo:** Los ratones deficientes de MASP-2^{-/-} homocigotos resultantes se hallaron viables y fértiles, y se verificó que eran deficientes de MASP-2 por análisis Southern para confirmar el correcto evento de direccionamiento, por análisis Northern para confirmar la ausencia de ARNm de MASP-2 y por análisis Western para confirmar la ausencia de la proteína MASP-2 (no se muestran los datos). La presencia de ARNm de MApl9 y la ausencia de ARNm de MASP-2 se confirmaron además usando RT-PCR resuelta en tiempo en una máquina LightCycler. Los ratones MASP-2^{-/-} continúan expresando MApl9, MASP-1 y ARNm y proteína MASP-3 como se espera (no se muestran los datos). La presencia y abundancia de ARNm en los ratones MASP-2^{-/-} para Properdina, Factor B, Factor D, C4, C2 y C3 se evaluó por análisis LightCycler y se halló idéntico a aquel de los controles de la camada de tipo salvaje (no se muestran los datos). El plasma de los ratones MASP-2^{-/-} homocigotos es totalmente deficiente de la activación del complemento mediada por la vía de lectinas y la activación del complemento mediada por la vía alternativa, como se describe en más detalle en el Ejemplo 2.

30 **Generación de una cepa de MASP-2^{-/-} en un fondo C57BL6 puro:** Los ratones MASP-2^{-/-} se retrocruzan con una línea C57BL6 pura por nueve generaciones antes del uso de la cepa MASP-2^{-/-} como modelo animal experimental.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra que se requiere MASP-2 para la activación del complemento mediante la vía alternativa y la vía de lectinas.

Métodos y materiales:

35 **Ensayo de escisión de C4 específica de la vía de lectinas:** Se ha descrito un ensayo de escisión de C4 por Petersen, et al., *J. Immunol. Methods* 257:107 (2001) que mide la activación de la vía de lectinas resultante de ácido lipoteicoico (LTA) de *S. aureus*, que se une a L-ficolina. El ensayo descrito en el Ejemplo 11 se adaptó para medir la activación de la vía de lectinas mediante MBL recubriendo la placa con LPS y manano o cimosano antes de añadir suero de ratones MASP-2^{-/-} como se describe a continuación. El ensayo también se modificó para eliminar la posibilidad de la escisión de C4 debido a la vía clásica. Esto se logró utilizando un tampón de dilución de muestras que contenía NaCl 1 M, lo cual permite la unión de gran afinidad de los componentes de reconocimiento de la vía de lectinas a sus ligandos, pero evita la activación de C4 endógena, excluyendo así la participación de la vía clásica al disociar el complejo Cl. En síntesis, en las muestras de suero de ensayo modificadas (diluidas en gran cantidad de sal (tampón de NaCl 1 M) se añaden placas recubiertas con ligando, seguidas de la adición de una cantidad constante de C4 purificada en un tampón con una concentración fisiológica de sal. Los complejos de reconocimiento unidos que contienen MASP-2 escinden C4, generando la deposición de C4b.

Métodos de ensayo:

50 1) Placas de microtitulación Nunc Maxisorb (Maxisorb, Nunc, Cat. No. 442404, Fisher Scientific) se recubrieron con 1 µ/ml de manano (M7504 Sigma) o cualquier otro ligando (p. ej., los mencionados a continuación) diluido en tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM, pH 9,6).

Se emplearon los siguientes reactivos en el ensayo:

- a. manano (1 µg/pocillo manano (M7504 Sigma) en 100 µl tampón de recubrimiento);
- b. cimosano (1 µg/pocillo cimosano (Sigma) en 100 µl tampón de recubrimiento);

- c. LTA ($\mu\text{g/pocillo}$ en 100 μl tampón de recubrimiento o 2 $\mu\text{g/pocillo}$ en 20 μl metanol)
- d. 1 μg de Mab 4H5 específico de H-ficolina en tampón de recubrimiento
- e. PSA de *Aerococcus viridans* (2 $\mu\text{g/pocillo}$ en 100 μl tampón de recubrimiento)
- f. 100 $\mu\text{l/pocillo}$ de *S. aureus* DSM20233 fijada a formalina ($\text{OD}_{550}=0,5$) en tampón de recubrimiento.

5 2) Las placas se incubaron durante toda la noche a 4C.

3) Después de incubar durante toda la noche, los sitios de unión a la proteína residual se saturaron incubando las placas con tampón bloqueador HSA-TBS al 0,1% (0,1% (p/v) HSA en Tris-CL 10 mM, NaCl 140 mM, NaN₃ 1,5 mM, pH 7,4) durante 1-3 horas; luego lavando las placas 3X con TBS/tween/Ca²⁺ (TBS con 0,05% Tween 20 y CaCl₂ 5 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,4).

10 4) Las muestras de suero a ensayar se diluyeron en tampón de unión a MBL (NaCl 1 M) y las muestras diluidas se añadieron a las placas y se incubaron durante la noche a 4C. Los pocillos que recibieron solamente tampón se usaron como controles negativos.

15 5) Después de la incubación durante la noche a 4 °C, las placas se lavaron 3X con TBS/tween/Ca²⁺. C4 humano (100 $\mu\text{l/pocillo}$ de 1 $\mu\text{g/ml}$ diluido en BBS (barbital 4 mM, NaCl 145 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,4)) se añadió luego a las placas y se incubó durante 90 minutos a 37 °C. Las placas se lavaron nuevamente 3X con TBS/tween/Ca²⁺.

6) Se detectó la deposición de C4b con un C4c antihumano de pollo conjugado a fosfatasa alcalina (diluido 1:1000 en TBS/tween/Ca²⁺, que se añadió a las placas y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron luego nuevamente 3X con TBS/tween/Ca²⁺.

20 7) Se detectó fosfatasa alcalina añadiendo 100 μl de disolución de sustrato de p-nitrofenil fosfato, incubando a temperatura ambiente durante 20 minutos y leyendo la OD405 en una lectora de placas de microtitulación.

25 Resultados: Las FIGURAS 6A-B muestran la cantidad de deposición de C4b en manano (FIGURA 6A) y cimosano (FIGURA 6B) en diluciones en suero de MASP-2+/+ (cruces), MASP-2+/- (círculos cerrados) y MASP-2-/- (triángulos cerrados). La FIGURA 6C muestra la actividad relativa de la convertasa C4 en las placas recubiertas con cimosano (barras blancas) o manano (barras sombreadas) de ratones MASP-2-/+ (n=5) y ratones MASP-2-/- (n=4) en relación con ratones de tipo salvaje (n=5) en base a la medición de la cantidad de deposición de C4b normalizado al suero de tipo salvaje. Las barras de error representan la desviación estándar. Como se muestra en las FIGURAS 6A-C, el plasma de ratones MASP-2-/- es totalmente deficiente de la activación del complemento mediada por la vía de lectinas en placas recubiertas con manano y cimosano. Estos resultados demuestran claramente que MASP-2, pero no MASP-1 ni MASP-3, es el componente efector de la vía de lectinas.

30 Ensayo de deposición de C3b:

1) Se recubren placas de microtitulación Nunc Maxisorb (Maxisorb, Nunc, cat. No. 442404, Fisher Scientific) con 1 $\mu\text{g/pocillo}$ manano (M7504 Sigma) o cualquier otro ligando diluido en tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM, pH 9,6) y se incuba durante toda la noche a 4° C.

35 2) Se saturan sitios de unión a proteína residual incubando la placa con tampón de bloqueo HSA-TBS al 0,1% (0,1% (p/v) HSA en Tris-CL 10 mM, NaCl 140 mM, NaN₃ 1,5 mM, pH 7,4) durante 1-3 horas.

40 3) Las placas se lavan en TBS/tw/Ca⁺⁺ (TBS con 0,05% Tween 20 y CaCl₂ 5 mM) y se añade BBS diluido a las muestras de suero (barbital 4 mM, NaCl 145 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,4). Los pocillos que reciben solamente tampón se usan como controles negativos. Un conjunto control de muestras de suero obtenidas de ratones MASP-2-/- de tipo salvaje se despojan de C1q antes del uso en el ensayo. El suero de los ratones despojados de C1q se preparó usando Dynabeads acoplados a la proteína A (Dynal Biotech, Oslo, Noruega) recubiertas con C11q IgG antihumano de conejo (Dako, Glostmp, Dinamarca), de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

45 4) Después de incubar durante toda la noche a 4C y de otro lavado con TBS/tw/Ca⁺⁺, se detecta C3 convertida y unida con anticuerpo C3c antihumano policlonal (Dako A 062) diluido en TBS/tw/Ca⁺⁺ a 1:1000). El anticuerpo secundario es IgG anticonejo de cabra (molécula entera) conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma Immunochemicals A-3812) diluido 1:10.000 en TBS/tw/Ca⁺⁺. La presencia de la vía del complemento alternativa (AP) se determina por adición de 100 μl disolución de sustrato (conjuntos de comprimidos de nitrofenilfosfato Sigma Fast, Sigma) y se incuba a temperatura ambiente. La hidrólisis se supervisa cuantitativamente midiendo la absorción a 405 nm en una lectora de placas de microtitulación. Se prepara una curva estándar para cada análisis, usando diluciones en serie de muestras de plasma/suero.

Resultados: Los resultados que se muestran en las FIGURAS 7A y 7B son de sueros mezclados de varios ratones. Las cruces representan suero de MASP-2+/+, los círculos rellenos representan suero de MASP-2+/+ desprovistos de C1q, los cuadrados abiertos representan suero de MASP-2-/- y los triángulos abiertos representan suero de MASP-2-/- desprovistos de C1q. Como se muestra en las FIGURAS 7A-B, el suero de los ratones MASP-2-/- ensayados en un ensayo de deposición de C3b produce niveles muy bajos de activación de C3 en placas recubiertas de manano (FIGURA 7A) y cimosano (FIGURA 7B). Este resultado demuestra claramente que se requiere MASP-2 para contribuir a la generación inicial de C3b proveniente de C3 para iniciar la vía del complemento alternativa. Este es un resultado sorprendente en función de la visión ampliamente aceptada de que los factores del complemento C3, el factor B, el factor D y properdina forman una vía alternativa funcional independiente en la que C3 puede someterse a un cambio de configuración conformacional espontáneo a una forma de "tipo C3b" que luego genera convertasa de fase fluida iC3Bb y deposita moléculas C3b en las superficies de activación tales como cimosano.

MASP-2 recombinante reconstituye la activación de C4 dependiente de la vías de lectinas en suero de ratones MASP-2-/-

Con el fin de establecer que la ausencia de MASP-2 fue la causa directa de la pérdida de la activación de C4 dependiente de lectinas en los ratones MASP-2-/-, se examinó el efecto de añadir proteína MASP-2 recombinante a muestras de suero en el ensayo de escisión de C4 anteriormente descrito. Se produjeron proteínas recombinantes de MASP-2 murina funcionalmente activa y MASP-2A murina catalíticamente inactiva (en donde el residuo serina del sitio activo en el dominio de serina proteasa se sustituyó con el residuo alanina), y se purificaron como se describe a continuación en el Ejemplo 5. El suero agrupado de ratones 4 MASP-2 -/- se pre-incubó con concentraciones de proteína en aumento de MASP-2 murina recombinante o MASP-2A murina recombinante inactiva y se ensayó la actividad de la convertasa C4 como se describió anteriormente.

Resultados: Como se muestra en la FIGURA 8, la adición de la proteína MASP-2 recombinante murina funcionalmente activa (se muestra como triángulos abiertos) al suero obtenido de los ratones MASP-2 -/- restauró la activación de C4 dependiente de la vía de lectinas en un modo dependiente de la concentración de la proteína, mientras que la proteína MASP-2A murina catalíticamente inactiva (se muestra como asteriscos) no restauró la activación de C4. Los resultados que se muestran en la FIGURA 8 se normalizan a la activación de C4 observada con el suero de ratón de tipo salvaje mezclado (se muestra como una línea de puntos).

Ejemplo 3

Este ejemplo describe la generación de una cepa de ratón transgénico que es MASP-2-/- murina, M^{Ap}9+/+ y que expresa un transgen de MASP-2 humano (gen inactivado de MASP-2 murina (knock-out) y gen modificado de MASP-2 humana (knock-in)).

Materiales y métodos: Se construyó un minigen que codifica MASP-2 humana llamado "mini hMASP-2" (SEC ID NO:49) como se muestra en la FIGURA 5, que incluye una región promotora del gen *MASP 2* humano, incluidos los primeros 3 exones (exón 1 a exón 3) seguido de secuencia de ADNc que representa la secuencia codificadora de los siguientes 8 exones, codificando así la proteína MASP-2 de longitud total promovida por su promotor endógeno. El constructo de mini hMASP-2 se inyectó en huevos fertilizados de MASP-2-/- con el fin de reemplazar el gen *MASP 2* murino deficiente por el de MASP-2 humana expresada en forma transgénica.

Ejemplo 4

Este ejemplo describe el aislamiento de la proteína MASP-2 humana en la forma de proenzima de suero humano.

Método de aislamiento de MASP-2 humana: Se ha descrito un método para aislar MASP-2 de suero humano en Matsushita et al., *J. Immunol.* 7(55):2637-2642, 2000. En síntesis, se pasa el suero humano por una columna de manano de levadura-Sepharose usando tampón de imidazol 10 mM (pH 6,0) que contiene NaCl 0,2 M, CaCl₂ 2,0 mM, NPGb 0,2 mM, p-APMSFy 20 μM 2% manitol. Las proenzimas MASP-1 y MASP-2 forman complejo con MBL y se eluye con el tampón anteriormente mencionado que contiene manosa 0,3 M. Para separar las proenzimas MASP-1 y MASP-2 de MBL, se aplican preparaciones que contienen el complejo a anti-MBL-Sepharose y luego se eluyen las MASP con tampón de imidazol que contiene EDTA 20 mM y NaCl 1 M. Finalmente, las proenzimas MASP-1 y MASP-2 se separan unas de otras pasando por anti-MASP-I-Sepharose en el mismo tampón que se usó para anti-MBL-Sepharose. Se recupera la MASP-2 en los efluentes, mientras que MASP-1 se eluye con tampón de glicina 0,1 M (pH 2,2).

Ejemplo 5

Este ejemplo describe la expresión recombinante y la producción de proteínas de MASP-2 humana, de rata y murina recombinante de longitud total, polipéptidos derivados de MASP-2 y formas mutantes catalíticamente activadas de MASP-2

Expresión de MASP-2 humana, murina y de rata de longitud total:

La secuencia de ADNc de longitud total de MASP-2 humana (SEC ID NO: 4) también se subclonó en el vector de

expresión mamífero pCI-Neo (Promega), que promueve la expresión eucariota bajo el control de la región del potenciador/promotor de CMV (se describe en Kaufman R.J. et al., *Nucleic Acids Research* 79:4485-90, 1991; Kaufman, *Methods in Enzymology*, 785:537-66 (1991)). El ADNc de ratón de longitud total (SEC ID NO:50) el ADNc de MASP-2 de rata (SEC ID NO:53) se subclonaron cada uno en el vector de expresión pED. Los vectores de expresión de MASP-2 se transfectaron luego a la línea celular de ovario de hámster chino adherente DXB1 usando el procedimiento de transfección de fosfato de calcio estándar descrito en Maniatis et al., 1989. Las células transfectadas con estos constructos se desarrollaron muy lentamente, implicando que la proteasa codificada es citotóxica.

En otro planteamiento, el constructo del minigen (SEC ID NO:49) que contiene ADNc humano de MASP-2 promovido por su promotor endógeno se transfecta transitoriamente a células de ovario de hámster chino (CHO). La proteína MASP-2 humana se segrega en el medio de cultivo y se aísla como se describe a continuación.

Expresión de MASP-2 catalíticamente inactiva de longitud total:

Fundamentos: La MASP-2 es activada por la escisión autocatalítica después de que los subcomponentes de reconocimiento MBL o ficolinas (o bien L-ficolina, H-ficolina o M-ficolina) se unen a su respectivo patrón de carbohidrato. La escisión autocatalítica que resulta en la activación de MASP-2 a menudo sucede durante el procedimiento de aislamiento de MASP-2 de suero, o durante la purificación que le sigue a la expresión recombinante. Con el fin de obtener una preparación de proteínas más estable para uso como antígeno, se creó una forma catalíticamente inactiva de MASP-2, diseñada como MASP-2A, que reemplaza el residuo serina que está presente en la tríada catalítica del dominio de proteasa con un residuo alanina en rata (SEC ID NO:55 Ser617 a Ala617); en ratón (SEC ID NO:52 Ser617 a Ala617); o en ser humano (SEC ID NO:3 Ser618 a Ala618).

Con el fin de generar proteínas MASP-2A humanas y murinas catalíticamente inactivas, se llevó a cabo mutagénesis dirigida al sitio usando los oligonucleótidos que se exponen en la TABLA 5. Los oligonucleótidos de la TABLA 5 se diseñaron para renaturalizar a la región del ADNc humano y murino que codifica la serina enzimáticamente activa y el oligonucleótido que contienen una incompatibilidad con el fin de cambiar el codón de serina al codón de alanina. Por ejemplo, se usaron oligonucleótidos PCR de SEC ID NOS:56-59 en combinación con ADNc de MASP-2 humana (SEC ID NO:4) para ampliar la región desde el codón de partida hasta la serina enzimáticamente activa y desde la serina hasta el codón finalizador para generar la lectura abierta completa de la MASP-2A mutada que contiene la mutación Ser618 a Ala618. Los productos de PCR se purificaron después de la electroforesis en gel de agarosa, y se generaron superposiciones de adenosina sencillas usando un procedimiento de factor de cola estándar. La MASP-2A con cola de adenosina se clonó luego al vector pGEM-T easy, transformada en *E. coli*.

Se generó una proteína MASP-2A de rata catalíticamente inactiva convirtiendo a cinasa y renaturalizando la SEC ID NO:64 y la SEC ID NO:65 combinando estos dos oligonucleótidos en cantidades molares equivalentes, calentando a 100 °C durante 2 minutos y enfriando lentamente hasta temperatura ambiente. El fragmento renaturalizado resultante tiene extremos compatibles con Pst1 y Xba1 y se insertó en lugar del fragmento Pst1-Xba1 de ADNc de MASP-2 de rata de tipo salvaje (SEC ID NO: 53) para generar MASP-2A de rata.

5 'GAGGTGACGCAGGAGGGGCATTAGTGTTC 3' (SEC ID NO: 64)

5' CTAGAAACACTAATGCCCTCTGCGTCACCTCTGCA 3' (SEC ID NO: 65)

Se subclonó MASP-2A humana, murina y de rata o bien en uno de los vectores de expresión de mamífero pED o pCI-Neo y se transfectó en la línea celular de ovario de hámster chino DXB1 como se describe a continuación.

En otro planteamiento, la forma catalíticamente inactiva de MASP-2 se construye usando el método descrito en Chen et al., *J. Biol. Chem.*, 276(28):25894-25902, 2001. En síntesis, el plásmido que contiene el ADNc de MASP-2 humano de longitud total (descrito en Thiel et al., *Nature* 386:506, 1997) se digiere con *Xho*I y *Eco*R1 y el ADNc de MASP-2 (descrito en la presente como SEC ID NO:4) se clona en los correspondientes sitios de restricción del vector de transferencia del baculovirus pFastBac1 (Life Technologies, NY). El sitio activo de serina proteasa de MASP-2 en Ser618 se altera luego a Ala618 sustituyendo los oligonucleótidos bicatenarios que codifican el aminoácido de la región peptídica 610-625 (SEC ID NO: 13) con los aminoácidos de la región nativa 610 a 625 para crear un polipéptido de longitud total de MASP-2 con un dominio de proteasa inactiva. Construcción de plásmidos de expresión que contienen regiones de polipéptidos derivados de Masp-2 humana.

Los siguientes constructos se producen usando el péptido de señales de MASP-2 (residuos 1-15 de SEC ID NO: 5) para segregar diversos dominios de MASP-2. Se prepara un constructo que expresa el dominio humano CUBI de MASP-2 (SEC ID NO:8) por PCR ampliando la región que codifica los residuos 1-121 de MASP-2 (SEC ID NO:6) (correspondientes al dominio N-terminal de CUBI). Se prepara un constructo que expresa el dominio humano CUBIEGF de MASP-2 (SEC ID NO:9) por PCR ampliando la región que codifica los residuos 1-166 de MASP-2 (SEC ID NO:6) (correspondientes al dominio N-terminal de CUBIEGF). Se prepara un constructo que expresa el dominio humano CUBIEGFCUBII de MASP-2 (SEC ID NO: 10) por PCR ampliando la región que codifica los residuos 1-293 de MASP-2 (SEC ID NO:6) (correspondientes al dominio N-terminal de CUBIEGFCUBII). Los dominios precedentemente mencionados se amplían por PCR usando Vent_R polimerasa y pBS-MASP-2 como molde, de acuerdo con métodos de PCR establecidos. La secuencia del cebador 5' del cebador sentido (5'-

5 CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' SEC ID NO:34) introduce un sitio de restricción *Bam*HI (subrayado) en el extremo 5' de los productos de PCR. Los cebadores antisentido para cada uno de los dominios de MASP-2, que se exponen a continuación en la TABLA 5 están diseñados para introducir un codón finalizador (negrita) seguido por un sitio *Eco*RI (subrayado) al final de cada producto de PCR. Una vez ampliados los fragmentos de ADN se digieren con *Bam*HI y *Eco*RI y se clonan en los sitios correspondientes del vector pFastBacl. Los constructos resultantes se caracterizan por mapeo de restricción y se confirman por secuenciación de ADNds.

TABLA 5: Cebadores de PCR para MASP-2)

Dominio de MASP-2	Cebador PCR en 5'	Cebador PCR en 3'
SEC ID NO:8 CUBI (aa 1-121 de SEC ID NO:6)	5 ' <u>CGGGATCC</u> ATGA GGCTGCTGACCCT C-3' (SEC ID NO:34)	5' <u>GGAATTC</u> CCTAGGCTGCAT A (SEC ID NO:35)
SEC ID NO:9 CUBIEGF (aa 1-166 de SEC ID NO:6)	5 ' <u>CGGGATCC</u> ATGA GGCTGCTGACCCT C-3' (SEC ID NO:34)	5 ' <u>GGA ATTC</u> TAC AGGGCGC T-3' (SEC ID NO:36)
SEC ID NO: 10 CUBIEGFCUBII (aa 1-293 de SEC ID NO:6)	5 ' <u>CGGGATCC</u> ATGA GGCTGCTGACCCT C-3' (SEC ID NO:34)	5 ' <u>GG AATTC</u> CTAGTAGTGGA T 3' (SEC ID NO:37)
SEC ID NO:4 MASP-2 humana	5'ATGAGGCTGCTG ACCTCCTGGGCC TTC 3' (SEC ID NO: 56)	5 'TTAAATCACTAATTATG TTCTCGATC 3' (SEC ID NO: 59) hMASP-2_inverso
SEC ID NO:4 ADNc de MASP-2 humana	5 CAGAGGTGACGC AGGAGGGGCAC 3' (SEC ID NO: 58) hMASP-2_ala_directo	5'GTGCCCTCCTGCGTCAC CTCTG 3' (SEC ID NO: 57) hMASP-2_ala_inverso
SEC ID NO:50 ADNc de MASP-2 murina	5'ATGAGGCTACTC ATCTTCTGG3' (SEC ID NO: 60) mMASP-2_directo	5 'TT AG A A ATT ACTT ATT AT GTTCTCAATCC3' (SEC ID NO: 63) mMASP-2_inverso
SEC ID NO:50 ADNc de MASP-2 murina	5 CCCCCCTGCGT CACCTCTGCAG3' (SEC ID NO: 62) mMASP-2_ala_directo	5 CTGCAGAGGTGACGCAG GGGGG 3' (SEC ID NO: 61) mMASP-2_ala_inverso

10 Expresión eucariota recombinante de MASP-2 y producción de proteína MASP-2A de ratón, rata y ser humano enzimáticamente inactiva

15 Los constructos de expresión de MASP-2 y MASP-2A anteriormente descritos se transfectaron en células DXB1 usando el procedimiento de transfección de fosfato de calcio estándar (Maniatis et al., 1989). MASP-2A se produjo en medio libre de suero para garantizar que las preparaciones no estuviesen contaminadas con otras proteínas del suero. Se cosechó el medio de células confluentes todos los segundos días (cuatro veces en total). El nivel de MASP-2 A recombinante promedió en aproximadamente 1,5 mg/litro de medio de cultivo para cada una de las tres especies.

20 Purificación de la proteína MASP-2 A: Se purificó MASP-2A (mutante Ser-Ala anteriormente descrito) por cromatografía de afinidad en columnas MBP-A-agarosa. Esta estrategia permitió la rápida purificación sin el uso de marcas externas. MASP-2A (100-200 ml de medio diluido con un volumen equivalente de tampón de carga (Tris-Cl 50 mM, pH 7,5, que contenía NaCl 150 mM y CaCl₂ 25 mM) se cargó a una columna de afinidad de MBP-agarosa (4 ml) pre-equilibrada con 10 ml de tampón de carga. Después de lavar con otros 10 ml de tampón de carga, la proteína se eluyó en fracciones de 1 ml con Tris-Cl 50 mM, pH 7,5, que contenía NaCl 1,25 M y EDTA 10 mM. Las fracciones que contenían MASP-2A se identificaron por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. En caso de ser necesario, se purificó MASP-2A adicionalmente por cromatografía de intercambio iónico en una columna MonoQ (HR 5/5). Se dializó la proteína con Tris-Cl 50 mM a pH 7,5, que contenía NaCl 50 mM y se cargó a una columna equilibrada en el mismo tampón. Después del lavado, se eluyó MASP-2A con un gradiente de NaCl de 0,05-1 M en 10 ml.

30 Resultados: Se obtuvieron rendimientos de 0,25-0,5 mg de la proteína MASP-2A a partir de 200 ml de medio. La masa molecular de 77,5 kDa determinada por MALDI-MS es mayor que el valor calculado del polipéptido no modificado (73,5 kDa) debido a la glucosilación. La unión de glicanos en cada uno de los sitios de N-glucosilación representa la masa observada. MASP-2A migra como una sola banda en los geles de SDS-poliacrilamida, demostrando que no se procesa de manera proteolítica durante la biosíntesis. La masa molecular promedio en peso determinada por ultracentrifugación de equilibrio concuerda con el valor calculado para los homodímeros del

polipéptido glucosilado.

Producción de polipéptidos de MASP-2 recombinantes humanos

Otro método para producir polipéptidos recombinantes derivados de MASP-2 y MASP2A se describe en Thielens, N.M., et al., *J. Immunol.* 166:5068-5077, 2001. En síntesis, células de insecto *Spodoptera frugiperda* (células Sf9 Ready-Plaque de Novagen, Madison, WI) se desarrollan y mantienen en medio libre de suero Sf900II (Life Technologies) enriquecido con 50 IU/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomina (Life Technologies). Las células de insecto *Trichoplusia ni* (High Five) (provisas por Jadwiga Chroboczek, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, Francia) se mantienen en medio TCI00 (Life Technologies) que contiene FCS al 10% (Dominique Dutscher, Brumath, Francia) enriquecido con 50 IU/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomina. Se generan baculovirus recombinantes usando el sistema Bac-to-Bac (Life Technologies). El ADN de bácnido se purifica usando el sistema de purificación Qiagen midiprep (Qiagen) y se usa para transfectar las células de insecto Sf9 usando Cellfectin en medio SFM Sf900 II (Life Technologies) como se describe en el protocolo del fabricante. Se recogen partículas recombinantes del virus 4 días después, se titulan por ensayo de placas del virus y se amplían como lo describen King y Possee, en *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, Chapman and Hall Ltd., Londres, pág. 111-114, 1992.

Las células High Five ($1,75 \times 10^7$ células/175-cm² matraz de cultivo de tejido) se infectan con los virus recombinantes que contienen los polipéptidos de MASP-2 a una multiplicidad de la infección de 2 en medio SFM Sf900 II a 28° C durante 96 h. Los sobrenadantes se recogen por centrifugación y se añade diisopropil fosforofluoridato a una concentración final de 1 mM.

Los polipéptidos de MASP-2 se segregan en el medio de cultivo. Los sobrenadantes de cultivo se dializan contra NaCl 50 mM, CaCl 1 mM, hidrocloreuro de trietanolamina 50 mM, pH 8,1, y se cargan a 1,5 ml/min a una columna Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) (2,8 x 12 cm) equilibrada en el mismo tampón. La elución se realiza aplicando un gradiente lineal de 2 litros a NaCl 350 mM en el mismo tampón. Las fracciones que contienen los polipéptidos de MASP-2 recombinantes se identifican por análisis Western blot, se precipitan por adición de (NH₄)₂SO₄ a 60% (p/v) y se dejan durante la noche a 4 °C. Los sedimentos se resuspenden en NaCl 145 mM, CaCl 1 mM, hidrocloreuro de trietanolamina 50 mM, pH 7,4 y se aplican a una columna TSK G3000 SWG (7,5 x 600 mm) (Tosohaas, Montgomeryville, PA) equilibrada en el mismo tampón. Los polipéptidos purificados luego se concentran hasta 0,3 mg/ml por ultrafiltración en microconcentradores Microsep (p.m. límite de corte = 10.000) (Filtron, Karstein, Alemania).

Ejemplo 6

Este ejemplo describe un método para producir anticuerpos monoclonales contra polipéptidos de MASP-2.

Materiales y métodos:

Antígenos de MASP-2: Se produce antisuero de MASP-2 antihumano policlonal inmunizando a conejos con los siguientes polipéptidos de MASP-2 aislados: MASP-2 humana (SEC ID NO:6) aislada de suero como se describe en el Ejemplo 4; MASP-2 humana recombinante (SEC ID NO:6), MASP-2A que contiene el dominio de proteasa inactivo (SEC ID NO: 13), como se describe en los Ejemplos 4-5; y CUBI recombinante (SEC ID NO:8), CUBEGFI (SEC ID NO:9) y CUBEGFCUBII (SEC ID NO: 10) expresados como se describió anteriormente en el Ejemplo 5.

Anticuerpos policlonales: Conejos de seis semanas de vida, imprimados con BCG (vacuna bacillus Calmette-Guerin) se inmunizan por inyección de 100 µg de polipéptido MASP-2 a 100 µg/ml en disolución salina estéril. Las inyecciones se aplican cada 4 semanas con titulación de anticuerpo monitoreada por ensayo ELISA como se describe en el Ejemplo 7. Se recogen sobrenadantes de cultivo para purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad de la proteína A.

Ejemplo 7

Este ejemplo describe un método para producir anticuerpos monoclonales murinos contra polipéptidos de MASP-2 de rata o humanos.

Materiales y métodos:

Ratones macho A/J (Harlan, Houston, Tex.), 8-12 semanas de vida, reciben inyecciones subcutáneas de 100 µg de polipéptidos rMASP-2 o rMASP-2A humanos o de rata (preparados como se describe en el Ejemplo 4 o en el Ejemplo 5) en adyuvante de Freund completo (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) en 200 µl de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4. En intervalos de dos semanas, los ratones reciben dos veces inyecciones subcutáneas de 50 µg de polipéptido rMASP-2 o rMASP-2A humano o de rata en adyuvante de Freund incompleto. En la cuarta semana, los ratones reciben una inyección de 50 µg de polipéptido rMASP-2 o rMASP-2 A de rata o humano en PBS y se fusionan 4 días después.

Para cada fusión, se preparan suspensiones unicelulares del bazo de un ratón inmunizado y se usan para la fusión

con células de mieloma Sp2/0. Se fusionan 5×10^8 de las células Sp2/0, y 5×10^8 de las células de bazo se fusionan en medio que contiene 50% polietilenglicol (P.M. 1450) (Kodak, Rochester, N.Y.) y dimetilsulfóxido al 5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Las células luego se ajustan hasta una concentración de $1,5 \times 10^5$ células de bazo por 200 μ l de la suspensión en medio Iscove (Gibco, Grand Island, N.Y.), enriquecido con suero bovino fetal al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina, hipoxantina 0,1 mM, aminopterina 0,4 μ M y timidina 16 μ M. Se añaden 200 μ l de la suspensión celular a cada pocillo de aproximadamente veinte placas de microcultivo de 96 pocillos. Después de aproximadamente diez días, los sobrenadantes de cultivo se extraen para estudio de reactividad con el factor de MASP-2 purificado en un ensayo ELISA.

Ensayo de ELISA: Pocillos de placas de microensayo Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.) se recubren añadiendo 50 μ l de hMASP-2 purificada a 50 ng/ml de rMASP-2 rata (o rMASP-2A) durante la noche a temperatura ambiente. La baja concentración de MASP-2 para el recubrimiento permite la selección de anticuerpos de gran afinidad. Después de extraer la disolución de recubrimiento agitando la placa, se añaden 200 μ l de BLOTTO (leche en polvo desnatada) en PBS a cada pocillo durante una hora para bloquear los sitios no específicos. Una hora después, los pocillos se lavan con un tampón PBST (PBS que contiene 0,05% Tween 20). Se recogen 50 μ l de sobrenadantes de cultivo de cada pocillo de fusión y se mezclan con 50 μ l de BLOTTO y luego se añaden a los pocillos individuales de las placas de microensayo. Después de una hora de incubación, los pocillos se lavan con PBST. Los anticuerpos murinos unidos se detectan luego por reacción con IgG antirratón de cabra conjugada (específico de Fc) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.) y se diluyen a 1:2.000 en BLOTTO. La disolución de sustrato de peroxidasa que contiene 0,1% 3,3',5,5'-tetrametil benzidina (Sigma, St. Louis, Mo.) y 0,0003% peróxido de hidrógeno (Sigma) se añade a los pocillos para desarrollo de color durante 30 minutos. La reacción finaliza por adición de 50 μ l de H_2SO_4 2M por pocillo. Se lee la densidad óptica a 450 nm de la mezcla de reacción con una lectora de ELISA BioTek (BioTek Instruments, Winooski, Vt.).

Ensayo de unión a MASP-2:

Los sobrenadantes de cultivo con un resultado positivo en el ensayo ELISA de MASP-2 descrito anteriormente se pueden ensayar en un ensayo de unión para determinar la afinidad de unión que tienen los agentes inhibidores de MASP-2 para MASP-2. También se puede usar un ensayo similar para determinar si los agentes inhibidores se unen a otros antígenos en el sistema del complemento.

Se recubren pocillos de placas de microtitulación de poliestireno (placas de unión medianas de 96 pocillos, Coming Costar, Cambridge, MA) con MASP-2 (20 ng/100 μ l/pocillo, Advanced Research Technology, San Diego, CA) en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4 durante la noche a 4 °C. Después de aspirar la disolución de MASP-2, los pocillos se bloquean con PBS que contiene 1% de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma Chemical) durante 2 h a temperatura ambiente. Los pocillos sin recubrimiento de MASP-2 sirven como controles de fondo. Alícuotas de sobrenadantes de hibridoma o MoAbs anti-MASP-2 purificados, en concentraciones variables en disolución de bloqueo, se añaden a los pocillos. Después de una incubación de 2 h a temperatura ambiente, los pocillos se enjuagan abundantemente con PBS. Se detecta MoAb anti-MASP-2 unido a MASP-2 por adición de IgG anti-ratón de cabra conjugada a peroxidasa (Sigma Chemical) en disolución de bloqueo, que se deja incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se enjuaga nuevamente en forma abundante con PBS, y se añaden 100 μ l de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametil benzidina (TMB) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). La reacción de TMB se inactiva por adición de 100 μ l de ácido fosfórico 1M, y la placa se lee a 450 nm en una lectora de microplacas (SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Los sobrenadantes de cultivo de las células positivas se ensayan luego por su capacidad de inhibir la activación del complemento en un ensayo funcional tal como el ensayo de escisión de C4 descrito en el Ejemplo 2. Las células en pocillos positivos se clonan luego por dilución limitativa. Se ensayan los MoAb nuevamente para reactividad con hMASP-2 en un ensayo ELISA como se describió previamente. Los hibridomas seleccionados se desarrollan en matraces giratorios y el sobrenadante de cultivo se recoge para purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad de la proteína A.

Ejemplo 8

Este ejemplo describe la generación de un ratón con genes inactivados MASP-2^{-/-} que expresa MASP-2 humana para uso como modelo en el que seleccionar los agentes inhibidores de MASP-2.

Materiales y métodos: Se cruzan un ratón MASP-2^{-/-} descrito en el Ejemplo 1 y un ratón MASP-2^{-/-} que expresa un constructo del transgen de MASP-2 humano (genes modificados de MASP-2) descrito en el Ejemplo 3, y la progenie, que consiste en MASP-2^{-/-} murino, MApl9⁺ murino, MASP-2⁺ murino, se usa para identificar agentes inhibidores de MASP-2 humana.

Dichos modelos animales se pueden usar como sustratos de prueba para la identificación y eficacia de agentes inhibidores de MASP-2 tales como anticuerpos anti-MASP-2 humanos, péptidos y no péptidos inhibidores 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 un agente inhibidor de MASP-2 se administra al modelo animal en un tiempo y concentración suficientes para producir una

reducción de los síntomas de la enfermedad en el animal expuesto.

Además, los ratones MASP-2^{-/-} murino, MApl9⁺, MASP-2⁺ humano se pueden usar para generar líneas celulares que contienen uno o más tipos de células implicadas en una enfermedad asociada a MASP-2 que se pueden usar como modelo de cultivo celular para ese trastorno. La generación de líneas celulares continuas de animales transgénicos se conoce en la técnica, véase, por ejemplo Small, J.A., et al., *Mol. Cell Biol.*, 5:642-48, 1985.

Ejemplo 9

Este ejemplo describe un método para producir anticuerpos humanos contra MASP-2 humana en un ratón con genes inactivados de MASP-2 que expresa MASP-2 humana e inmunoglobulinas humanas.

Materiales y métodos:

- 10 Se generó un ratón MASP-2^{-/-} como se describe en el Ejemplo 1. Se construyó luego un ratón que expresa MASP-2 humana como se describe en el Ejemplo 3. Un ratón MASP-2^{-/-} homocigoto y un ratón MASP-2^{-/-} que expresa MASP-2 humana se cruzan cada uno con un ratón derivado de una línea de células madre embrionaria modificada para contener alteraciones dirigidas de locus de la cadena ligera y la cadena pesada de inmunoglobulina endógena y expresión de por lo menos un segmento del locus de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, el segmento del
15 locus de inmunoglobulina humana incluye secuencias no reordenadas de los componentes de las cadenas pesada y ligera. Tanto la inactivación de los genes de inmunoglobulina endógena como la introducción de genes de inmunoglobulina exógena se pueden lograr por recombinación homóloga dirigida. Los mamíferos transgénicos resultantes de este proceso son capaces de reordenar funcionalmente las secuencias del componente de inmunoglobulina y expresar un repertorio de anticuerpos de diversos isotipos codificados por genes de
20 inmunoglobulina humana, sin expresar genes de inmunoglobulina endógena.

- La producción y propiedades de los mamíferos que tienen estas propiedades se describe, por ejemplo, en Thomson, A.D., *Nature* 148:1547-1553, 1994, y en Sloane, B.F., *Nature Biotechnology* 14:826, 1996. Las cepas genéticamente modificadas de ratones en los que los genes de anticuerpo de ratón son inactivados y funcionalmente reemplazados con genes de anticuerpo humano se comercializa (p. ej., XenoMousi®, disponible de Abgenix, Fremont CA). Los
25 ratones de la descendencia resultante son capaces de producir MoAb humano contra MASP-2 humana que son adecuados para uso en terapia humana.

Ejemplo 10

Este ejemplo describe la generación y producción de anticuerpos anti-MASP-2 murinos humanizados y fragmentos de anticuerpos.

- 30 Se genera un anticuerpo monoclonal murino anti-MASP-2 en ratones macho A/J, como se describe en el Ejemplo 7. El anticuerpo murino luego se humaniza como se describe a continuación para reducir su inmunogenicidad reemplazando las regiones constantes murinas con sus contrapartes humanas para genera un fragmento de IgG y Fab quimérico del anticuerpo, que es útil para inhibir los efectos adversos de la activación del complemento dependiente de MASP-2 en sujetos humanos de acuerdo con la presente invención.

- 35 1. Clonación de genes de regiones variables anti-MASP-2 de células de hibridoma murino. Se aísla ARN total de las células de hibridoma que segregan MoAb anti-MASP-2 (obtenido como se describe en el Ejemplo 7) usando RNazol según el protocolo del fabricante (Biotech, Houston, Tex.). El ADNc de la primera cadena se sintetiza de ARN total usando oligo dT como el cebador. Se efectúa análisis PCR usando los cebadores 3' derivados de la región C constante de inmunoglobulina, y conjuntos de cebadores degenerados derivados del péptido líder o de la primera
40 región marco de genes V_H o V_K murinos como los cebadores 5'.

- El análisis de PCR anclado se lleva a cabo como lo describen Chen y Platsucas (Chen, P.F., *Scancl. J. Immunol.* 35:539-549, 1992). Para la clonación del gen V_K, se prepara ADNc bicatenario usando un cebador NotI-MAK1 (5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTTT-3' SEC ID NO: 38). Los adaptadores renaturalizados AD1 (5'-GGAATTCACCTCGTTATTCTCGGA-3' SEC ID NO:39) y AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEC ID NO:40) se
45 ligan a ambos términos 5' y 3' del ADNc bicatenario. Los adaptadores en los extremos 3' se extraen por digestión de NotI. El producto digerido luego se usa como molde en PCR con el oligonucleótido AD1 como el cebador 5' y MAK2 (5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTC-3' SEC ID NO:41) como el cebador 3'. Los fragmentos de ADN de aproximadamente 500 bp se clonan en pUC19. Se seleccionan varios clones para análisis de secuencias a fin de verificar que la secuencia clonada abarque la región constante de inmunoglobulina murina esperada. Los
50 oligonucleótidos NotI-MAK1 y MAK2 derivan de la región V_K y tienen 182 y 84 bp, respectivamente, en dirección 3' del primer par de bases del gen C kappa. Se eligen clones que incluyen V_K completo y el péptido líder.

- Para la clonación del gen V_H, se prepara ADNc usando el cebador NotI MAG1 (5'-CGCGGCCGAGCTGCTCAGAGTGTAGA-3' SEC ID NO:42). Los adaptadores renaturalizados AD1 y AD2 se ligan a ambos términos 5' y 3' del ADNc bicatenario. Los adaptadores en los extremos 3' se extraen por digestión de NotI.
55 El producto digerido se usa como molde en PCR con el oligonucleótido AD1 y MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGAAATA-3' SEC ID NO:43) como cebadores. Los fragmentos de ADN de 500 a

600 bp de longitud se clonan en pUC19. Los oligonucleótidos NotI-MAG1 y MAG2 derivan de la región C γ .7.1 murina y tienen 180 y 93 bp, respectivamente, en dirección 3' desde el primer bp del gen C γ .7.1 murino. Se eligen clones que incluyen el V_H completo y el péptido líder.

2. Construcción de vectores de expresión para IgG y Fab de MASP-2 quiméricos. Se usaron los genes V_H y V_K clonados anteriormente descritos como moldes en una reacción PCR para añadir el consenso Kozak al extremo 5' y el donante de empalme al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos. Después de analizar las secuencias para confirmar la ausencia de errores de la reacción PCR, los genes V_H y V_K se insertan en cassettes de vectores de expresión que contienen C. γ 1 y C. kappa humanos, respectivamente, para dar pSV2neoV_H-huC γ 1 y pSV2neoV-huC γ . Los ADN de plásmido purificados en gradientes de CsCl de los vectores de cadena pesada y ligera se usan para transfectar células COS por electroporación. Después de 48 horas, el sobrenadante de cultivo se ensaya por ELISA para confirmar la presencia de aproximadamente 200 ng/ml de IgG quimérica. Las células se cosechan y se prepara ARN total. El ADNc de la primera cadena se sintetiza a partir del ARN total usando oligo dT como el cebador. Este ADNc se usa como molde en la reacción PCR para generar los fragmentos de ADN, Fd y kappa. Para el gen Fd, se lleva a cabo una reacción PCR usando 5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAAC-3' (SEC ID NO:44) como el cebador 5' y un cebador 3' derivado de CH1 (5'-CGGGATCCTCAAACCTTCTGTCCACCTTGG-3' SEC ID NO:45). Se confirma que la secuencia de ADN contiene V_H y V_K y el dominio CH1 de IgG1 humana. Después de la digestión con las enzimas correctas, los fragmentos de ADN Fd se insertan en los sitios de restricción HindIII y BamHI del cassette del vector de expresión pSV2dhfr-TUS para dar pSV2dhfrFd. El plásmido pSV2 se comercializa y consiste en segmentos de ADN de diversas fuentes: ADN pBR322 (línea delgada) contiene el origen pBR322 de replicación de ADN (pBR ori) y el gen de resistencia a lactamasa ampicilina (Amp); ADN SV40, representado por sombreado y marcado más gruesos, contiene el origen SV40 de replicación de ADN (SV40 ori), promotor temprano (5' a los genes dhfr y neo), y la señal de poliadenilación (3' a los genes dhfr y neo). La señal de poliadenilación derivada de SV40 (pA) también está dispuesta en el extremo 3' del gen Fd.

Para el gen kappa, se lleva a cabo reacción PCR usando 5'-AAG A A AGCTTGCCGCC ACC ATGTTCTC ACT AGCTCT - 3' (SEC ID NO:46) como el cebador 5' y un cebador 3' derivado de C κ (5'-CGGGATCCTTCTCCCTTAACACTCT-3' SEC ID NO:47). Se confirma que la secuencia de ADN contiene las regiones V_H completa y V_K humana. Después de la digestión con enzimas de restricción correctas, los fragmentos de ADN kappa se insertan en los sitios de restricción HindIII y BamHI del cassette del vector de expresión pSV2neo-TUS para dar pSV2neoK. La expresión de ambos genes Fd y kappa es promovida por elementos potenciadores y promotores derivados de HCMV. Ya que el gen Fd no incluye el residuo de aminoácidos cisteína implicado en el enlace disulfuro intercadenas, este Fab quimérico recombinante contiene cadenas pesada y ligera no covalentemente unidas. Este Fab quimérico está diseñado como cFab.

Para obtener Fab recombinante con un enlace disulfuro inter-cadena pesada y ligera, el gen Fd anteriormente mencionado se puede extender para incluir la secuencia codificadora de 9 aminoácidos adicionales (EPKSCDKTH SEC ID NO:48) de la región bisagra de IgG1 humana. El segmento de ADN BstEII-BamHI que codifica 30 aminoácidos en el extremo 3' del gen Fd se puede reemplazar con los segmentos de ADN que codifican el Fd extendido, resultando en pSV2dhfrFd/9aa.

3. Expresión y purificación de IgG anti-MASP-2 quimérica

Para generar líneas celulares que segregan IgG anti-MASP-2 quimérica, se transfectan células NSO con ADN de plásmido purificado de pSV2neoV_H-huC. γ 1 y pSV2neoV-huC kappa por electroporación. Las células transfectadas se seleccionan en presencia de 0,7 mg/ml G418. Las células se desarrollan en un matraz giratorio de 250 ml usando medio que contiene suero.

El sobrenadante de cultivo de un matraz de cultivo centrífugo de 100 ml se carga en una columna de 10 ml PROSEP-A (Bioprocessing, Inc., Princeton, N.J.). La columna se lava con 10 volúmenes de lecho de PBS. El anticuerpo unido se eluye con tampón de citrato 50 mM, pH 3,0. Se añade un volumen equivalente de Hepes 1 M, pH 8,0 a la fracción que contiene el anticuerpo purificado para ajustar el pH a 7,0. Se extraen las sales residuales por intercambio de tampones con PBS por ultrafiltración de la membrana Millipore (P.M. valor de corte: 3.000). La concentración de proteína del anticuerpo purificado se determina por el método BCA (Pierce).

4. Expresión y purificación de Fab anti-MASP-2 quimérico

Para generar líneas celulares que segregan Fab anti-MASP-2 quimérico, se transfectan células CHO con ADN de plásmido purificado de pSV2dhfrFd (o pSV2dhfrFd/9aa) y pSV2neokappa, por electroporación. Las células transfectadas se seleccionan en presencia de G418 y metotrexato. Las líneas celulares seleccionadas se amplían en concentraciones en aumento de metotrexato. Las células se subclonan en forma unicelular por dilución limitativa. Las líneas celulares subclonadas unicelulares de gran producción se desarrollan luego en un cultivo giratorio de 100 ml que usa medio libre de suero.

Se purifica Fab anti-MASP-2 quimérico por cromatografía de afinidad, usando un MoAb anti-idiopático de ratón a MoAb de MASP-2. Un MoAb de MASP-2 anti-idiopático se puede preparar inmunizando a ratones con MoAb anti-

5 MASP-2 murino conjugado con hemocianina de lapa californiana (KLH) y seleccionando la unión de MoAb específica que se puede completar con MASP-2 humana. Para la purificación, 100 ml de sobrenadante de cultivos giratorios de células CHO que producen cFab o cFab/9aa se cargan a una columna de afinidad acoplada con un MoAb de MASP-2 anti-idiotipo. La columna luego se lava a fondo con PBS antes de eluir el Fab unido con dietilamina 50 mM, pH 11,5. Se extraen las sales residuales por intercambio de tampones como se describió precedentemente. La concentración de proteína del Fab purificado se determina por el método BCA (Pierce).

La capacidad de la IgG de MASP-2 quimérica, cFab y cFab/9aa para inhibir las vías del complemento dependientes de MASP-2 se puede determinar usando los ensayos que se describen en el Ejemplo 2.

Ejemplo 11

10 Este ejemplo describe un ensayo de escisión de C4 *in vitro* que se utiliza como estudio funcional para identificar agentes inhibidores de MASP-2 capaces de bloquear la activación del complemento dependiente de MASP-2-vía L-ficolina/P35, H-ficolina, M-ficolina o manano.

15 Ensayo de escisión de C4: Un ensayo de escisión de C4 ha sido descrito por Petersen, S.V., et al., *J. Immunol. Methods* 257:107, 2001, el cual mide la activación de la vía de lectinas resultante de ácido lipoteicoico (LTA) de *S. aureus* que se une a L-ficolina.

Reactivos: Se prepara *S. aureus* (DSM20233) fijada a formalina de la siguiente manera:

se desarrollan bacterias durante toda la noche a 37 °C en medio de sangre y soja trípico, se lava tres veces con PBS, luego se fija durante 1 h a temperatura ambiente en PBS/0,5% formalina y se lava otras tres veces con PBS, antes de resuspenderse en tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM, pH 9,6).

20 Ensayo: Los pocillos de una placa de microtitulación Nunc MaxiSorb (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) se recubren con: 100 µl de *S. aureus* DSM20233 fijada a formalina (OD₅₅₀ = 0,5) en tampón de recubrimiento con 1 µg de L-ficolina en tampón de recubrimiento.

25 Después de incubar durante toda la noche, los pocillos se bloquean con albúmina de suero humano al 0,1% (HSA) en TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4), luego se lavan con TBS que contiene 0,05% Tween 20 y CaCl₂ 5 mM (tampón de lavado). Las muestras de suero humano se diluyen en Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, CaCl₂ 10 mM, 0,05% Triton X-100, 0,1% HSA, pH 7,4, lo que previene la activación de C4 endógena y disocia el complejo C1 (compuesto por C1q,Clr y Cls). Los agentes inhibidores de MASP-2, incluidos MoAb anti-MASP-2 y péptidos inhibidores se añaden a las muestras de suero en concentraciones variables. Las muestras diluidas se añaden a la placa y se incuban durante la noche a 4 °C. Después de 24 horas, las placas se lavan a fondo con tampón de lavado, luego se añaden a cada pocillo 0,1 µg de C4 humana purificada (obtenida como se describe en Dodds, A.W., *Methods Enzymol.* 223:46, 1993) en 100 µl de barbital 4 mM, NaCl 145 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,4. Después de 1,5 h a 37 °C, las placas se lavan nuevamente y se detecta la deposición de C4b usando C4c antihumano de pollo conjugado a fosfatasa alcalina (se obtiene de Immunsystem, Uppsala, Suecia) y se mide usando el sustrato colorimétrico fosfato de p-nitrofenilo.

35 Ensayo de C4 en manano: El ensayo anteriormente descrito se adapta para medir la activación de la vía de lectinas mediante MBL recubriendo la placa con LSP y manano antes de añadir suero mezclado con diversos agentes inhibidores de MASP-2.

40 Ensayo de C4 en H-ficolina (Hakata Ag): El ensayo anteriormente descrito se adapta para medir la activación de la vía de lectinas mediante H-ficolina recubriendo la placa con LPS y H-ficolina antes de añadir suero mezclado con diversos agentes inhibidores de MASP-2.

Ejemplo 12

El siguiente ensayo demuestra la presencia de activación de la vía clásica en ratones de tipo salvaje y MASP-2^{-/-}.

45 Métodos: Se generaron complejos inmunes *in situ* recubriendo placas de microtitulación (Maxisorb, Nunc, cat. No. 442404, Fisher Scientific) con 0,1% de albúmina de suero humana en Tris 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 durante 1 hora a temperatura ambiente seguido de incubación durante la noche a 4 °C con antisuero de suero completo anti oveja (Scottish Antibody Production Unit, Carluke, Escocia) diluido 1:1000 en TBS/tween/Ca²⁺. Las muestras de suero se obtuvieron de ratones de tipo salvaje y MASP-2^{-/-} y se añadieron a las placas recubiertas. Se prepararon muestras control en las que C1Iq se despojó de las muestras de suero de tipo salvaje y MASP-2^{-/-}. El suero de ratón despojado de C1q se preparó usando Dynabeads acoplada a proteína A (DynaL Biotech, Oslo, Noruega) recubierta con C1q IgG antihumana de conejo (Dako, Glostrup, Dinamarca), según las instrucciones del proveedor. Las placas se incubaron durante 90 minutos a 37 °C. El C3b unido se detectó con un anticuerpo policlonal anti-C3c humano (Dako A 062) diluido en TBS/tw/ Ca⁺⁺ a 1:1000. El anticuerpo secundario es IgG anti-conejo de cabra.

50 Resultados: La FIGURA 9 expone los niveles relativos de deposición de C3b en placas recubiertas con IgG en suero de tipo salvaje, suero de MASP-2^{-/-}, suero de MASP-2^{-/-} despojado de C1q de tipo salvaje y suero de MASP-2^{-/-}

despajado de C1q. Estos resultados demuestran que la vía clásica está intacta en la cepa de ratón MASP-2^{-/-}.

Ejemplo 13

El siguiente ensayo se usa para estudiar si un agente inhibidor bloquea la vía clásica, analizando el efecto de un agente inhibidor de MASP-2 bajo condiciones en las que la vía clásica es iniciada por complejos inmunes.

- 5 Métodos: Para ensayar el efecto de un agente inhibidor de MASP-2 en condiciones de activación del complemento en las que la vía clásica es iniciada por complejos inmunes, muestras de 50 µl por triplicado que contienen 90% NHS se incuban a 37° C en presencia de 10 µg/ml de complejo inmune (IC) o PBS, y también se incluyen muestras por triplicado paralelas (+/-IC) que contienen anticuerpo monoclonal anti-properdina 200 nM durante la incubación a 37 °C. Después de una incubación de dos horas a 37 °C, se añade EDTA 13 mM a todas las muestras para detener la
10 activación adicional del complemento, y las muestras se enfrían inmediatamente a 5 °C. Las muestras luego se conservan a -7C °C antes de ensayarse para productos de activación del complemento (C3a y sC5b-9) usando kits ELISA (Quidel, Catálogos núm. A015 y A009) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 14

- 15 Este ejemplo demuestra que el sistema de activación del complemento de MASP-2 dependiente de lectinas se activa en la fase de isquemia/reperfusión que le sigue a una reparación de aneurisma aórtico abdominal.

Fundamento y diseño experimental: Los pacientes que se someten a una reparación de aneurisma aórtico abdominal (AAA) están sujetos a una lesión de isquemia-reperfusión, que es mediada en gran medida por la activación del complemento. Investigamos la función de la vía de activación del complemento de lectinas dependiente de MASP-2 en lesión de isquemia y reperfusión en pacientes que se someten a una reparación de AAA.
20 El consumo de lectina de unión a manano (MBL) en suero se usó para medir la cantidad de activación de la vía de lectinas dependiente de MASP-2 que ocurrió durante la reperfusión.

Aislamiento de muestras del suero de pacientes: Se incluyó en este estudio un total de 23 pacientes que se sometieron a reparación de AAA infrarrenal electiva y 8 pacientes control que se sometieron a cirugía abdominal mayor.

- 25 Para los pacientes que se sometieron a reparación de AAA, se tomaron muestras de sangre sistémicas de la arteria radial de cada paciente (con una vía arterial) en cuatro puntos de tiempo definidos durante el procedimiento: punto de tiempo 1: inducción de anestesia; punto de tiempo 2: justo antes del pinzamiento arterial; punto de tiempo 3: justo antes de la extracción de la pinza aórtica; y punto de tiempo 4: durante la reperfusión.

- 30 Para los pacientes control que se sometieron a cirugía abdominal mayor, se tomaron muestras de sangre sistémicas en la inducción de la anestesia y dos horas después del comienzo del procedimiento.

Ensayo de los niveles de MBL: Se ensayó la muestra de plasma de cada paciente para niveles de lectina unida a manano (MBL) usando técnicas de ELISA.

- 35 Resultados: Los resultados de este estudio se exponen en la FIGURA 10, que presenta un gráfico que muestra el cambio medio en porcentaje en los niveles de MBL (eje y) en cada uno de los diversos puntos de tiempo (eje x). Los valores de partida para MBL son 100%, en donde se muestran reducciones relativas en lo sucesivo. Como se muestra en la FIGURA 10, los pacientes con AAA (n=23) exhiben una reducción significativa en los niveles de MBL en plasma, promediando aproximadamente 41% de reducción al momento de la isquemia/reperfusión que le sigue a AAA. En contraste, en pacientes control (n=8) sometidos a cirugía abdominal mayor, se observó solamente un consumo leve de MBL en las muestras de plasma.

- 40 Los datos presentados proveen una fuerte indicación de que la vía de lectinas dependiente de MASP-2 del sistema del complemento se activa en la fase de isquemia/reperfusión que le sigue a la reparación de AAA. La reducción de los niveles de MBL parece estar asociada a la lesión de isquemia-reperfusión porque los niveles de MBL caen significativa y rápidamente cuando el vaso mayor pinzado se reperfunde después del final de la operación. En contraste, los sueros control de pacientes que se someten a cirugía abdominal mayor sin un ataque de isquemia-reperfusión importante solamente exhiben una ligera disminución de los niveles de MBL en plasma. En vista de la contribución bien establecida de la activación del complemento en la lesión de reperfusión, concluimos que la activación de la vía de lectinas dependiente de MASP-2 en células endoteliales isquémicas es un factor importante en la patología de la lesión de isquemia/reperfusión. Por consiguiente, se esperaría que un bloqueo o una reducción transitoria en la vía de lectinas dependiente de MASP-2 de la activación del complemento tuviese un impacto
45 terapéutico beneficioso significativo para mejorar el resultado de los procedimientos clínicos y de las enfermedades que implican ataque isquémico transitorio, p. ej., infarto de miocardio, infarto de intestino, quemaduras, trasplantes y
50 accidentes cerebrovasculares.

Ejemplo 15

Este ejemplo describe el uso de la cepa MASP-2^{-/-} como un modelo animal para ensayar los agentes inhibidores de

MASP-2 útiles para tratar la artritis reumatoidea.

Antecedentes y fundamentos: Modelo de artritis murina: Ratones transgénicos (tg) receptores de células T (TCR K/BxN son un modelo recientemente desarrollado de artritis inflamatoria (Kouskoff, V., et al., *Cell* 87:811-822, 1996; Korganow, A.S., et al., *Immunity* 10:451-461, 1999; Matsumoto, I., et al., *Science* 286:1732-1735, 1999; Maccioni M. et al., *J. Exp. Med.* 195(8): 1071-1077, 2002). Los ratones K/BxN desarrollan espontáneamente una enfermedad autoinmune con la mayoría de las características clínicas, histológicas e inmunológicas de la RA en seres humanos (Ji, H., et al., *Immunity* 16:157-168, 2002). El receptor murino es específico de las articulaciones, pero es iniciado y luego perpetuado por autorreactividad de las células T, luego B a glucosa-6-fosfato isomerasa ("GPI"), un antígeno que se expresa en forma ubicua. Asimismo, la transferencia de suero (o Igs anti-GPI purificados) de ratones K/BxN artríticos a animales sanos provoca artritis al cabo de varios días. También se ha demostrado que los anticuerpos anti-GPI policlonales o una agrupación de anticuerpos anti-GPI monoclonales del isotipo IgG1 inducen artritis cuando se inyectan en receptores sanos (Maccioni et al., 2002). El modelo murino es relevante a RA humana, ya que se ha descubierto que el suero de pacientes con RA también contiene anticuerpos anti-GPI, lo cual no sucede en individuos normales. Se ensayó un ratón deficiente de C5 en este sistema y se halló que bloquea el desarrollo de artritis (Ji, H., et al., 2002, *supra*). Hubo también una fuerte inhibición de la artritis en ratones nulos de C3, lo que implica a la vía alternativa, no obstante, los ratones nulos de MBP-A desarrollaron artritis. En los ratones, sin embargo, la presencia de MBP-C puede compensar la pérdida de MBP-A.

En base a las observaciones descritas en este documento, la MASP-2 cumple una función esencial en el inicio de las vías de lectinas y alternativa, el modelo artrítico K/BxN es útil para estudiar los agentes inhibidores de MASP-2 que son eficaces para uso como agentes terapéuticos para tratar la RA.

Métodos: Se obtiene el suero de ratones K/BxN artríticos a los 60 días de vida, se mezcla y se inyecta (150-200 μ l i.p.) en receptores MASP-2/- (obtenidos como se describe en el Ejemplo 1); y en las camadas control con o sin agentes inhibidores de MASP-2 (MoAb, péptidos inhibidores y similares descritos en este documento) en los días 0 y 2. Un grupo de ratones normales también se pre-trata con un agente inhibidor de MASP-2 por dos días antes de recibir la inyección de suero. Un grupo más de ratones recibe una inyección de suero en el día 0, seguida por un agente inhibidor de MASP-2 en el día 6. Se evalúa un índice clínico con el paso del tiempo con un punto para cada pata afectada, $\frac{1}{2}$ punto para una pata con solamente inflamación leve. El espesor del tobillo se mide también con una pinza (el espesor se define como la diferencia desde la medición del día 0).

Ejemplo 16

Este ejemplo describe un ensayo para inhibición del daño al tejido mediado por el complemento en un modelo *ex vivo* de corazones de conejo perfundidos con plasma humano.

Antecedentes y fundamentos: La activación del sistema del complemento contribuye al rechazo hiperagudo de xenoinjertos. Estudios previos han demostrado que el rechazo hiperagudo puede ocurrir en ausencia de anticuerpos antidonantes mediante la activación de la vía alternativa (Johnston, P.S., et al., *Transplant Proc.* 23:877-879, 1991).

Métodos: Para determinar si los agentes inhibidores anti-MASP-2 aislados, tales como anticuerpos anti-MASP-2 obtenidos como se describe en el Ejemplo 7 son capaces de inhibir la vía del complemento en daño al tejido, los fragmentos de MoAb y anticuerpos anti-MASP-2 se pueden ensayar usando un modelo *ex vivo* en el que los corazones de conejos aislados se perfunden con plasma humano diluido. Se demostró previamente que este modelo causa daño al miocardio de conejos debido a la activación de la vía del complemento alternativa (Gralinski, M.R., et al., *Immunopharmacology* 34:79-88, 1996).

Ejemplo 17

Este ejemplo describe un ensayo que mide la activación de neutrófilos que es útil como indicador de una dosis eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 para el tratamiento de afecciones asociadas con la vía dependiente de lectinas de acuerdo con los métodos de la invención.

Métodos: Un método para medir la elastasa de los neutrófilos ha sido descrito en Gupta-Bansal, R., et al., *Molecular Immunol.* 37:191-201, 2000. En resumen, el complejo de elastasa y α_1 -antitripsina del suero se mide con un ensayo sándwich de dos sitios que utiliza anticuerpos contra elastasa y α_1 -antitripsina. Se recubren placas de microtitulación de poliestireno con una dilución 1:500 de anticuerpo de elastasa antihumano (The Binding Site, Birmingham, Reino Unido) en PBS durante la noche a 4 °C. Después de aspirar la disolución de anticuerpos, los pocillos se bloquean con PBS que contiene 0,4% HAS durante 2 h a temperatura ambiente. Se añaden a los pocillos alícuotas (100 μ l) de muestras de plasma que son tratadas con o sin un agente inhibidor de MASP-2. Después de una incubación de a 2 h a temperatura ambiente, los pocillos se enjuagan abundantemente con PBS. El complejo de elastasa- α_1 -antitripsina ligado se detecta por adición de una dilución 1:500 de anticuerpo α_1 -antitripsina conjugado a peroxidasa en disolución de bloqueo que se deja incubar por 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar la placa con PBS, se añaden alícuotas de 100 μ l de sustrato TMB. La reacción de TMB se inactiva por adición de 100 μ l de ácido fosfórico, y la placa se lee a 450 nm en una lectora de microplacas.

Ejemplo 18

Este ejemplo describe un modelo animal para ensayar agentes inhibidores de MASP-2 útiles para tratar la isquemia de miocardio/reperfusión.

5 Métodos: Un modelo de isquemia de miocardio-reperfusión ha sido descrito por Vakevaetal., *Circulation* 97:2259-2267, 1998, y Jordan et al., *Circulation* 104(12): 1413-1418, 2001. El modelo descrito se puede modificar para uso en ratones MASP-2^{-/-} y MASP-2^{+/+} de la siguiente manera. En resumen, se anestesian ratones macho adultos. Se canulan la vena yugular y la tráquea, y se mantiene la ventilación con 100% oxígeno con un ventilador para roedores ajustado para mantener el CO₂ exhalado entre 3,5% y 5%. Se realiza una toracotomía izquierda y se coloca una sutura a 3 o 4 mm del origen de la arteria coronaria izquierda. Cinco minutos antes de la isquemia, los animales reciben el agente inhibidor de MASP-2, tal como anticuerpos anti-MASP-2 (p. ej., en un intervalo de dosis entre 0,01 y 10 mg/kg). Se inicia entonces la isquemia ajustando la sutura alrededor de la arteria coronaria y se mantiene durante 30 minutos, seguida por cuatro horas de reperfusión. Los animales con operación simulada se preparan de manera idéntica sin ajuste de la sutura.

15 Análisis de deposición de C3 del complemento: Después de la reperfusión, las muestras para inmunohistoquímica se obtienen de la región central del ventrículo izquierdo, se fijan y se congelan a -80 °C hasta procesarse. Los cortes de tejido se incuban con anticuerpo de C3 antirrata de cabra conjugado a HRP. Los cortes de tejido se analizan para presencia de tinción de C3 en presencia de agentes inhibidores anti-MASP-2 según lo comparado con los animales control con operación simulada y los animales MASP-2^{-/-} para identificar los agentes inhibidores de MASP-2 que reducen la deposición de C3 *in vivo*.

20 Ejemplo 19

Este ejemplo describe el uso de la cepa de MASP-2^{-/-} como un modelo animal para ensayar los agentes inhibidores de MASP-2 por su capacidad de proteger el tejido trasplantado contra lesión de isquemia/reperfusión.

25 Antecedentes/Fundamentos: Se sabe que la lesión de isquemia/reperfusión ocurre en el órgano de un donante durante el trasplante. El grado de daño al tejido se relaciona con la longitud de la isquemia y es mediado por el complemento, como lo demuestran diversos modelos y el uso de los agentes inhibidores del complemento como el receptor soluble de tipo 1 (CR1) (Weisman et al., *Science* 249:146-151, 1990; Mulligan et al., *J. Immunol.* 148:1479-1486, 1992; Pratt et al., *Am. J. Path.* 163(4):1457-1465, 2003). Se ha descrito un modelo animal para trasplante por Pratt et al., *Am. J. Path.* 163(4): 1457-1465, que se puede modificar para uso con el modelo de ratón MASP-2^{-/-} y/o para uso como sistema del modelo a MASP-2^{+/+} en el que seleccionar agente inhibidores de MASP-2 por su capacidad de proteger el tejido trasplantado de lesión de isquemia/reperfusión. La purga del riñón del donante con el fluido de perfusión antes del trasplante proporciona una oportunidad de introducir agentes inhibidores anti-MASP-2 en el riñón del donante.

35 Métodos: Se anestesian ratones MASP-2^{-/-} y/o MASP-2^{+/+}. El riñón izquierdo del donante se disecciona y la aorta se liga en sentido cefálico y caudal hacia la arteria renal. Un catéter Portex (Portex Ltd, Hythe, Reino Unido) se inserta entre las ligaduras y el riñón se perfunde con 5 ml de disolución de perfusión renal Soltran (Baxter Health Care, Reino Unido) que contiene agentes inhibidores de MASP-2 tales como anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 (en un intervalo de dosis de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg) por un periodo de por lo menos 5 minutos. El trasplante renal se realiza luego y los ratones se controlan con el transcurso del tiempo.

40 Análisis de receptores de trasplantes: Se cosechan trasplantes renales en distintos intervalos de tiempo y se analizan los cortes de tejido usando anti-C3 para determinar el grado de deposición de C3.

Ejemplo 20

Este ejemplo describe el uso de un modelo animal de artritis inducida por colágeno (CIA) para ensayar agentes inhibidores de MASP-2 para tratar artritis reumatoidea (RA).

45 Antecedentes y fundamentos: La artritis inducida por colágeno (CIA) representa una poliartritis inducible en cepas susceptibles de roedores y primates después de la inmunización con colágeno natural de tipo II y se reconoce como modelo relevante para artritis reumatoidea humana (RA) (véanse Courtney et al., *Nature* 283: 666 (1980); Trentham et al., *J. Exp. Med.* 146: 857 (1977)). Tanto la RA como la CIA se caracterizan por inflamación articular, formación de pannus y erosión de cartílagos y huesos. La cepa murina susceptible a CIA, DBA/1LacJ es un modelo desarrollado de CIA en el que los ratones desarrollan artritis clínicamente severa después de la inmunización con colágeno bovino de tipo II (Wang et al., *J. Immunol.* 164: 4340-4347 (2000)). Una cepa de ratón deficiente de C5 se cruzó con DBA/1LacJ, y se halló que la cepa resultante era resistente al desarrollo de artritis CIA (Wang et al., 2000, *supra*).

En base a las observaciones descritas en este documento de que la MASP-2 cumple una función esencial en el inicio de las vías de lectinas y alternativa, el modelo de artritis CIA es útil para seleccionar agentes inhibidores de MASP-2 eficaces para uso como agentes terapéuticos para tratar la RA.

55 Métodos: Se genera un ratón MASP-2^{-/-} como se describe en el Ejemplo 1. El ratón MASP-2^{-/-} se cruza luego con

un ratón derivado de la cepa DBA/1LacJ (The Jackson Laboratory). F1 y la subsiguiente descendencia se entrecruza para producir MASP-2^{-/-} homocigoto en la línea DBA1LacJ.

La inmunización de colágeno se lleva a cabo como se describe en Wang et al., 2000, *supra*. En síntesis, ratones DBA/1LacJ de tipo salvaje y ratones MASP-2^{-/-} DBA/1LacJ se inmunizan con colágeno bovino de tipo II (BCII) o colágeno de ratón de tipo II (MCII) (se obtienen de Elastin Products, Owensville, MO), disuelto en ácido acético 0,01 M a una concentración de 4 mg/ml. Cada ratón recibe una inyección intradérmica en la base del rabo con 200 ug CII y 100 ug de micobacterias. Los ratones se vuelven a inmunizar después de 21 días y se examinan a diario para el aspecto de la artritis. Se evalúa un índice artrítico con el tiempo con respecto a la gravedad de la artritis en cada pata afectada.

- 5
- 10 Los agentes inhibidores de MASP-2 se seleccionan en los ratones DBA/1LacJ CIA de tipo salvaje inyectando un agente inhibidor de MASP-2 tal como anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 (en una forma de dosificación de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg) al momento de la inmunización de colágeno, o bien sistémica o localmente en una o más articulaciones y se evalúa el índice artrítico con el tiempo como se describió anteriormente. Los anticuerpos monoclonales anti-hMASP-2 como agentes terapéuticos se pueden evaluar fácilmente en un modelo de ratón a
- 15 MASP-2^{-/-}, hMASP-^{+/+} DBA/1LacJ CIA con genes inactivados.

Ejemplo 21

Este ejemplo describe el uso de un modelo animal de (NZB/W) F₁ para ensayar agentes inhibidores de MASP-2 útiles para tratar la glomerulonefritis mediada por el complejo inmune.

- 20 Antecedentes y fundamentos: Los ratones F1 New Zealand black x New Zealand white (NZB/W) desarrollan espontáneamente un síndrome autoinmune de similitudes notables con la glomerulonefritis mediada por el complejo inmune humano. Los ratones F1 NZB/W sucumben invariablemente a la glomerulonefritis alrededor de los 12 meses de edad. Como se analizó anteriormente, se ha demostrado que la activación del complemento cumple una función importante en la patogénesis de la glomerulonefritis mediada por el complejo inmune. Se ha demostrado además que la administración de un MoAb anti-C5 en el modelo de ratón F1 NZB/W resultó en la mejoría significativa del
- 25 curso de la glomerulonefritis (Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 8563-8568 (1996)). En función de las observaciones descritas en este documento de que la MASP-2 cumple una función esencial en el inicio de las vías de lectinas y alternativa, el modelo animal de F1 NZB/W es útil para seleccionar agentes inhibidores de MASP-2 eficaces para uso como agentes terapéuticos para tratar la glomerulonefritis.

- 30 Métodos: Se genera un ratón MASP-2^{-/-} como se describe en el Ejemplo 1. El ratón MASP-2^{-/-} se cruza luego por separado con un ratón derivado de las cepas de NZB y NZW (The Jackson Laboratory). F1 y la subsiguiente descendencia se entrecruzan para producir MASP-2^{-/-} homocigoto en ambos fondos genéticos NZB y NZW. Para determinar la función de MASP-2 en la patogénesis de la glomerulonefritis en este modelo, se compara el desarrollo de esta enfermedad en individuos F1 resultantes de las cruces de ratones NZB x NZW de tipo salvaje o MASP-2^{-/-} NZB x MASP-2^{-/-} NZW. En intervalos semanales, se recogen muestras de orina de los ratones F1 MASP-2^{+/+} y
- 35 MASP-2^{-/-} y se vigilan los niveles de proteína en la orina para presencia de anticuerpos anti-ADN (como se describe en Wang et al., 1996, *supra*). También se lleva a cabo el análisis histopatológico de los riñones para vigilar la cantidad de deposición en la matriz mesangial y el desarrollo de glomerulonefritis.

- El modelo animal F1 NZB/W es también útil para seleccionar agentes inhibidores de MASP-2 eficaces para uso como agentes terapéuticos a fin de tratar la glomerulonefritis. A las 18 semanas de vida, se inyectan ratones F1
- 40 NZB/W de tipo salvaje por ruta intraperitoneal con agentes inhibidores anti-MASP-2, tales como los anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 (en un intervalo de dosis de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg) a una frecuencia semanal o quincenal. Los marcadores histopatológicos y bioquímicos anteriormente mencionados de glomerulonefritis se usan para evaluar el desarrollo de la enfermedad en los ratones y para identificar agentes inhibidores de MASP-2 útiles para el tratamiento de esta enfermedad.

45 Ejemplo 22

Este ejemplo describe el uso de un anillo tubular como modelo para ensayar agentes inhibidores de MASP-2 útiles para prevenir el daño al tejido resultante de la circulación extracorpórea (ECC) como un circuito de derivación a cardiopulmonar (CPB).

- 50 Antecedentes y fundamentos: Como se describió anteriormente, los pacientes que se someten a ECC durante un CPB sufren una reacción inflamatoria sistémica, que es en parte causada por la exposición de la sangre a las superficies artificiales del circuito extracorpóreo, pero además por factores independientes de la superficie como traumatismo quirúrgico y lesión de isquemia-reperfusión (Butler, J., et al., *Ann. Thorac. Surg.* 55:552-9, 1993; Edmunds, L.H., *Ann. Thorac. Surg.* 66 (Supl):S12-6, 1998; Asimakopoulos, G., *Perfusion* 14:269-77, 1999). También se ha demostrado que la vía del complemento alternativa cumple una función predominante en la activación del
- 55 complemento en circuitos de CPB, resultante de la interacción de la sangre con las superficies artificiales de los circuitos de CPB (véase Kirklin et al., 1983, 1986, anteriormente analizado). En consecuencia, en base a las observaciones descritas en este documento de que la MASP-2 cumple una función esencial en la inhibición de las vías de lectinas y alternativa, el anillo tubular es útil para seleccionar agentes inhibidores de MASP-2 eficaces para

uso como agentes terapéuticos con el fin de prevenir o tratar una reacción inflamatoria desencadenada por exposición extracorpórea.

Métodos: Se utiliza una modificación de un anillo tubular previamente descrito para circuitos de derivación cardiopulmonar (véase Gong et al., *J. Clinical Immunol.* 16(4):222-229 (1996)) como se describe en Gupta-Bansal et al., *Molecular Immunol.* 37:191-201 (2000). En síntesis, se extrae sangre de un sujeto sano en un tubo Vacutanier de 7 ml (que contiene 7 unidades de heparina por ml de sangre completa). Un tubo de polietileno similar al que se usa en los procedimientos de CPB (p. ej., I.D. 2,92 mm; O.D. 3,73 mm, longitud: 45 cm) se rellena con 1 ml de sangre y se cierra en un bucle con una pieza corta de un tubo de silicona. Un tubo control que contiene sangre heparinizada con EDTA 10 mM se incluyó en el estudio como control de fondo. La muestra y los tubos control se giraron verticalmente en un baño de agua durante 1 hora a 37° C. Después de la incubación, las muestras de sangre se transfirieron a tubos microfugos de 1,7 ml que contenían EDTA, resultando en una concentración final de EDTA 20 mM. Las muestras se centrifugaron y se recogió el plasma. Se añaden agentes inhibidores de MASP-2, tales como anticuerpos anti-MASP-2 a la sangre heparinizada inmediatamente antes de la rotación. Las muestras de plasma se someten luego a ensayos para medir la concentración de C3a y C5b-9 soluble como se describe en Gupta-Bansal et al., 2000, *supra*.

Ejemplo 23

Este ejemplo describe el uso de un sistema modelo de ligadura y punción del ciego (CLP) en ratones para ensayar agentes inhibidores de MASP-2 útiles para tratar septicemia o una afección resultante de septicemia, incluido choque septicémico, síndrome de dificultad respiratoria aguda resultante de septicemia y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

Antecedentes y fundamentos: Como se analizó anteriormente, se ha demostrado en numerosos estudios que la activación del complemento tiene una función importante en la patogénesis de la septicemia (véase Bone, R.C., *Annals. Internal. Mecl.* 115:457-469, 1991). El modelo de roedor de CLP es un modelo reconocido que imita el curso clínico de la septicemia en seres humanos y se considera un modelo sustituto razonable para septicemia en seres humanos (véase Ward, P., *Nature Review Immunology* Vol 4: 133-142 (2004). Un estudio reciente ha demostrado que el tratamiento de animales CLP con anticuerpos anti-C5a produjo bacteremia y una supervivencia muy mejorada (Huber-Lang et al., *J. of Immunol.* 169: 3223-3231 (2002). En consecuencia, en base a las observaciones descritas en este documento de que la MASP-2 cumple una función esencial en el inicio de las vías de lectinas y alternativa, el modelo de roedor de CLP es útil para seleccionar agentes inhibidores de MASP-2 eficaces para uso como agentes terapéuticos a fin de prevenir o tratar la septicemia o una afección resultante de septicemia.

Métodos: El modelo CLP se adapta del modelo descrito en Huber-Lang et al., 2004, anteriormente mencionado de la siguiente manera. Se anestesian animales MASP-2^{-/-} y MASP-2^{+/+}. Se realiza una incisión abdominal en la línea media de 2 cm y se liga firmemente el ciego debajo de la válvula ileocecal, evitando la obstrucción intestinal. El ciego luego se punza con una aguja número 21. La incisión abdominal se cierra luego en capas con sutura de seda y grapas para piel (Ethicon, Summerville, NJ). Inmediatamente después de CLP, los animales reciben una inyección de un agente inhibidor de MASP-2 tal como anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 (en un intervalo de dosis de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg). Los anticuerpos monoclonales anti-hMASP-2 como agentes terapéuticos se pueden evaluar fácilmente en un modelo de CLP con genes modificados de ratón de MASP-2^{-/-}, hMASP-^{+/+}. El plasma de los ratones se analiza luego para niveles de anafilatoxinas derivadas del complemento y ataque respiratorio usando los ensayos descritos en Huber-Lang et al., 2004, *supra*.

Ejemplo 24

Este ejemplo describe la identificación de fragmentos de anticuerpo Fab2 anti-MASP-2 de gran afinidad.

Antecedentes y criterios: MASP-2 es una proteína compleja con muchos dominios funcionales separados, incluido el sitio(s) de unión para MBL y ficolinas, un sitio catalítico de serina proteasa, un sitio de unión para el sustrato proteolítico C2, un sitio de unión para el sustrato proteolítico C4, un sitio de escisión de MASP-2 para autoactivación de cimogeno de MASP-2 y dos sitios de unión a Ca⁺⁺. Se identificaron fragmentos de anticuerpo Fab2 que se unen con gran afinidad a MASP-2, y los fragmentos de Fab2 identificados se ensayaron en un ensayo funcional para determinar si eran capaces de bloquear la actividad funcional de MASP-2.

Para bloquear la actividad funcional de MASP-2, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo Fab2 debe unirse e interferir con un epítipo estructural en MASP-2 que se requiere para actividad funcional de MASP-2. Por lo tanto, muchos o todos los Fab2 anti-MASP-2 de unión de gran afinidad pueden no inhibir la actividad funcional de MASP-2 a menos que se unan a los epítipos estructurales en MASP-2 directamente implicados en la actividad funcional de MASP-2.

Se empleó un ensayo funcional que mide la inhibición de la formación de convertasa C3 de la vía de lectinas para evaluar la "actividad bloqueante" de Fab2 anti-MASP-2. Se sabe que la función fisiológica primaria de MASP-2 en la vía de lectinas consiste en generar el siguiente componente funcional de la vía del complemento mediada por lectinas, a saber, la convertasa C3 de la vía de lectinas. La convertasa C3 de la vía de lectinas es un complejo enzimático crítico (C4bC2a) que escinde en forma proteolítica C3 en C3a y C3b. MASP-2 no es un componente

estructural de la convertasa C3 de la vía de lectinas (C4bC2a); sin embargo, la actividad funcional de MASP-2 se requiere para generar dos componentes de proteínas (C4b, C2a) que comprenden la convertasa C3 de la vía de lectinas. Asimismo, todas las actividades funcionales separadas de MASP-2 mencionadas anteriormente parecen requerirse para que MASP-2 genere la convertasa C3 de la vía de lectinas. Por estos motivos, se cree que un ensayo preferido para usar en la evaluación de la "actividad bloqueante" de Fab2 anti-MASP-2 Fab2s es un ensayo funcional que mide la inhibición de la formación de convertasa C3 de la vía de lectinas.

Generación de Fab2 de gran afinidad: Se usó una biblioteca de exhibición de fagos de secuencias de anticuerpos de cadenas variables ligera y pesada humanas y tecnología de selección automática de anticuerpos para identificar Fab2 que reaccionan con ligando de interés seleccionados a fin de crear Fab2 de gran afinidad hacia la proteína MASP-2 de rata (SEC ID NO:55). Se utilizó una cantidad conocida de proteína MASP-2 de rata (~1 mg, >85% pura) para selección de anticuerpos. Se utilizaron tres tandas de ampliación para selección de los anticuerpos con la mejor afinidad. Se escogieron aproximadamente 250 hits diferentes que expresaban los fragmentos de anticuerpos para selección por ELISA. Los hits de gran afinidad se secuenciaron posteriormente para determinar la singularidad de los diferentes anticuerpos.

Se purificaron cincuenta anticuerpos anti-MASP-2 únicos y 250 µg de cada anticuerpo Fab2 purificado se usó para caracterización de afinidad de unión a MASP-2 y ensayo funcional de la vía del complemento, como se describe en más detalle a continuación.

Ensayos utilizados para evaluar la actividad inhibidora (bloqueante) de Fab2 anti-MASP-2

1. Ensayo para medir la inhibición de la formación de la convertasa C3 de la vía de lectinas:

Antecedentes: La convertasa C3 de la vía de lectinas es un complejo enzimático (C4bC2a) que escinde en forma proteolítica C3 en los dos fragmentos proinflamatorios potentes, anafilatoxina C3a y C3b opsónico. La formación de convertasa C3 parece ser un paso clave en la vía de lectinas en términos de mediar la inflamación. MASP-2 es un componente no estructural de la convertasa C3 de la vía de lectinas (C4bC2a); en consecuencia, los anticuerpos anti-MASP-2 (o Fab2) no inhibirán directamente la actividad de convertasa C3 pre-existente. Sin embargo, la actividad de la serina proteasa de MASP-2 se requiere para generar los dos componentes de la proteína (C4b, C2a) que comprenden la convertasa C3 de la vía de lectinas. Por lo tanto, Fab2 anti-MASP-2, que inhibe la actividad funcional de MASP-2 (es decir, bloquea Fab2 anti-MASP-2), inhibirá la formación nueva de la convertasa C3 de la vía de lectinas. C3 contiene un grupo tioéster inusual y altamente reactivo como parte de su estructura. Tras la escisión de C3 por convertasa C3 en este ensayo, el grupo tioéster en C3b puede formar un enlace covalente con grupos hidroxilo o amino en macromoléculas inmovilizadas en el fondo de pocillos plásticos mediante enlaces éster o amida, facilitando así la detección de C3b en el ensayo ELISA.

El manano de levadura es un activador conocido de la vía de lectinas. En el siguiente método para medir la formación de convertasa C3, pocillos de plástico recubiertos con manano se incubaron durante 30 min a 37° C con suero de rata diluido para activar la vía de lectinas. Los pocillos luego se lavaron y ensayaron para C3b inmovilizado en los pocillos usando métodos ELISA estándar. La cantidad de C3b generado en este ensayo es un reflejo directo de la formación nueva de convertasa C3 de la vía de lectinas. Se ensayaron Fab2 anti-MASP-2 en concentraciones seleccionadas en este ensayo por su capacidad de inhibir la formación de convertasa C3 y la consecuente generación de C3b.

Métodos:

Se incubaron placas de unión medianas de 96 pocillos Costar durante toda la noche a 5 °C con manano diluido en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,5 a 1 µg/50 µl/pocillo. Después de incubar durante toda la noche, cada pocillo se lavó tres veces con 200 µl de PBS. Los pocillos luego se bloquearon con 100 µl/pocillo de albúmina de suero bovino al 1% en PBS y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente mezclando moderadamente. Cada pocillo se lavó luego tres veces con 200 µl de PBS. Las muestras de Fab2 anti-MASP-2 se diluyeron hasta concentraciones seleccionadas en tampón GVB que contenía Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (barbital 4,0 mM, NaCl 141 mM, NgCl 1,0 mM, CaCl 2,0 mM, 0,1% gelatina, pH 7,4) a 5° C. Se añadió suero de rata al 0,5% a las muestras anteriores a 5° C y se transfirieron 100 µl a cada pocillo. Las placas se cubrieron e incubaron durante 30 minutos en un baño de agua a 37 C para permitir la activación del complemento. La reacción se detuvo por transferencia de las placas del baño de agua de 37 °C a un recipiente que contenía una mezcla de agua con hielo. Cada pocillo se lavó cinco veces con 200 µl de PBS-Tween 20 (0,05% Tween 20 en PBS), luego dos veces con 200 µl PBS. Se añadió 100 µl/pocillo de una dilución 1:10.000 del anticuerpo primario (C3c antihumano de conejo, DAKO A0062) en PBS que contenía 2,0 mg/ml albúmina de suero bovino y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente mezclando moderadamente. Cada pocillo se lavó 5 x 200 µl en PBS. Se añadió 100 µl/pocillo de una dilución 1:10.000 del anticuerpo secundario (IgG anticonejo conjugada a peroxidasa, American Qualex A102PU) en PBS que contenía 2,0 mg/ml de albúmina de suero bovino y se incubó durante una hora a temperatura ambiente en un agitador mezclando moderadamente. Cada pocillo se lavó cinco veces con 200 µl PBS. Se añadieron 100 µl pocillo de sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Peny Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. La reacción de peroxidasa se tuvo añadiendo 100 µl/pocillo de H₃PO₄ 1,0 M y se midió la OD₄₅₀.

2. Ensayo para medir la inhibición de la escisión de C4 dependiente de MASP-2

Antecedentes: La actividad de la serina proteasa de MASP-2 es altamente específica, y se han identificado solamente dos sustratos de proteínas para MASP-2; C2 y C4. La escisión de C4 genera C4a y C4b. Fab2 anti-MASP-2 puede unirse a los epítomos estructurales en MASP-2 que están directamente implicados en la escisión de C4 (p. ej., el sitio de unión a MASP-2 para C4; sitio catalítico de serina proteasa de MASP-2) e inhibir así la actividad funcional de escisión de C4 de la MASP-2.

El manano de levadura es un activador conocido de la vía de lectinas. En el siguiente método para medir la actividad de escisión de C4 de la MASP-2, pocillos plásticos recubiertos con manano se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con suero de rata diluido para activar la vía de lectinas. Ya que el anticuerpo primario utilizado en este ensayo ELISA solamente reconoce C4 humana, el suero de rata diluido también se enriqueció con C4 humana (1,0 µg/ml). Los pocillos se lavaron luego y se ensayaron para C4b humano inmovilizado en los pocillos usando métodos ELISA estándar. La cantidad de C4b generado en este ensayo es un indicador de la actividad de escisión de C4 dependiente de MASP-2. Se ensayó en este ensayo Fab2 anti-MASP-2 en concentraciones seleccionadas por su capacidad de inhibir la escisión de C4.

Métodos: Se incubaron placas de unión medianas de 96 pocillos Costar durante toda la noche a 5 °C con manano diluido en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,5 a 1,0 µg/50 µl/pocillo. Cada pocillo se lavó 3X con 200 µl de PBS. Los pocillos luego se bloquearon con 100 µl/pocillo de albúmina de suero bovino al 1% en PBS y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente mezclando moderadamente. Cada pocillo se lavó 3X con 200 µl de PBS. Las muestras de Fab2 anti-MASP-2 se diluyeron hasta concentraciones seleccionadas en tampón GVB que contenía Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (barbital 4,0 mM, NaCl 141 mM, MgCl 1,0 mM, CaCl 2,0 mM, 0,1% gelatina, pH 7,4) a 5 °C. Se incluyó también 1,0 µg/ml de C4 humana (Quidel) en estas muestras. Se añadió 0,5% suero de rata a las muestras anteriores a 5 °C y se transfirieron 100 µl a cada pocillo. Las placas se cubrieron e incubaron durante 30 min en un baño de agua a 37 °C para permitir la activación del complemento. La reacción se detuvo transfiriendo las placas del baño de agua a 37 °C a un recipiente que contenía una mezcla de agua con hielo. Cada pocillo se lavó 5 x 200 µl con PBS-Tween 20 (0,05% Tween 20 in PBS), luego cada pocillo se lavó 2X con 200 µl de PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de una dilución 1:700 de C4c antihumano de pollo conjugado a biotina (Immunsystem AB, Uppsala, Suecia) en PBS que contenía 2,0 mg/ml albúmina de suero bovino (BSA) y se incubó una hora a temperatura ambiente mezclando moderadamente. Cada pocillo se lavó 5 x 200 µl de PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de 0,1 µl/ml de estreptavidina conjugada a peroxidasa (Pierce Chemical #21126) en PBS que contenía 2,0 mg/ml BSA y se incubó durante una hora a temperatura ambiente en un agitador mezclando moderadamente. Cada pocillo se lavó 5 x 200 µl con PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo del sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Peny Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 16 min. La reacción de peroxidasa se detuvo añadiendo 100 µl/pocillo de H₃PO₄ 1,0 M y se midió la OD₄₅₀.

3. Ensayo de unión de Fab2 anti-MASP-2 de rata a MASP-2 de rata "natural"

Antecedentes: MASP-2 usualmente está presente en el plasma como un complejo dimérico de MASP-2 que también incluye moléculas de lectina específicas (proteína de unión a manano (MBL) y ficolinas). Por consiguiente, si uno está interesado en estudiar el ensayo de unión de Fab2 anti-MASP-2 a la forma fisiológicamente relevante de MASP-2, es importante desarrollar un ensayo de unión en el que se use la interacción entre Fab2 y MASP-2 'natural' en el plasma en lugar de MASP-2 recombinante purificada. En este ensayo de unión, el complejo MASP-2-MBL 'natural' de 10% suero de rata se inmovilizó primero a pocillos recubiertos con manano. Se estudió luego la afinidad de unión de diversos Fab2 anti-MASP-2 a la MASP-2 'natural' inmovilizada, usando una metodología ELISA estándar.

Métodos: Se incubaron placas de gran unión Costar durante toda la noche a 5 °C con manano diluido en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,5 a 1 µg/50 µl/pocillo. Cada pocillo se lavó 3X con 200 µl PBS. Los pocillos se bloquearon con 100 µl/pocillo de 0,5% leche en polvo desnatada en PBST (PBS con 0,05% Tween 20) y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente mezclando moderadamente. Cada pocillo se lavó 3X con 200 µl de tampón de lavado TBS/Tween/Ca⁺⁺ (disolución tamponada con Tris, 0,05% Tween 20, que contenía CaCl 5,0 mM, pH 7,4. Se preparó en hielo 10% suero de rata en tampón salino de gran unión (Tris 20 mM, NaCl 1,0 M, CaCl₂ 10 mM, 0,05% Triton-X100, 0,1% (p/v) albúmina de suero bovino, pH 7,4). Se añadieron 100 µl/pocillo y se incubó durante la noche a 5 °C. Los pocillos se lavaron 3X con 200 µl de tampón de lavado TBS/Tween/Ca⁺⁺. Los pocillos se lavaron luego 2X con 200 µl PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de concentración seleccionada de Fab2 anti-MASP-2 en tampón GVB que contenía Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (barbital 4,0 mM, NaCl 141 mM, MgCl₂ 1,0 mM, CaCl₂ 2,0 mM, 0,1% gelatina, pH 7,4) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente mezclando moderadamente. Cada pocillo se lavó 5 x 200 µl con PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de anti-Fab2 de cabra conjugado a HRP (Biogenesis Cat No 0500-0099) diluido 1:5000 en 2,0 mg/ml de albúmina de suero bovino en PBS y se incubó durante una hora a temperatura ambiente mezclando moderadamente. Cada pocillo se lavó 5 x 200 µl de PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 70 min. La reacción de peroxidasa se detuvo por adición de 100 µl/pocillo de H₃PO₄ 1,0M y se midió la OD₄₅₀.

Resultados:

5 Aproximadamente 250 Fab2 distintos que reaccionan con gran afinidad a la proteína MASP-2 de rata se escogieron para ensayo ELISA. Estos Fab2 de gran afinidad se secuenciaron para determinar la singularidad de los distintos anticuerpos, y se purificaron 50 anticuerpos anti-MASP-2 únicos para posterior análisis. Se usaron 250 ug de cada anticuerpo Fab2 purificado para caracterización de la afinidad de unión a MASP-2 y ensayo funcional de la vía del complemento. Los resultados de este análisis se exponen en la TABLA 6 que sigue.

TABLA 6: Fab2 anti-MASP-2 que bloquea la activación del complemento de la vía de lectinas

Anticuerpo Fab2 núm.	Convertasa C3 (CI ₅₀ (nM))	K _d	Escisión de C4 CI ₅₀ (nM)
88	0,32	4,1	ND
41	0,35	0,30	0,81
11	0,46	0,86	<2 nM
86	0,53	1,4	ND
81	0,54	2,0	ND
66	0,92	4,5	ND
57	0,95	3,6	<2 nM
40	1,1	7,2	0,68
58	1,3	2,6	ND
60	1,6	3,1	ND
52	1,6	5,8	<2 nM
63	2,0	6,6	ND
49	2,8	8,5	<2 nM
89	3,0	2,5	ND
71	3,0	10,5	ND
87	6,0	2,5	ND
67	10,0	7,7	ND

10 Como se expone en la TABLA 6 anterior, de los 50 Fab2 anti-MASP-2 ensayados, se identificaron diecisiete Fab2 como Fab2 bloqueantes de MASP-2 que inhiben potencialmente la formación de convertasa C3 con CI₅₀ equivalente o menor que los Fab2 10 nM (una tasa de hits positivos de 34%). Ocho de los diecisiete Fab2 identificados tienen CI₅₀ en el intervalo subnanomolar. Asimismo, los diecisiete Fab2 bloqueantes de MASP-2 que se exponen en la TABLA 6 produjeron inhibición esencialmente completa de la formación de convertasa C3 en el ensayo de convertasa C3 de la vía de lectinas. La FIGURA 11A ilustra gráficamente los resultados del ensayo de formación de convertasa C3 para el anticuerpo Fab2 #11, que es representativo de los otros anticuerpos Fab2 ensayados, cuyos resultados se muestran en la TABLA 6. Esta es una consideración importante, ya que es teóricamente posible que un Fab2 "bloqueante" pueda inhibir solo fraccionalmente la función de la MASP-2, incluso cuando cada molécula de MASP-2 está unida por Fab2.

20 Si bien se sabe que el manano es un activador conocido de la vía de lectinas, es teóricamente posible que la presencia de anticuerpos anti-manano en el suero de rata pueda también activar la vía clásica y generar C3b mediante la convertasa C3 de la vía clásica. No obstante, cada uno de los diecisiete Fab2 anti-MASP-2 bloqueantes inhibe potencialmente la generación de C3b (>95%), demostrando así la especificidad de este ensayo para la convertasa C3 de la vía de lectinas.

25 También se efectuaron ensayos de unión con los diecisiete Fab2 bloqueantes para calcular un K_d aparente para cada uno. Los resultados de los ensayos de unión de Fab2 anti-MASP-2 de rata a MASP-2 de rata natural para seis de los Fab2 bloqueantes también se exponen en la TABLA 6. La FIGURA 11B ilustra gráficamente los resultados de un ensayo de unión con el anticuerpo Fab2 #11. Se llevaron a cabo ensayos de unión similares para los otros Fab2, cuyos resultados se muestran en la TABLA 6. En general, el K_d aparente obtenido para la unión de cada uno de los seis Fab2 a MASP-2 'natural' se corresponde razonablemente con la CI₅₀ para Fab2 en el ensayo funcional de convertasa C3. Hay evidencias de que la MASP-2 se somete a un cambio conformacional de una forma 'inactiva' a una 'activa' tras la activación de su actividad de proteasa (Feinberg et al., *EMBO J* 22:2348-59 (2003); Gal et al., *J.*

30

- Biol. Chem.* 280:33435-44 (2005)). En el plasma de ratas normales utilizado en el ensayo de formación de convertasa C3, la MASP-2 está presente principalmente en la conformación de cimogeno 'inactivo'. En contraste, en el ensayo de unión, la MASP-2 está presente como parte de un complejo con MBL unida a manano inmovilizada; por ende, la MASP-2 estaría en la conformación 'activa' (Petersen et al., *J. Immunol Methods* 257:107-16, 2001).
- 5 En consecuencia, uno no necesariamente esperaría una correspondencia exacta entre Cl_{50} y K_d de cada uno de los diecisiete Fab2 bloqueantes estudiados en estos dos ensayos funcionales, ya que en cada ensayo el Fab2 estaría uniéndose a una forma conformacional diferente de MASP-2. De todos modos, con la excepción de Fab2 #88, parece haber una correspondencia razonablemente estrecha entre Cl_{50} y K_d aparente para cada uno de los otros dieciséis Fab2 estudiados en los dos ensayos (véase la TABLA 6).
- 10 Se evaluaron varios Fab2 bloqueantes para inhibición de escisión de C4 mediada por MASP-2. La FIGURA 11C ilustra gráficamente los resultados de un ensayo de escisión de C4, que muestra la inhibición de Fab2 #41, con una Cl_{50} =0,81 nM (véase la TABLA 6). Como se muestra en la FIGURA 12, se halló que todos los Fab2 estudiados inhiben la escisión de C4 con Cl_{50} similares a aquellos obtenidos en el ensayo de convertasa C3 (véase la TABLA 6).
- 15 Si bien el manano es un activador conocido de la vía de lectinas, es teóricamente posible que la presencia de anticuerpos anti-manano en el suero de rata podría también activar la vía clásica y generar así C4b por escisión de C4 mediada por C1. No obstante, se han identificado varios Fab2 anti-MASP-2 que inhiben potencialmente la generación de C4b (>95 %), demostrando así la especificidad de este ensayo para la escisión de C4 mediada por MASP-2. C4, al igual que C3, contiene un grupo tioéster inusual y altamente reactivo como parte de su estructura.
- 20 Tras la escisión de C4 por MASP-2 en este ensayo, el grupo tioéster en C4b puede formar un enlace covalente con grupos hidroxilo o amino en macromoléculas inmovilizadas en el fondo de los pocillos plásticos mediante enlaces éster o amida, facilitando de este modo la detección de C4b en el ensayo ELISA.

Estos estudios demuestran claramente la creación de Fab2 de gran afinidad a la proteína MASP-2 de rata que funcionalmente bloquean la actividad de las convertasas C4 y C3, previniendo así la activación de la vía de lectinas.

25 Ejemplo 25

Este Ejemplo describe el mapeo del epítipo para varios anticuerpos Fab2 anti-MASP-2 bloqueantes de rata que se generaron como se describe en el Ejemplo 24.

Métodos:

- 30 Como se muestra en la FIGURA 13, las siguientes proteínas, todas con las marcas N-terminales 6X His, se expresaron en células CHO usando el vector pED4:

MASP-2A de rata, una proteína MASP-2 de longitud total, inactivada alterando la serina en el centro activo a alanina (S613A);

MASP-2K de rata, una proteína MASP-2 de longitud total alterada para reducir la autoactivación (R424K);

CUBI-II, un fragmento N-terminal de MASP-2 de rata que contiene dominios CUBI, de tipo EGF y CUBII solamente; y

- 35 De tipo CUBI/EGF, un fragmento N-terminal de MASP-2 de rata que contiene los dominios de tipo CUBI y EGF solamente.

Estas proteínas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo por cromatografía de afinidad de níquel, como se describió previamente (Chen et al., *J. Biol. Chem.* 276:25894-02 (2001)).

- 40 Un polipéptido C-terminal (CCPII-SP), que contiene CCPII y el dominio de serina proteasa de MASP-2 de rata, se expresó en *E. coli* como proteína de fusión tiorredoxina usando pTrxFus (Invitrogen). La proteína se purificó a partir de lisados celulares usando la resina de afinidad Thiobond. La pareja de fusión de la tiorredoxina se expresó de pTrxFus vacío como control negativo.

Todas las proteínas recombinantes se dializaron en tampón TBS y sus concentraciones se determinaron midiendo la OD a 280 nm.

45 Análisis de transferencia puntual:

- Diluciones en serie de los cinco polipéptidos de MASP-2 recombinantes descritos anteriormente y que se muestran en la FIGURA 13 (y el polipéptido de tiorredoxina como control negativo para el polipéptido de serina proteasa CCPII) se detectaron en una membrana de nitrocelulosa. La cantidad de proteína detectada osciló entre 100 ng y 6,4 pg, en etapas quintuplas. En los experimentos posteriores, la cantidad de proteína detectada osciló entre 50 ng y 16 pg, nuevamente en etapas quintuplas. Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% en TBS (tampón bloqueante), luego se incubaron con 1,0 µg/ml de Fab2 anti-MASP-2 en tampón bloqueante (que contenía Ca^{2+} 5,0 mM). Los Fab2 unidos se detectaron usando Fab antihumano conjugado a HRP (AbD/Serotec; diluido 1/10.000) y un kit de detección ECL (Amersham). Se incubó una membrana con MASP-2Ab antihumano de conejo

policlonal (descrito en Stover et al., *J Immunol* 163:6848-59 (1999)) como control positivo. En este caso, el Ab unido se detectó usando IgG anticonejo de cabra conjugada a HRP (Dako; dilución 1/2.000).

Ensayo de unión a MASP-2

5 Se recubrieron placas ELISA con 1,0 µg/pocillo de MASP-2A recombinante o polipéptido CUB I-II en tampón de carbonato (pH 9,0) durante la noche a 4 °C. Los pocillos se bloquearon con 1% BSA en TBS, luego se añadieron diluciones en serie de los Fab2 anti-MASP-2 en TBS que contenía Ca²⁺ 5,0 mM. Las placas se incubaron durante una hora a TA. Después de lavar tres veces con TBS/tween/Ca²⁺, se añadió Fab antihumano conjugado a HRP (AbD/Serotec) diluido en 1/10.000 en TBS/ Ca²⁺ y las placas se incubaron durante otra hora a TA. El anticuerpo unido se detectó usando un kit de sustrato de peroxidasa TMB (Biorad).

10 Resultados:

15 Los resultados del análisis de transferencia puntual que demuestran la reactividad de los Fab2 con diversos polipéptidos MASP-2 se exponen en la TABLA 7 a continuación. Los valores numéricos provistos en la TABLA 7 indican la cantidad de proteína detectada requerida para dar la fortaleza de señal aproximadamente media máxima. Como se muestra, todos los polipéptidos (excepto la pareja de fusión de tiorredoxina sola) fueron reconocidos por el control positivo Ab (suero de MASP-2 antihumano policlonal, generado en conejos).

TABLA 7: Reactividad con diversos polipéptidos de MASP-2 de rata recombinantes en transferencias puntuales

Anticuerpo Fab2 #	MASP-2A	CUBI-II	De tipo CUBI/EGF	CCPII-SP	Tiorredoxina
40	0,16 ng	NR	NR	0,8 ng	NR
41	0,16 ng	NR	NR	0,8 ng	NR
11	0,16 ng	NR	NR	0,8 ng	NR
49	0,16 ng	NR	NR	>20 ng	NR
52	0,16 ng	NR	NR	0,8 ng	NR
57	0,032 ng	NR	NR	NR	NR
58	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
60	0,4 ng	0,4 ng	NR	NR	NR
63	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
66	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
67	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
71	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
81	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
86	0,4 ng	NR	NR	10 ng	NR
87	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
Control positivo	<0,032 ng	0,16 ng	0,16 ng	<0,032 ng	NR

NR = Ninguna reacción. El anticuerpo control positivo es suero de MASP-2 antihumano policlonal, generado en conejos.

20 Todos los Fab2 reaccionaron con MASP-2A así como también con MASP-2K (no se muestran los datos). La mayoría de los Fab2 reconocieron el polipéptido CCPII-SP pero no los fragmentos N-terminales. Las dos excepciones son Fab2 #60 y Fab2 #57. Fab2 #60 reconoce MASP-2A y el fragmento CUBI-II, pero no el polipéptido de tipo CUBI/EGF ni el polipéptido CCPII-SP, sugiriendo que se une a un epítipo en CUBII, o que abarca el dominio CUBII y de tipo EGF. Fab2 # 57 reconoce MASP-2A pero ninguno de los fragmentos de MASP-2 ensayados, indicando quizás que este Fab2 reconoce un epítipo en CCP1. Fab2 #40 y #49 unido solamente a MASP-2A completa. En el ensayo de
25 unión por ELISA que se muestra en la FIGURA 14, Fab2 #60 también se unió al polipéptido CUBI-II, aunque con una afinidad aparente ligeramente inferior.

Este hallazgo demuestra la identificación de Fab2 bloqueantes únicos con múltiples regiones de la proteína MASP-2

Ejemplo 26

Este ejemplo describe el análisis de ratones MASP-2/- en un modelo de isquemia /reperfusión renal murino.

30 Antecedentes/Fundamentos: La lesión de isquemia-reperfusión (I/R) en el riñón a temperatura corporal tiene

relevancia en una serie de afecciones clínicas, incluido choque hipovolémico, oclusión de las arterias renales y procedimientos de pinzamiento transversal.

La isquemia-reperusión (I/R) renal es una causa importante de insuficiencia renal aguda, asociada con una tasa de mortalidad de hasta 50% (Levy et al., *JAMA* 275:1489-94, 1996; Thadhani et al., *N. Engl. J. Mecl.* 334:1448-60, 1996). La insuficiencia renal post-trasplante es una complicación frecuente y amenazante después del trasplante renal (Nicholson et al., *Kidney Int.* 58:2585-91, 2000). El tratamiento eficaz de la lesión de I/R renal actualmente no está disponible, y la hemodiálisis es el único tratamiento disponible. La patofisiología de la lesión de I/R renal es complicada. Estudios recientes han demostrado que la vía de lectinas de activación del complemento puede tener una función importante en la patogénesis de la lesión de I/R renal (deVries et al., *Am. J. Path.* 7(55):1677-88, 2004).

10 Métodos:

Se generó un ratón MASP-2(-/-) como se describe en el Ejemplo 1 y se retrocruzó por al menos 10 generaciones con C57B1/6. A seis ratones macho MASP-2(-/-) y seis de tipo salvaje (+/+) que pesaban 22-25 g se les administró una inyección intraperitoneal de Hypnovel (6,64 mg/kg; Roche Products Ltd. Welwyn Garden City, Reino Unido), y posteriormente se anestesiaron por inhalación de isoflurano (Abbott Laboratories Ltd., Kent, Reino Unido). Se eligió isoflurano porque es una anestesia de inhalación leve con mínima toxicidad hepática; las concentraciones se producen con exactitud y el animal se recupera rápidamente, incluso después de una anestesia prolongada. Se administró Hypnovel porque produce un estado de neuroleptanalgesia en el animal y esto significa que necesita que se le administre menos isoflurano. Se dispuso una almohadilla tibia debajo del animal con el fin de mantener la temperatura corporal constante. Luego se efectuó una incisión abdominal en la línea media y se mantuvo la cavidad corporal abierta usando un par de retractores. Se despejó el tejido conjuntivo arriba y abajo de la vena y la arteria renal de ambos riñones, derecho e izquierdo, y se aprisionó el pedículo renal con aplicación de pinzas de microaneurisma por un periodo de 55 minutos. Este periodo de isquemia se basó inicialmente en un estudio previo realizado en este laboratorio (Zhou et al., *J. Clin. Invest.* 105:1363-71 (2000)). Además, se escogió un tiempo isquémico estándar de 55 minutos después de la titulación isquémica y se halló que 55 minutos proporcionaron una lesión consistente que también fue reversible, con baja mortalidad, menos del 5%. Después de la oclusión, se dispusieron 0,4 ml de disolución salina caliente (37° C) en la cavidad abdominal y luego se cerró el abdomen por el periodo de la isquemia. Tras extraer las pinzas de microaneurisma, se observaron los riñones hasta cambiar de color, una indicación del reflujo sanguíneo a los riñones. Se dispusieron otros 0,4 ml de disolución salina en la cavidad abdominal y la abertura se suturó, tras lo cual los animales fueron retornados a sus jaulas. Se extrajeron muestras de sangre del rabo 24 horas después de quitar las pinzas, y a las 48 horas los ratones fueron sacrificados y se tomó una muestra de sangre adicional.

Evaluación de lesión renal: La función renal se evaluó 24 y 48 horas después de la reperusión en seis ratones macho MASP-2(-/-) y seis WT (+/+). Se determinó la medición de creatinina en la sangre por espectrometría de masas, que proporciona un índice reproducible de la función renal (sensibilidad < 1,0 µmol/L). La FIGURA 15 ilustra gráficamente el aclaramiento de nitrógeno ureico en la sangre para controles C57B1/6 de tipo salvaje y MASP-2 (-/-) 24 horas y 48 horas después de la reperusión. Como se muestra en la FIGURA 15, los ratones MASP-2(-/-) exhibieron una reducción importante de la cantidad de urea en la sangre a las 24 y 48 horas, en comparación con los ratones control de tipo salvaje, indicando un efecto funcional protector del daño renal en el modelo de lesión de reperusión e isquemia.

En términos generales, se observó un aumento de la urea en la sangre tanto en ratones WT (+/+) como en MASP-2 (-/-) 24 y 48 horas después del procedimiento quirúrgico y el ataque isquémico. Los niveles de urea en la sangre en un animal quirúrgico WT (+/+) no isquémico se determinó por separado en 5,8 mmol/l. Además de los datos presentados en la FIGURA 15, un animal MASP-2 (-/-) demostró la protección prácticamente completa del ataque isquémico, con valores de 6,8 y 9,6 mmol/l a las 24 y a las 48 horas, respectivamente. Este animal se excluyó del análisis grupal como potencial atípico, en donde puede no haber estado presente ninguna lesión isquémica. Por lo tanto, el análisis final que se expone en la FIGURA 15 incluyó 5 ratones MASP-2(-/-) y 6 ratones WT (+/+) y se observó una reducción estadísticamente significativa de la urea en la sangre a las 24 y a las 48 horas en los ratones MASP-2 (-/-) (prueba t de Student $p < 0,05$). Estos hallazgos indican que se esperaría que la inhibición de la actividad de MASP-2 tenga un efecto protector y terapéutico del daño renal debido a lesión isquémica.

50 Ejemplo 27

Este ejemplo describe el análisis de ratones MASP-2(-/-) en un modelo de isquemia/reperusión de miocardio en ratones.

Antecedentes/Fundamentos:

La lectina de unión a manano (MBL) es una molécula circulante que inicia la activación del complemento en un modo independiente del complejo inmune, en respuesta a una amplia gama de estructuras de carbohidrato. Estas estructuras pueden ser componentes de agentes infecciosos o restos carbohidrato endógenos alterados particularmente dentro de las células necróticas, oncóticas o apoptóticas. Estas formas de muerte celular ocurren en miocardio reperfundido en donde la activación del complemento probablemente extiende la lesión más allá del límite

que existe al momento en que la isquemia finaliza por reperfusión. Si bien existen datos convincentes de que la activación del complemento agrava la reperfusión de miocardio, el mecanismo de dicha activación no se entiende bien y es probable que la inhibición de todas las vías conocidas tenga efectos adversos intolerables. Un estudio reciente sugiere que la activación puede implicar a la MBL, en lugar de la vía clásica o el bucle de ampliación alternativo (como se define en la presente invención), ya que el infarto se redujo en MBL(A/C)-, pero no en ratones deficientes de C1q (Walsh M.C. et al., *Jour of Immunol.* 175:541-546 (2005)). No obstante, si bien esto es alentador, estos ratones todavía alojan componentes circulantes, tales como Ficolina A, capaces de activar el complemento a través de la vía de lectinas.

Este estudio investigó ratones MASP-2(-/-) frente a controles (+/+) de tipo salvaje para determinar si la MASP-2(-/-) sería menos sensible a lesión de isquemia y reperfusión de miocardio. Los ratones MASP-2(-/-) se sometieron a isquemia regional y se comparó el tamaño del infarto con sus camadas de tipo salvaje.

Métodos: El siguiente protocolo se basó en un procedimiento para inducir lesión de isquemia/reperfusión previamente descrito por Marber et al., *J. Clin Invest.* 95:1446-1456 (1995)).

Se generó un ratón MASP-2(-/-) como se describe en el Ejemplo 1 y se retrocruzó por al menos 10 generaciones con C57B1/6. Se anestesiaron siete ratones MASP-2 (-/-) y siete ratones (+/+) de tipo salvaje con cetamina /medetomidina (100 mg/kg y 0,2 mg/kg respectivamente) y se dispusieron en posición supina en una almohadilla de calor con control termostático para mantener la temperatura rectal a $37 \pm 0,3$ °C. Los ratones se incubaron bajo visión directa y se ventilaron a aire ambiente a una tasa respiratoria de 110/min y un volumen tidal de 225 μ l/min (Ventilador - Hugo Sachs Elektronik MiniVent Tipo 845, Alemania).

Se rasuró la piel y se efectuó una incisión anterolateral desde la axila izquierda hacia la apófisis xifoides. Se disecó el músculo pectoral mayor, se cortó en su margen esternal y se movió hacia la axila. Se cortó el músculo pectoral menor en su margen craneal y se movió en forma caudal. El músculo se usó posteriormente como colgajo muscular para cubrir el corazón durante la oclusión de la arteria coronaria. Se penetraron los músculos del 5° espacio intercostal y la pleura parietal con tenacillas en un punto ligeramente medio hacia el margen del pulmón izquierdo, evitando así el daño al pulmón o al corazón. Después de la penetración de la pleura, las tenacillas se dirigieron cuidadosamente más allá de la pleura hacia el esternón sin tocar el corazón, y los músculos intercostales y pleurales se disecaron con un cauterizador accionado a batería (Harvard Apparatus, Reino Unido). Se dedicó especial atención a evitar cualquier sangrado. Usando la misma técnica, se extendió la toracotomía a la línea axilar media. Después de cortar la 4ª costilla en su margen esternal, se amplió el espacio intercostal hasta exponer todo el corazón desde la base hasta el vértice. Con dos fórceps pequeños, se abrió el pericardio y se formó un alojamiento pericárdico para mover el corazón ligeramente hacia la posición anterior. Se expuso la arteria coronaria descendiente anterior izquierda (LAD) y se pasó luego una sutura de monofilamento 8-0 con una aguja redonda debajo de la LAD. El sitio de ligadura de la LAD yace justo caudal a la punta de la aurícula izquierda, aproximadamente 1/4 a lo largo de la línea que va desde la cresta auriculoventricular hacia el vértice del ventrículo izquierdo.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en un modo ciego, en donde el investigador desconocía el genotipo de cada animal. Después de completar la instrumentación y los procedimientos quirúrgicos, se les permitió a los ratones un periodo de equilibrio de 15 min. Los ratones se sometieron a 30 min de oclusión de la arteria coronaria con un tiempo de reperfusión de 120 min.

Modelo de oclusión y reperfusión de la arteria coronaria

La oclusión de la arteria coronaria se logró usando el sistema de peso colgante previamente descrito (Eckle et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291 :H2533-H2540, 2006). Ambos extremos de la ligadura de monofilamentos se pasaron por una pieza de 2 mm de largo de un tubo de polietileno PE-10 y se acoplaron al largo de una sutura de 5-0 de longitud usando adhesivo de cianoacrilato. La sutura se dirigió luego por dos varillas metálicas móviles montadas horizontalmente, y masas de 1 g cada una se acoplaron a ambos extremos de la sutura. Por elevación de las varillas, las masas se suspendieron y la sutura se dispuso bajo tensión controlada para ocluir la LAD con una presión definida y constante. La oclusión de la LAD se verificó por la palidez del área de riesgo, que cambió de color la zona de perfusión de la LAD de rojo brillante a violeta, lo cual indicó el cese del flujo sanguíneo. La reperfusión se logró reduciendo las varillas hasta que las masas se apoyaron en la almohadilla de operación y se alivió la tensión de la ligadura. La reperfusión se verificó con los mismos tres criterios utilizados para verificar la oclusión. Los ratones se excluyeron del análisis posterior si no cumplían con los tres criterios o bien al comienzo de la oclusión de la arteria coronaria o al cabo de 15 min de la reperfusión, respectivamente. Durante la oclusión de la arteria coronaria, se mantuvieron la temperatura y la humedad de la superficie del corazón, cubriéndolo con el colgajo de músculo pectoral menor y sellando la toracotomía con una gaza embebida en disolución salina al 0,9%.

Medición del tamaño del infarto de miocardio:

El tamaño del infarto (INF) y el área en riesgo (AAR) se determinaron por planimetría. Después de una inyección i.v. de 500 I.U. de heparina, la LAD se re-ocuyó y se inyectaron lentamente 300 μ l 5% (p/vol) Evans Blue (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido) en la vena yugular para delinear el área de riesgo (AAR). Esto causa que el tinte

ingrese en la región no isquémica del ventrículo izquierdo y deje el AAR isquémica pura. Después de que los ratones habían sido sometidos a eutanasia, se les extrajo rápidamente el corazón. El corazón se enfrió en hielo y se montó en un bloque de 5% agarosa y luego se cortó en 8 porciones transversales de 800 μm de espesor. Todas las porciones se incubaron a 37 °C durante 20 min con 3% cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (Sigma Aldrich, Poole, Reino Unido) disuelto en tampón $\text{Na}_2\text{HP04}/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,1 M ajustado hasta pH 7,4. Las porciones se fijaron durante la noche en 10% formaldehído. Las porciones se dispusieron entre dos portaobjetos y se tomaron imágenes digitales de los lados de cada porción usando un explorador óptico de alta resolución. Las imágenes digitales se analizaron luego usando el software SigmaScan (SPSS, EE.UU.). El tamaño del área del infarto (pálida), el área del ventrículo izquierdo (LV) y el área en riesgo (roja) y la zona del LV normalmente perfundida (azul) se destacaron en cada sección por identificación de su aspecto de color y bordes de color. Las áreas se cuantificaron en ambos lados de cada porción y el investigador las promedió. El tamaño del infarto se calculó como un % de zona de riesgo para cada animal.

Resultados: El tamaño del área del infarto (pálida), el área del LV en riesgo (roja) y la zona del LV normalmente perfundida (azul) se destacaron en cada sección por identificación de su aspecto de color y bordes de color. Las áreas se cuantificaron en ambos lados de cada porción y fueron promediadas por un investigador. Se calculó el tamaño del infarto como un % de zona de riesgo para cada animal. La FIGURA 16A muestra la evaluación de siete ratones WT (+/+) y siete ratones MASP-2 (-/-) para la determinación del tamaño de su infarto después de someterse a la técnica anteriormente descrita de oclusión y reperusión de la arteria coronaria. Como se muestra en la FIGURA 16A, los ratones MASP-2 (-/-) exhibieron una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el tamaño del infarto frente a los ratones de tipo salvaje (+/+), indicando un efecto de miocardio protector del daño en el modelo de lesión de isquemia y reperusión. La FIGURA 16B muestra la distribución de los animales individuales ensayados, indicando un claro efecto protector para los ratones MASP-2 (-/-).

Ejemplo 28

Este ejemplo describe los resultados de MASP-2/- en un modelo de degeneración macular murino.

Antecedentes/Fundamentos: La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es la causa principal de ceguera después de los 55 años en el mundo industrializado. La AMD ocurre en dos formas principales: AMD neovascular (húmeda) y AMD atrófica (seca). La forma neovascular (húmeda) representa el 90% de la pérdida visual severa asociada con AMD, aunque solamente ~20% de los individuos con AMD desarrollan la forma húmeda. Las características clínicas de la AMD incluyen drusas múltiples, atrofia geográfica y neovascularización coroidea (CNV). En diciembre de 2004, la FDA aprobó Macugen (pegaptanib), una nueva clase de fármacos oftálmicos para dirigir y bloquear específicamente los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), para tratamiento de la forma de AMD húmeda (neovascular) (Ng et al., *Nat Rev. Drug Discov* 5:123-32 (2006)). Si bien Macugen representa una nueva y alentadora opción terapéutica para un subgrupo de pacientes con AMD, todavía existe la apremiante necesidad de desarrollar otros tratamientos para esta compleja enfermedad. Múltiples líneas independientes de investigación implican una función central de la activación del complemento en la patogénesis de la AMD. La patogénesis de la neovascularización coroidea (CNV), la forma más grave de AMD, puede implicar la activación de las vías del complemento.

Hace más de veinticinco años, Ryan describió un modelo de lesión CNV inducida por láser en animales (Ryan, S.J., *Tr. Am. Optli. Soc. LXXVII*:707-745, 1979). El modelo fue inicialmente desarrollado usando monos rhesus, sin embargo, desde entonces se ha usado la misma tecnología para desarrollar modelos similares de CNV en una diversidad de animales de investigación, incluido el ratón (Tobe et al., *Am. J. Pathol.* 153:1641-46, 1998). En este modelo, se usa la fotocoagulación con láser para romper la membrana de Bruch, un acto que produce la formación de membranas de tipo CNV. El modelo inducido por láser captura muchas de las características importantes de la afección humana (para una revisión reciente, véase Ambati et al., *Survey Ophthalmology* 48:257-293, 2003). El modelo de ratón inducido por láser está ahora bien consolidado, y se usa como base experimental en una cantidad cada vez mayor de proyectos de investigación. Está en general aceptado que el modelo inducido por láser comparte suficiente similitud biológica con CNV en seres humanos, de tal forma que los estudios preclínicos de patogénesis e inhibición con fármacos que usan este modelo son relevantes para CNV en seres humanos.

Métodos:

Se generó un ratón MASP-2/- como se describe en el Ejemplo 1 y se retrocruzó por 10 generaciones con C57B1/6. El estudio actual comparó los resultados cuando se evaluaron ratones macho MASP-2 (-/-) y MASP-2 (+/+) en el curso de CNV inducida por láser, un modelo acelerado de AMD neovascular que se concentra en el volumen de CNV inducida por microscopía confocal láser de barrido como un indicador de lesión al tejido y determinación de los niveles de VEGF, un potente factor angiogénico implicado en CNV, en el epitelio pigmentario retiniano (RPE)/coroides por ELISA después de la lesión con láser.

Inducción de neovascularización coroidea (CNV): Un individuo que desconocía la asignación al grupo del fármaco efectuó fotocoagulación con láser (532 nm, 200 pM, 100 ms, 75 μm ; Oculight GL, Iridex, Mountain View, CA) en ambos ojos de cada animal en el día cero. Se aplicaron puntos de láser en un modo estandarizado alrededor del nervio óptico, usando un sistema de administración con lámpara de hendidura y un portaobjeto como lente de

contacto. El criterio de valoración morfológico de la lesión con láser fue el aspecto de la burbuja de cavitación, un signo que se cree se correlaciona con la ruptura de la membrana de Bruch. Los métodos detallados y los criterios de valoración que se evaluaron fueron los siguientes.

5 Angiografía con fluoresceína: Se efectuó angiografía con fluoresceína con una cámara y un sistema de imágenes (cámara TRC 50 1A; sistema ImageNet 2.01; Topcon, Paramus, NJ) 1 semana después de la fotocoagulación con láser. Se capturaron las fotografías con una lente 20-D en contacto con la lente de la cámara del fondo después de una inyección intraperitoneal de 0,1 ml de fluoresceína sódica al 2,5%. Un experto en retina no implicado en la fotocoagulación con láser o la angiografía evaluó los angiogramas de fluoresceína brevemente en un modo enmascarado.

10 Volumen de neovascularización coroidea (CNV): Una semana después de la lesión por láser, los ojos fueron enucleados y fijados con paraformaldehído al 4% por 30 min a 4 °C. Se obtuvieron las copas oculares extrayendo los segmentos anteriores y se lavaron tres veces en PBS, seguido de deshidratación y rehidratación a través de una serie de metanol. Después de bloquear dos veces con tampón (PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1% y 0,5% Triton X-100) por 30 minutos a temperatura ambiente, las tazas oculares se incubaron durante toda la noche a 4 °C con 0,5% FITC-isolectina B4 (Vector laboratories, Burlingame, CA), diluido con PBS que contenía BSA al 0,2% y 0,1% Triton X-100, que une los residuos terminales β -D-galactosa en la superficie de las células endoteliales y rotula selectivamente la vasculatura murina. Después de dos lavados con PBS que contenía 0,1% Triton X-100, la retina neurosensorial se separó suavemente y se cortó del nervio óptico. Se efectuaron cuatro incisiones radiales relajantes y el resto del complejo RPE-coroideas-esclerótica se montó en forma horizontal en un medio antifade (Immu-Mount Vectashield Mounting Medium; Vector Laboratories) y se tapó con un cubreobjetos.

20 Los montajes horizontales se examinaron con un microscopio confocal láser de barrido (TCS SP; Leica, Heidelberg, Alemania). Se visualizaron los recipientes excitando con una longitud de onda azul argón (488 nm) y capturando la emisión entre 515 y 545 nm. Se empleó un objetivo de inmersión en aceite 40X para todos los estudios por imágenes. Los cortes ópticos horizontales (paso 1 μ m) se obtuvieron de la superficie del complejo RPE-coroideas-esclerótica. El plano focal más profundo en el que la red vascular coroidea circundante que se conecta a la lesión puede identificarse se juzgó como el piso de la lesión. Cualquier recipiente en el área dirigida por láser y superficial a este plano de referencia se juzgó como CNV. Las imágenes de cada corte se guardaron digitalmente. El área de fluorescencia relacionada con CNV se midió por análisis de imágenes computarizado con el software de microscopio (TCS SP; Leica). La suma de todo el área fluorescente en cada corte horizontal se usó como un índice para el volumen de CNV. Las imágenes fueron realizadas por un operador enmascarado a la asignación al grupo de tratamiento.

25 Ya que la probabilidad de que cada lesión por láser se convierta en CNV es influenciada por el grupo al que pertenece (ratón, ojo y punto láser), los volúmenes de lesión medios se compararon usando un modelo mixto lineal con un diseño de medición repetida de parcela dividida. El factor de parcela completa fue el grupo genético al cual pertenece el animal, mientras que el factor de parcela dividida fue el ojo. La significación estadística se determinó en el nivel 0,05. Las comparaciones *post hoc* de las medias se construyeron con un ajuste Bonferroni para múltiples comparaciones.

30 VEGF ELISA. Tres días después de la lesión por 12 puntos láser, el complejo RPE-coroideas se sonicó en tampón de lisis (HCl de imidazol 20 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 10 mM, 1% Triton X-100, NaF 10 mM, molibdato de Na 1 mM y EDTA 1 mM con inhibidor de proteasa) en hielo durante 15 min. Los niveles de proteína VEGF en el sobrenadante se determinaron por un kit ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) que reconoce todas las variantes de empalme a 450 a 570 nm (Emax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA), y se normalizó hasta proteína total. Las mediciones duplicadas se realizaron en un modo enmascarado por un operador no implicado en la fotocoagulación, imágenes ni angiografía. Los números VEGF se representaron como el promedio del error estándar de la media de por lo menos tres experimentos y se comparó usando la prueba U de Mann-Whitney. La hipótesis nula se rechazó a P<0,05.

Resultados:

Evaluación de niveles de VEGF:

35 La FIGURA 17A ilustra gráficamente los niveles de proteína VEGF en el complejo RPE-coroideas de ratones C57B16 de tipo salvaje y MASP-2(-/-) en el día cero. Como se muestra en la FIGURA 17A, la evaluación de los niveles de VEGF indica una reducción de los niveles iniciales para VEGF en los ratones MASP-2 (-/-) frente a ratones control de tipo salvaje C57bl. La FIGURA 17B ilustra gráficamente los niveles de proteína VEGF medidos en el día tres después de la lesión inducida por láser. Como se muestra en la FIGURA 17B, los niveles de VEGF aumentaron significativamente en los ratones (+/+) de tipo salvaje tres días después de la lesión inducida por láser, coherente con los estudios publicados (Nozaki et al., *Proc. Natl. Acacl. Sci. EE. UU.* 103:2328-33 (2006)). No obstante, se observaron niveles sorprendentemente muy bajos de VEGF en los ratones MASP-2 (-/-).

Evaluación de neovascularización coroidea (CNV):

Además de la reducción de los niveles de VEGF después de la degeneración macular inducida por láser, se

determinó el área de CNV antes y después de la lesión por láser. La FIGURA 18 ilustra gráficamente el volumen de CNV medido en ratones C57bl de tipo salvaje y ratones MASP-2(-/-) el día siete posterior a la lesión inducida por láser. Como se muestra en la FIGURA 18, los ratones MASP-2 (-/-) exhibieron una reducción de aproximadamente 30% en el área de CNV después del daño inducido por láser en el día siete, en comparación con los ratones control de tipo salvaje.

Estos hallazgos indican una reducción en VEGF y CNV como se observa en los ratones MASP (-/-) frente a (+/+) control de tipo salvaje y que el bloqueo de MASP-2 con un inhibidor tendría un efecto terapéutico o preventivo en el tratamiento de la degeneración macular.

Ejemplo 29

Este ejemplo describe los resultados de MASP-2(-/-) en un modelo de artritis reumatoidea inducido por anticuerpo monoclonal murino

Antecedentes/Fundamentos: El modelo animal más comúnmente utilizado para artritis reumatoidea (RA) es la artritis inducida por colágeno (CIA) (para una revisión reciente, véase Linton y Morgan, *Mol. Immunol.* 36:905-14, 1999). El colágeno de tipo II (CII) es uno de los principales constituyentes de las proteínas de matriz articular, y la inmunización con CII natural en adyuvante induce la poliartritis autoinmune por una respuesta autoinmune reactiva cruzada a CII en cartílago articular. Como en la RA, la susceptibilidad a CIA está unida a la expresión de ciertos alelos MHC de clase II. Algunas cepas de ratones, incluida la cepa C57B1/6, son resistentes a la CIA clásica porque carecen de un haplotipo MHC y por lo tanto no generan altas titulaciones de anticuerpos anti-CII. No obstante, se ha observado que la artritis consistente se puede inducir en todas las cepas de ratones por administración *i.v.* o *i.p.* en ratones de un cóctel de cuatro anticuerpos monoclonales específicos contra colágeno de tipo II. Estos anticuerpos monoclonales artridogénicos se comercializan (Chondrex, Inc., Redmond, WA). Este modelo de transferencia pasiva de CIA se ha utilizado exitosamente en una serie de informes recién publicados que usan la cepa de ratón C57B1/6 (Kagari et al., *J. Immunol.* 169:1459-66, 2002; Kato et al., *J. Rheumatol.* 30:241-55, 2003; Banda et al., *J. Immunol.* 777:1904-12, 2006). El siguiente estudio comparó la sensibilidad de ratones de tipo salvaje (+/+) (WT) y MASP-2 (-/-), en donde ambos comparten el fondo genético C57B1/6m con el desarrollo de artritis usando el modelo de transferencia pasivo de CIA.

Métodos:

Animales: Se generó un ratón MASP-2(-/-) como se describe en el Ejemplo 1 y se retrocruzó por 10 generaciones con C57B1/6. Se usaron en este estudio catorce ratones de tipo salvaje macho y hembra C57BL/6 de siete a ocho semanas de vida al momento de la inyección del anticuerpo y diez ratones macho y hembra MASP-2(-/-) y (+/+) C57B1/6 de tipo salvaje que tenían siete u ocho semanas de vida al momento de la inyección del anticuerpo. Se inyectaron veinte ratones con un cóctel de anticuerpo monoclonal para obtener 20 respondedores sólidos (dos grupos de diez). Los animales (diez/grupo) se alojaron con cinco animales/jaula y se aclimataron de cinco a siete días antes de iniciar el estudio.

Los ratones recibieron una inyección intravenosa de cóctel de anticuerpo monoclonal (Chondrex, Redmond WA) (5 mg) el día 0 y el día 1. El agente de ensayo fue un anticuerpo monoclonal + LPS de Chondrex. El día 2, los ratones recibieron una dosis *ip* de LPS. Los ratones se pesaron en los días 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y antes de finalizar el día 14. El día 14, los ratones fueron anestesiados con isoflurano y desangrados terminalmente para suero. Después de recoger la sangre, los ratones fueron sometidos a eutanasia, y se les extrajeron las extremidades delanteras y posteriores con las rodillas, que se dispusieron en formalina para futuro procesamiento.

Grupos de tratamiento:

Grupo 1 (control): 4 ratones de la cepa C57/BL/6 WT (+/+);

Grupo 2 (ensayo): 10 ratones de la cepa C57/BL/6 WT (+/+) (recibieron cóctel de mAb más LPS); y

Grupo 3 (ensayo): 10 ratones de la cepa C57/BL/MASP-2KO/6Ai (-/-) (recibieron cóctel de mAb más LPS)

La puntuación artrítica clínica se evaluó a diario usando el siguiente sistema de puntuación: 0 = normal; 1= 1 articulación de la pata trasera o delantera afectada; 2= 2 articulaciones de la pata trasera o delantera afectadas; 3= 3 articulaciones de la pata trasera o delantera afectadas; 4= moderada (eritema e inflamación moderada, o 4 articulaciones de dedos afectadas); 5= grave (eritema difuso e inflamación severa en toda la pata, incapaz de flexionar los dedos)

Resultados:

La FIGURA 19 exhibe los datos del grupo graficados para la puntuación de la artritis clínica diaria media por hasta dos semanas. No se observó puntuación de artritis clínica en el grupo control que no recibió el tratamiento con Col2 MoAb. Los ratones MASP (-/-) tuvieron una puntuación de artritis clínica inferior entre el día 9 y el día 14. La puntuación de artritis clínica general con el análisis del área bajo la curva (AUC) indicó una reducción del 21% en el

grupo de ratones MASP-2 (-/-) frente a ratones WT (+/+). No obstante, el fondo de los ratones C57B16 analizado previamente no proporcionó una puntuación clínica de artritis robusta. Debido a la tasa de baja incidencia y al tamaño del grupo, si bien la tendencia es positiva, los datos proporcionaron solamente tendencias ($p = 0,1$) y no fueron estadísticamente significativos en el nivel de $p < 0,05$. Se necesitarían animales adicionales en los grupos de tratamiento para demostrar la significación estadística. Debido a la incidencia reducida de la artritis, las puntuaciones de patas afectadas se evaluaron para gravedad. No se observó incidencia individual de una puntuación de artritis clínica de más de 3 en ninguno de los ratones MASP-2 (-/-), que se observó en 30% de los ratones WT (+/+), lo cual sugiere también (1) que la gravedad de la artritis puede estar relacionada con la activación de la vía del complemento y (2) que el bloqueo de MASP-2 puede tener un efecto beneficioso en la artritis.

10 Ejemplo 30

Este Ejemplo demuestra que la proteína pequeña asociada a lectina de unión a manano (Map 19 o sMAP) es un inhibidor de la activación del complemento dependiente de MASP-2.

Antecedentes/Fundamentos.

Resumen:

15 La lectina de unión a manano (MBL) y las ficolinas son proteínas de reconocimiento de patrones que actúan en inmunidad innata y desencadenan la activación de la vía del complemento de lectinas a través de las serina proteasas asociadas a MBL (MASP). Tras la activación de la vía de lectinas, la MASP-2 escinde C4 y C2. La proteína pequeña asociada a MBL (sMAP), una forma truncada de MASP-2, también está asociada con complejos de MBL/ficolina-MASP. Para aclarar la función de sMAP, hemos generado ratones deficientes de sMAP (*sMAP*^{-/-}) por ruptura dirigida del exón específico de sMAP. Debido a la ruptura del gen, el nivel de expresión de MASP-2 también se redujo en ratones *sMAP*^{-/-}. Cuando la sMAP recombinante (rsMAP) y MASP-2 recombinante (rMASP-2) reconstituyeron el complejo MBL-MASP-sMAP en suero deficiente, la unión de estos recombinantes a MBL fue competitiva, y la actividad de escisión de C4 del complejo MBL-MASP-sMAP se restauró por adición de rMASP-2, mientras que la adición de rsMAP atenuó la actividad. Por lo tanto, la MASP-2 es esencial para la activación de C4, y sMAP cumple una función reguladora en la activación de la vía de lectinas.

Introducción:

El sistema del complemento media una reacción en cadena de proteólisis y ensamblaje de complejos de proteínas, cumpliendo una función importante en la biodefensa como parte de los sistemas inmunes innato y adaptativo. El sistema del complemento mamífero consiste en tres vías de activación, la vía clásica, la vía alternativa y la vía de lectinas (Fujita, *Nat. Rev. Immunol.* 2: 346-353 (2002); Walport, *N Engl J Med* 344: 1058-1066 (2001)). La vía de lectinas provee la línea primaria de defensa contra patógenos invasores. Los componentes de reconocimiento de patógenos de esta vía, lectina de unión a manano (MBL) y ficolinas, se unen a matrices de carbohidratos en las superficies de bacterias, virus y parásitos, y activan las proteasas del suero asociadas a MBL (MASP) para desencadenar una cascada de reacción en dirección 3'. La importancia de la vía de lectinas para la defensa inmune innata se resalta en una serie de estudios clínicos que vinculan una deficiencia de MBL con una mayor susceptibilidad a una diversidad de enfermedades infecciosas, particularmente en la primera infancia antes de que se establezca el sistema inmunológico adaptativo (Jacket et al., *Immunol Rev* 180: 86-99 (2001); Neth et al. *Infect Immun* 68: 688-693 (2000); Summerfield et al., *Lancet* 345: 886-889 (1995); Super et al., *Lancet* 2: 1236-1239 (1989)). Sin embargo, la vía de lectinas también contribuye a la activación indeseada del complemento, que está implicada en la inflamación y en el daño al tejido en una serie de afecciones patológicas, incluida la lesión de isquemia/perfusión en corazón y riñones (de Vries et al., *Am J Pathol* 165: 1677-1688 (2004); Fiane et al., *Circulation* 108: 849-856 (2003); Jordan et al., *Circulation* 104: 1413-1418 (2001); Walsh et al., *J Immunol* 175: 541-546 (2005)).

Como se mencionó anteriormente, la vía de lectinas implica el reconocimiento de carbohidratos por MBL y ficolinas (Fujita et al, *Immunol Rev* 198: 185-202 (2004); Holmskov et al, *Annu Rev Immunol* 21: 547-578 (2003); Matsushita y Fujita, *Immunobiology* 205: 490-497 (2001); y estas lectinas forman complejo con MASP-1 (Matsushita y Fujita, *J Exp Med* 176: 1497-1502 (1992); Sato et al, *hit Immunol* 6: 665-669 (1994); Takadaetal, *Biochem Biophys Res Commun* 196: 1003-1009 (1993), MASP-2 (Thiel et al, *Nature* 386: 506-510 (1997), MASP-3 (Dahl et al, *Immunity* 15: 127-135 (2001) y una proteína truncada de MASP-2 (proteína pequeña asociada a MBL; sMAP o MAP19) (Stoveretal, *J Immunol* 162: 3481-3490 (1999); Takahashi et al, *Int Immunol* 11: 8590863 (1999). Los miembros de la familia MASP consisten en seis dominios; dos dominios de proteínas morfogenéticas C1r/C1s/Uegf/ósea (CUB), un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF), dos proteínas de control del complemento (CCP) o dominios cortos de repeticiones de consenso (SCR) y un dominio de serina proteasa (Matsushita et al, *Curr Opin Immunol* 10: 29-35 (1998). MASP-2 y sMAP son generadas por el empalme alternativo de un gen estructural simple, y sMAP consiste en el primer dominio CUB (CUB1), el dominio de tipo EGF y 4 aminoácidos extras en el extremo C-terminal codificado por un exón específico de sMAP. MASP-1 y MASP-3 son también generados por un gen simple mediante el empalme alternativo (Schwaeble et al, *Immunobiology* 205: 455-466 (2002). Cuando MBL y las ficolinas se unen a los carbohidratos en la superficie de los microbios, la forma de proenzima de MASP se escinde entre el segundo CCP y el dominio proteasa, resultando en la forma activa que consiste en dos polipéptidos, llamados cadena pesada (H) y ligera (L), y adquiriendo así las actividades proteolíticas contra los componentes del complemento. La

evidencia acumulada demuestra que la MASP-2 escinde C4 y C2 (Matsushita et al, *J. Immunol* 165: 2637-2642 (2000) lo cual conduce a la formación de la convertasa C3 (C4bC2a). Propusimos que MASP-1 escinde C3 directamente y posteriormente activa el bucle de ampliación (Matsushita y Fujita, *Immunobiology* 194: 443-448 (1995), pero esta función es controversial (Ambrus et al, *J. Immunol* 170: 1374-1382 (2003). Si bien MASP-3 también contiene un dominio serina proteasa en la cadena L y exhibe su actividad proteolítica contra un sustrato sintético (Zundel et al, *J Immunol* 172: 4342-4350 (2004), sus sustratos fisiológicos no han sido identificados. La función de sMAP que carece del dominio serina proteasa sigue siendo desconocida.

En el presente estudio, para aclarar la función de sMAP en la activación de la vía del complemento de lectinas, hemos roto el exón específico de sMAP que codifica 4 residuos de aminoácidos (EQSL) en el extremo C-terminal de sMAP, y generamos ratones *sMAP*^{-/-}. Informamos aquí por primera vez la capacidad de sMAP de reducir la activación de la vía de lectinas.

Materiales y métodos

Ratones

Se construyó un vector de direccionamiento que contenía el exón 1-4 y parte del exón 6 del gen *MASP-2* del ratón 129/Sv y un cassette del gen de resistencia a neomicina en lugar del exón 5 (Figura 20A). Se insertó un gen *DT-A* en el extremo 3' del vector y se insertaron tres sitios *lox p* para efectuar el direccionamiento condicional para eliminar el cassette de neomicina y la región promotora en el futuro. El vector de direccionamiento se electroporó en las células ES de 129/Sv. Los clones ES dirigidos se microinyectaron en blastocitos de C57BL/6J que se implantaron en el útero de madres ICR adoptivas. Los ratones quiméricos macho se aparearon con ratones C57BL/6J hembra para producir ratones (+/-) heterocigotos. Los ratones (+/-) heterocigotos se seleccionaron por análisis Southern de cola de ADN digerida con *BamH I* usando la sonda que se indica en la Figura 20A. El análisis Southern mostró bandas de 6,5-kbp y 11-kbp en el ADN de los ratones (+/-) heterocigotos (Figura 20B). Los ratones heterocigotos (+/-) se retrocruzaron con ratones C57BL/6J. Para obtener ratones (-/-) homocigotos, los ratones (+/-) heterocigotos se inter cruzaron. Los ratones (-/-) homocigotos (fondo C57BL/6J) se identificaron por genotipificación basada en PCR de cola de ADN. El análisis de PCR se efectuó usando una mezcla de cebadores sentido específicos del exón 4 y específicos del gen *neo* y un cebador antisentido específico del exón 6. El ADN de los ratones (-/-) homocigotos produjo una banda simple de 1,8-kbp (Figura 20C). En todos los experimentos, se utilizaron ratones de 8 a 12 semanas de vida de acuerdo con los lineamientos para experimentación animal de Fukushima Medical University.

Análisis Northern

Se separó Poly(A)+ ARN (1 µg) de hígados de ratones (+/+) de tipo salvaje y (-/-) homocigotos por electroforesis, se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con una sonda de ADNc marcada con 32P específica para sMAP, cadena H de MASP-2, cadena L de MASP-2, o el gen *neo*. Se cortó en tiras la misma membrana y se rehibridó con una sonda específica de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

RT-PCR cuantitativa

Se realizó PCR en tiempo real con LightCycler System (Roche Diagnostics). Se usaron ADNc sintetizados de 60 ng de poly(A)+ ARN de hígados de ratones (+/+) de tipo salvaje y (-/-) homocigotos como moldes para PCR en tiempo real, y se ampliaron y vigilaron los fragmentos de ADNc de cadenas H y L de MASP-2 y sMAP.

Inmunotransferencia

La muestra se sometió a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10 o 12% bajo condiciones reductoras y las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Las proteínas en las membranas se detectaron con antisuero anti-MASP-1 generado contra la cadena L de MASP-1 o con antisuero anti-MASP-2/sMAP generado contra el péptido de la cadena H de MASP-2.

Detección de MASP y sMAP en el complejo MBL-MASP-sMAP

Se añadió suero de ratón (20 µl) a 480 µl de tampón TBS-Ca²⁺ (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M y CaCl₂ 5 mM) que contenía 0,1% (p/v) BSA (TBS-Ca²⁺/BSA) y se incubó con 40 µl de 50% de suspensión de manano-gel de agarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en tampón TBS-Ca²⁺/BSA a 4 °C durante 30 min. Después de la incubación, cada gel se lavó con tampón TBS-Ca²⁺ y se añadió el tampón de muestra para SDS-PAGE al gel. El gel se hirvió y el sobrenadante se sometió a SDS-PAGE, seguido de inmunotransferencia para detectar MASP-1, MASP-2 y sMAP en el complejo de MBL.

Ensayo de deposición de C4

Se diluyó suero de ratón con tampón TBS-Ca²⁺/BSA hasta 100 µl. La muestra diluida se añadió a pocillos de microtitulación recubiertos con manano y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Los pocillos se lavaron con el tampón de lavado frío (tampón TBS-Ca²⁺ que contenía 0,05% (v/v) Tween 20). Después de lavar, se añadió C4 humana a cada pocillo y se incubó en hielo durante 30 min. Los pocillos se lavaron con tampón de lavado frío y

se añadió anticuerpo policlonal de C4 humano conjugado a HRP (Biogenesis, Poole, Inglaterra) a cada pocillo. Después de la incubación a 37 °C durante 30 min, los pocillos se lavaron con el tampón de lavado y se añadió disolución de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) a cada pocillo. Después de desarrollar, se añadió H₃PO₄ 1 M y se midió la absorbancia a 450 nm.

5 Ensayo de deposición de C3

Se diluyó suero de ratón con tampón BBS (barbital 4 mM, NaCl 145 mM, CaCl₂ 2 mM y MgCl₂ 1 mM, pH 7,4) que contenía 0,1% (p/v) HSA hasta 100 µl. La muestra diluida se añadió a pocillos de microtitulación recubiertos con manano y se incubó a 37 °C durante 1 h. Los pocillos se lavaron con tampón de lavado. Después de lavar, se añadió anticuerpo monoclonal C3c antihumano conjugado a HRP (Dako, Glostrup, Dinamarca) a cada pocillo. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 1 h, los pocillos se lavaron con el tampón de lavado y se añadió disolución TMB a cada pocillo. El color se midió como se describió anteriormente.

Recombinantes

sMAP de ratón recombinante (rsMAP), rMASP-2 y el mutante de MASP-2 de ratón inactivo (MASP-2i), cuyo residuo serina del sitio activo en el dominio serina se sustituyó por el residuo alanina, se prepararon como se describió anteriormente (Iwaki y Fujita, 2005).

Reconstitución del complejo MBL-MASP-sMAP

Se incubaron suero de ratón (-/-) homocigoto (20 µl) y varias cantidades de MASP-2i y/o rsMAP en un volumen total de 40 µl en tampón TBS-Ca²⁺ en hielo durante la noche. La mezcla se incubó con suspensión de manano-gel de agarosa, y se detectaron MASP-2i y rsMAP en el complejo MBL-MASP unido al gel como se describe en "Detección de MASP y sMAP en el complejo MBL-MASP-sMAP".

Reconstitución de la actividad de deposición de C4

El suero de ratón (-/-) homocigoto (0,5 µl) y diversas cantidades de rMASP-2 y/o rsMAP se incubaron en un volumen total de 20 µl en TBS-Ca²⁺ en hielo durante toda la noche. La mezcla se diluyó con 80 µl de tampón TBS-Ca²⁺/BSA y se añadió a pocillos recubiertos con manano. Todos los procedimientos subsiguientes se realizaron como se describe en el "ensayo de deposición de C4".

Resultados

FIGURA 20: Ruptura dirigida del gen sMAP. (A) Mapas de restricción parciales del gen MASP-2/sMAP, el vector de direccionamiento y el alelo dirigido. El exón específico de sMAP (exón 5) se reemplazó con un cassette del gen neo. (B) Análisis Southern del ADN genómico de descendencia derivada de ratones quiméricos macho apareados con ratones C57BL/6J hembra. Se digirió cola de ADN con *Bam*H I y se hibridó con la sonda representada en (A). Se derivó una banda de 11-kbp del alelo de tipo salvaje, y una banda de 6,5-kbp del alelo dirigido. (C) Análisis de genotipificación por PCR. Se analizó la cola de ADN usando una mezcla de cebadores sentido específicos del exón 4 y específicos del gen *neo*, y un cebador antisentido específico del exón 6. Se obtuvo una banda de 2,5-kbp del alelo de tipo salvaje, una banda de 1,8-kb del alelo dirigido.

FIGURA 21: Expresión de los ARNm de sMAP y MASP-2 en ratones (-/-) homocigotos. (A) Análisis Northern. Los Poly(A)⁺ ARN de hígados de ratones (+/+) de tipo salvaje y (-/-) homocigotos se sometieron a electroforesis, se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con una sonda marcada con ³²P específica para sMAP, cadena H de MASP-2, cadena L de MASP-2, o el gen *neo*. Se observó una banda específica para *neo* (2,2 kb) en los ratones (-/-) homocigotos. (B) RT-PCR cuantitativa. Las cadenas H y L de MASP-2 y fragmentos de ADNc de sMAP se ampliaron por PCR en tiempo real en un instrumento LightCycler (Roche Diagnostics). Los ADNc se sintetizaron a partir de poly(A)⁺ ARN de hígados de ratones (+/+) de tipo salvaje y (-/-) homocigotos se usaron como moldes. Los datos que se muestran son la media de dos experimentos.

FIGURA 22: Deficiencia de MASP-2 en suero de ratones (-/-) homocigotos. (A) Inmunotransferencia de MASP-2 y sMAP en suero de ratón. Suero de ratones (+/+) de tipo salvaje o (-/-) homocigotos (2 µl) se sometió a inmunotransferencia y se detectó con antisuero anti-MASP-2/sMAP. (B) Detección de MASP y sMAP en el complejo MBL-MASP-sMAP. Se incubó suero de ratón con manano-gel de agarosa y se detectaron sMAP, MASP-1 y MASP-2 en el complejo de MBL unido al gel como se describe en *Materiales y métodos*.

FIGURA 23: Reducción de la escisión de C4 y C3 en suero de ratón (-/-) homocigoto. (A) Deposición de C4 en pocillos recubiertos con manano. Se diluyó 2 veces suero de ratón y se incubó en pocillos recubiertos con manano a temperatura ambiente durante 30 min. Después de lavar los pocillos, se añadió C4 humana a cada pocillo y se incubó en hielo durante 30 min. La cantidad de C4 humana depositada en los pocillos se midió usando anticuerpo policlonal de C4 antihumano conjugado a HRP. (B) Deposición de C3 en pocillos recubiertos con manano. Se añadió suero de ratón diluido a pocillos recubiertos con manano y se incubó a 37 °C durante 1 h. La deposición de C3 endógena en los pocillos se detectó con anticuerpo policlonal C3c antihumano conjugado a HRP.

FIGURA 24: Unión competitiva de sMAP y MASP-2 a MBL. (A) Reconstitución del complejo MBL-MASP-sMAP en suero de ratón (-/-) homocigoto. Se incubaron MASP-2i y/o rsMAP (4 µg) con suero de ratón (-/-) homocigoto (20 µl). La mezcla se incubó además con manano-gel de agarosa, y se detectaron rsMAP y MASP-2i en la fracción unida al gel por inmunotransferencia. (B) Se incubaron diversas cantidades de MASP-2i (0-5 µg) y una cantidad constante de rsMAP (5 µg) con suero de ratón (-/-) homocigoto (20 µl) y se incubó adicionalmente con manano-gel de agarosa. (C) Se incubaron una cantidad constante de MASP-2i (0,5 µg) y diversas cantidades de rsMAP (0-20 µg) con suero de ratón (-/-) homocigoto (20 µl). (D) Se incubaron diversas cantidades de rsMAP (0-20 µg) con suero de ratón (+/+) de tipo salvaje (20 µl).

FIGURA 25: Restauración de la actividad de deposición de C4 por adición de rMASP-2. Diversas cantidades de rsMAP (0-5 µg) (A) o rMASP-2 (0-1,5 µg) (B) se incubaron con 0,5 µl de suero de ratón (-/-) homocigoto en un volumen total de 20 µl en tampón TBS-Ca²⁺ en hielo durante una noche. Luego la mezcla se diluyó con 80 µl de tampón TBS-Ca²⁺/BSA y se añadió a pocillos recubiertos con manano y se midió la cantidad de C4 depositada en los pocillos.

FIGURA 26: Reducción de la actividad de deposición de C4 por adición de sMAP. (A) rMASP-2 (1 µg) y diversas cantidades de rsMAP (0-0,5 µg) se incubaron con 0,5 µl de suero de ratón (-/-) homocigoto. La mezcla se añadió a pocillos recubiertos con manano y se midió la cantidad de C4 depositada en los pocillos. (B) Se incubó rsMAP (0-0,7 µg) con suero de tipo salvaje (0,5 µl) y se midió la cantidad de C4 depositada en los pocillos recubiertos con manano.

Resultados:

Expresión de sMAP y MASP-2 en ratones (-/-) homocigotos

Para aclarar la función de la sMAP *in vivo*, establecimos un ratón dirigido por un gen que carece de sMAP. Se construyó un vector de direccionamiento para reemplazar al exón específico de sMAP (exón 5) con un cassette del gen de resistencia a neomicina (Figura 20A). Se inyectaron clones ES positivos en blastocitos C57BL/6, y las quimeras fundadoras se reprodujeron con hembras C57BL/6J. El análisis Southern de la cola de ADN de cachorros de color agutí exhibió una transmisión germinal del alelo dirigido (Figura 20B). Se seleccionaron ratones (+/-) heterocigotos por análisis Southern de cola de ADN digerida con *BamH* I usando la sonda que se indica en la Figura 20A. El análisis Southern mostró bandas de 6,5 kbp y 11 kbp en el ADN de los ratones (+/-) heterocigotos (Figura 20B). Los ratones (+/-) heterocigotos se retrocruzaron con ratones C57BL/6J. Para obtener ratones (-/-) homocigotos, los ratones (+/-) heterocigotos se entrecruzaron. Los ratones (-/-) homocigotos (fondo C57BL/6J) se identificaron por genotipificación basada en PCR de la cola de ADN, produciendo una sola banda de 1,8 kbp (Figura 20C).

Los ratones (-/-) homocigotos se desarrollaron normalmente y no exhibieron diferencia significativa en peso corporal con los ratones (+/+) de tipo salvaje. Tampoco hubo diferencias morfológicas entre ellos. En un análisis Northern, la sonda específica de sMAP detectó una sola banda de 0,9 kb en ratones (+/+) de tipo salvaje, mientras que no se detectaron bandas específicas en ratones (-/-) homocigotos (Figura 21A). Cuando se usó la sonda específica de la cadena H o L de MASP-2, se detectaron varias bandas específicas en ratones de tipo salvaje (+/+) como se indicó previamente (Stover et al., 1999) y la sonda específica de la cadena H también detectó la banda específica de sMAP. No obstante, en ratones (-/-) homocigotos, las bandas correspondientes fueron muy débiles y se detectaron varias bandas extra. También realizamos un análisis RT-PCR cuantitativo para comprobar los niveles de expresión de los ARNm de sMAP y MASP-2. En ratones (-/-) homocigotos, la expresión de ARNm de sMAP se abolió por completo y aquella de MASP-2 también se redujo notablemente: se cuantificó como aproximadamente 2% de aquella de los ratones (+/+) de tipo salvaje en ambas cadenas H y L por PCR en tiempo real (Figura 21B). Asimismo, examinamos la expresión de MASP-2 a nivel de la proteína. Tanto sMAP como MASP-2 fueron indetectables en suero de ratón (-/-) homocigoto por inmunotransferencia (Figura 22A). Después de la incubación del suero de ratones (-/-) homocigotos con manano-gel de agarosa, tanto sMAP como MASP-2 fueron indetectables en la fracción unida a los geles, aunque se detectó MASP-1 en el complejo (Figura 22B).

Actividades de escisión de C4 y C3 a través de la vía de lectinas en suero de ratón (-/-) homocigoto

Cuando se incubó el suero de ratón (-/-) homocigoto en pocillos recubiertos con manano, la cantidad de C4 humana depositada en los pocillos fue de aproximadamente 20% de aquella en suero normal en diluciones en el intervalo de 1/400 a 1/50 (Figura 23A). También examinamos la actividad de deposición de C3 de la vía de lectinas en suero de ratón (-/-) homocigoto. El suero de ratón se añadió a los pocillos recubiertos con manano y se midió la cantidad de C3 endógena depositada en los pocillos. La cantidad se redujo en el suero deficiente y fue de 21% de aquella en suero normal a una dilución de 1/10 (Figura 23B).

Reconstitución del complejo MBL-MASP-sMAP en suero de ratón (-/-) homocigoto

Cuando se añadió sMAP de ratón recombinante (rsMAP) o el mutante de MASP-2 de ratón inactivo (MASP-2i) al suero de ratón homocigoto (-/-), ambos recombinantes pudieron unirse a MBL (Figura 24A, senderos 3 y 4). Cuando se incubaron rsMAP y MASP-2i simultáneamente con el suero (Figura 24A, sendero 5), ambos recombinantes se detectaron en el complejo MBL-MASP-sMAP. Sin embargo, la cantidad de sMAP unida al complejo fue menos que

aquella cuando se incubó solamente rsMAP con el suero. Luego se investigó también la unión competitiva de sMAP y MASP-2 a MBL. Se añadieron una cantidad constante de rsMAP y varias cantidades de MASP-2i al suero deficiente. La unión de rsMAP se redujo en un modo dependiente de la dosis con cantidades en aumento de MASP-2i (Figura 24B). A la inversa, la cantidad de MASP-2i unida a MBL se redujo por la adición de rsMAP (Figura 24C).
 5 Cuando se añadió rsMAP al suero de tipo salvaje, la unión de sMAP y de MASP-2 endógenas a MBL se redujo en un modo dependiente de la dosis (Figura 24D).

Reconstitución de la actividad de deposición de C4 en suero de ratón (-/-) homocigoto

Realizamos un experimento de reconstitución de la deposición de C4 en pocillos recubiertos con manano usando recombinantes. Cuando se añadió rsMAP al suero deficiente, la cantidad de C4 depositada realmente se redujo hasta los niveles iniciales en un modo dependiente de la dosis (Figura 25A). Cuando se añadió rMASP-2 al suero, la cantidad de C4 se restauró por hasta 46% de aquella del suero de tipo salvaje en un modo dependiente de la dosis y alcanzó una meseta (Figura 25B). Luego, investigamos el efecto de la sMAP sobre la deposición de C4. Cuando se añadieron una cantidad constante de rMASP-2 y varias cantidades de rsMAP al suero deficiente, la cantidad de C4 depositada se redujo con la adición de rsMAP en un modo dependiente de la dosis (Figura 26A) y la adición de rsMAP al suero de tipo salvaje también disminuyó la cantidad de C4 depositada (Figura 26B), sugiriendo que la sMAP cumple una función reguladora en la activación de la vía de lectinas.
 10
 15

Análisis

Hemos generado ratones *sMAP*^{-/-} a través de la ruptura dirigida del exón específico de sMAP. El nivel de expresión de MASP-2 también disminuyó extremadamente en ambos niveles de ARNm y proteína en estos ratones (Figuras 21 y 22). Un análisis Northern con una sonda MASP-2 demostró solamente bandas extra en poly(A)⁺ ARN de ratones *sMAP*^{-/-}, sugiriendo que el empalme normal del gen *MASP-2* se alteró por el direccionamiento del gen *sMAP* y por lo tanto, el nivel de expresión de MASP-2 se redujo notablemente. En consecuencia, la escisión de C4 por el complejo MBL-MASP en el suero deficiente se redujo en aproximadamente 80% comparado con aquel del suero normal (Figura 23A). En los experimentos de reconstitución, la actividad de escisión de C4 se restauró por adición de rMASP-2 pero no de rsMAP (Figura 25). La reducción en la deposición de C4 observada en suero deficiente debe ser causada por la deficiencia de MASP-2 en el complejo MBL-MASP (Figura 22B). Por lo tanto, está claro que la MASP-2 es esencial para la activación de C4 por el complejo MBL-MASP. No obstante, la adición de rMASP-2 no restauró completamente la actividad de escisión y la deposición de C4 alcanzó una meseta. Como se indicó anteriormente (Cseh et al, *J Immunol* 169: 5735-5743 (2002); Iwaki y Fujita, *J Endotoxin Res* 11: 47-50 (2005), la mayoría de la rMASP-2 se convirtió a la forma activa por autoactivación durante los procedimientos de purificación y alguna perdió su actividad de proteasa. Dado que el estado activo o inactivo de MASP-2 no tiene una influencia significativa en su asociación con MBL (Zundel et al, *J Immunol* 172: 4342-4350 (2004), es posible que la rMASP-2 que ha perdido su actividad de proteasa se una a MBL y prevenga competitivamente la asociación de la forma activa, resultando así en una restauración incompleta de la deposición de C4. La actividad de escisión de C3 de la vía de lectinas también se atenuó en el suero deficiente (Figura 23B). La reducción de la cantidad de C3 depositada se debe probablemente al muy bajo nivel de actividad de la convertasa C3, que consiste en fragmentos de C4b y C2a generados por MASP-2.
 20
 25
 30
 35

MASP y sMAP se asociaron cada uno como homodímeros y formaron complejos con MBL o L-ficolina a través de sus dominios N-terminales de tipo EGF y CUB (Chen y Wallis, *J Biol Chem* 276: 25894-25902 (2001); Cseh et al, *J Immunol* 169: 5735-5743 (2002); Thielens et al, *J Immunol* 166: 5068-5077 (2001); Zundel et al, *J Immunol* 172: 4342-4350 (2004)). Las estructuras cristalinas de sMAP y el segmento CUB1-EGF-CUB2 de MASP-2 revelan su estructura homodimérica (Feinberg et al, *EMBO J* 22: 2348-2359 (2002); Gregory et al, *J Biol Chem* 278: 32157-32164 (2003)). El dominio de tipo colágeno de MBL está implicado en la asociación con MASP (Wallis y Cheng, *J Immunol* 163: 4953-4959 (1999); Wallis y Drickamer, *J Biol Chem* 279: 14065-14073 (1999) y algunas mutaciones introducidas en el dominio han reducido la unión de MBL a los segmentos CUB 1-EGF-CUB2 de MASP-1 y MASP-2 (Wallis y Dodd, *J Biol Chem* 275: 30962-30969 (2000)). Los sitios de unión para MASP-2 y para MASP-1/3 se superponen pero no son idénticos (Wallis et al, *J Biol Chem* 279: 14065-13073 (2004)). Si bien el sitio de unión a sMAP de MBL aún no ha sido identificado, los sitios de unión para sMAP y MASP-2 sean probablemente idénticos, ya que la región CUB1-EGF es la misma en sMAP y MASP-2. Por lo tanto, es razonable que sMAP y MASP-2 compitan entre sí para unirse a MBL en la reconstitución del complejo MBL-MASP-sMAP (Figura 24). La afinidad de sMAP para MBL es inferior a aquella de MASP-2 (Cseh et al, *J Immunol* 169: 5735-5743 (2002); Thielens et al, *J Immunol* 166: 5068-5077 (2001)). La concentración de sMAP en suero de ratón no ha sido determinada. Como se muestra en la Figura 22A, no obstante, la cantidad de sMAP en el suero de tipo salvaje es mucho mayor que aquella de MASP-2. Por consiguiente, la sMAP es capaz de ocupar el sitio de unión a MASP-2/sMAP y prevenir que la MASP-2 se una a MBL y en consecuencia se reduce la actividad de escisión de C4 del complejo MBL-MASP. El mecanismo regulador de sMAP en la vía de lectinas todavía debe ser investigado. Aún se desconoce si la sMAP cumple su función reguladora antes o después de la activación del complemento. La sMAP puede prevenir la activación involuntaria del complejo MBL-MASP antes de la infección microbiana o suprimir la activación excesiva de la vía de lectinas una vez activada. Existe otro regulador potencial en la vía de lectinas. La MASP-3 es también un competidor de MASP-2 en la unión a MBL y reduce la actividad de escisión de C4 y C2 de MASP-2 (Dahl et al, *Immunity* 15: 127-135 (2001)). Aunque la interacción entre sMAP y MASP-3 no ha sido investigada, es posible que sean capaces de reducir la activación de la vía de lectinas en forma conjunta.
 40
 45
 50
 55
 60

En este informe, hemos demostrado que sMAP y MASP-2 compiten para unirse a MBL, y sMAP tiene la capacidad de reducir la vía de lectinas, que es activada por el complejo MBL-MASP. Es razonable que la sMAP también regule otra ruta de la vía de lectinas activada por el complejo ficolina-MASP. MASP-2 y sMAP también compiten por unirse a ficolina A de ratón y reducen la actividad de escisión de C4 del complejo ficolina A-MASP (Y Endo et al, en preparación). Se describió recientemente un estudio de ratones nulos de MBL (Shi et al, *J Exp Med* 199: 1379-1390 (2004)). Los ratones nulos de MBL no poseen actividad de escisión de C4 en la vía de lectinas de MBL y son susceptibles a infecciones por *Staphylococcus aureus*. En el presente estudio, los ratones sMAP^{-/-}, que también son deficientes de MASP-2, exhibieron reducciones en la actividad de escisión de C3 además de la actividad de escisión de C4 en la vía de lectinas. Debido a su actividad de opsonización obstaculizada, los ratones deficientes de sMAP pueden ser susceptibles a infecciones bacterianas. Otras investigaciones de los ratones deficientes de sMAP aclararán la función de la vía de lectinas en la protección contra enfermedades infecciosas.

Otro hallazgo importante es que la adición de rsMAP a suero normal resulta en una reducción en la activación de C4 (Figura 26B). También se ha demostrado que la vía de lectinas regula la inflamación y el daño al tejido en varios órganos (de Vries et al, *Am J Pathol* 165: 1677-1688 (2004); Fiane et al, *Circulation* 108: 849-856 (2003); Jordan et al, *Circulation* 104: 1413-1418 (2001); Walsh et al, *J Immunol* 175: 541-546 (2005)). En pacientes deficientes de MBL que se someten a tratamiento por aneurisma aórtico abdominal torácico, el complemento no se activó y los niveles de marcadores proinflamatorios se redujeron después de la cirugía (Fiane et al, *Circulation* 108: 849-856 (2003)). Las evidencias acumuladas han demostrado la función patofisiológica potencial de la MBL durante la isquemia y la reperusión en una diversidad de lechos vasculares. Por ende, el bloqueo específico de MBL o la inhibición de la vía del complemento de lectinas puede representar una estrategia terapéuticamente relevante para la prevención de daño asociado con isquemia/reperusión. Por lo tanto, es posible que la sMAP sea uno de los candidatos para dicho inhibidor, ya que actúa como atenuador de la activación de la vía de lectinas.

Ejemplo 31

Este Ejemplo demuestra que la MASP-2 es responsable de la activación de la derivación C4 de C3.

Antecedentes/Fundamentos: Más recientemente, se ha demostrado que inhibir la vía alternativa protege el riñón de insuficiencia isquémica aguda (Thurman et al., *J Immunol* 170: 1517-1523 (2003)). Los datos descritos en este documento implican que la vía de lectinas ordena la activación de la vía alternativa, que a su vez amplía la activación del complemento en forma sinérgica. Llegamos a la conclusión de que la inhibición transitoria de la vía de lectinas puede además afectar la activación de la vía alternativa y por lo tanto mejorar el resultado a largo plazo en el trasplante de órganos como limitante de daño e inflamación del injerto mediados por el complemento, y puede moderar la inducción indeseada de una respuesta inmune adaptativa contra el injerto y reducir el riesgo de rechazo de injerto secundario a través del sistema inmune adaptativo. Esto es avalado por datos clínicos recientes que demuestran que una vía de lectinas parcialmente obstaculizada, resultante de deficiencias de MBL heredadas (presentes en aproximadamente 30% de la población humana), está asociada con un aumento de la supervivencia del aloinjerto renal en seres humanos (Berger, *Am J Transplant* 5: 1361-1366 (2005)).

La implicación de los componentes del complemento C3 y C4 en lesión de isquemia-reperusión (I/R) se estableció bien en modelos de isquemia intestinal y muscular pasajera con el uso de cepas de ratón dirigidas a genes (Weiser et al., *J Exp Med* 183: 2342-2348 (1996); Williams et al. *J Appl Physiol* 86: 938-42, (1999)). Está bien establecido que C3 tiene una función prominente en la lesión I/R renal y el rechazo de injerto secundario (Zhou et al., *J Clin Invest* 105: 1363-1371 (2000); Pratt et al., *Nat Med* 8: 582-587 (2002); Farrar, et al., *Am J Pathol* 164: 133-141 (2004)). Por ende, fue sorprendente que no se haya observado un fenotipo para deficiencia de C4 en los modelos publicados de rechazo de aloinjerto renal de ratón (Lin, 2005 *In Press*). Un análisis subsiguiente de suero y plasma de estos ratones deficientes de C4, no obstante, indicó que estos ratones retienen una actividad funcional residual que muestra la escisión dependiente de LP de C3 y además se reduce la activación del complemento (véase la FIGURA 27C).

La existencia de una derivación de C4 (y derivación de C2) funcional es un fenómeno previamente descrito (pero no totalmente caracterizado) por varios investigadores (Miller et al., *Proc Natl Acad Sci* 72: 418-22 (1975); Knutzen Steuer et al., *J Immunol* 143(7): 2256-61 (1989); Wagner et al., *J Immunol* 163: 3549-3558 (1999) y se refiere al recambio de C3 independiente de la vía alternativa en sueros deficientes de C4 (y C2).

Métodos: Efectos de la vía de lectinas y la vía clásica en la deposición de C3. El plasma de ratones (con EGTA/ Mg²⁺ como anticoagulante) se diluyó y re-calcificó en barbital 4,0 mM, NaCl 145 mM, CaCl₂ 2,0 mM, MgCl₂ 1,0 mM pH 7,4, luego se añadió a placas de microtitulación recubiertas con manano (como se muestra en las FIGURAS 27A y 27C) o cimosano (como se muestra en la FIGURA 27B), y se incubó durante 90 min a 37 °C. Las placas se lavaron 3 veces con Tris-Cl 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 5,0 mM, 0,05% Tween 20, pH 7,4 luego se midió la deposición de C3b usando un anticuerpo anti-ratón C3c.

Resultados: Los resultados que se muestran en la FIGURA 27A-C son representativos de 3 experimentos independientes. Cuando se usan los mismos sueros en pocillos recubiertos con complejos de inmunoglobulina en lugar de manano o cimosano, se observan la deposición de C3b y la escisión del Factor B en sueros de ratones (+/+) WT y sueros mezclados de MASP-2(-/-), pero no en sueros despojados de C1q (no se muestran los datos). Esto

indica que la activación de la vía alternativa se puede restaurar en sueros de MASP-2^{-/-} cuando el C3b inicial es provisto mediante la actividad de CP. La FIGURA 27C representa el hallazgo sorprendente de que C3 puede activarse eficientemente en un modo dependiente de la vía de lectinas en plasma de (-/-) deficiente de C4. Esta "derivación de C4" es abolida por la inhibición de la activación de la vía de lectinas a través de la preincubación de plasma con manano o manosa soluble.

5

Se puede observar que la deposición de C3b en manano y cimosano está gravemente comprometida en ratones (-/-) deficientes de MASP-2, incluso bajo condiciones experimentales que de acuerdo a muchos documentos previamente publicados sobre la activación de la vía alternativa deben ser permisivas para las tres vías. Como se expone en la FIGURA 27A-C, el plasma de ratones (-/-) deficientes de MASP-2 no activa C4 mediante la vía de lectinas y no escinde C3, ni mediante la vía de lectinas ni mediante la vía alternativa. Por lo tanto, concluimos que se requiere MASP-2 en esta derivación de C4. Un mayor progreso en la identificación de componentes que probablemente están implicados en la derivación de C4 dependiente de la vía de lectinas fue recientemente descrito por el Prof. Teizo Fujita. El plasma de ratones deficientes de C4 cruzados con cepa de ratón deficiente de MASP-1/3, según Fujita, pierde la capacidad residual del plasma deficiente de C4 de escindir C3 mediante la vía de lectinas. Esto se restauró añadiendo MASP-1 recombinante a la combinación de plasma deficiente de MASP-1/3 y C4 (Takahashi, *Mol Immunol* 43: 153 (2006), sugiriendo que la MASP-1 está implicada en la formación de complejos derivados de la vía de lectinas que escinden C3 en ausencia de C4 (MASP-1 recombinante no escinde C3, pero escinde C2; Rossi et al., *J Biol Chem* 276 40880-7 (2001); Chen et al., *J Biol Chem* 279:26058-65 (2004). Observamos que se requiere MASP-2 para que se forme esta derivación.

10

15

Si bien se necesitan más parámetros funcionales y cuantitativos, así como también histología para consolidar este estudio piloto, sus resultados preliminares avalan fuertemente la hipótesis de que la activación del complemento a través de la vía de lectinas contribuye en gran medida a la patofisiología de la lesión de I/R renal, dado que los ratones MASP-2^{-/-} exhiben una recuperación de las funciones renales mucho más rápida.

20

Lista secuencias

- 5 <110> Schwaeble, H.W.
Stover, C.M.
Tedford, C. E.
Parent, J.B.
Fujita, T.
- 10 <120> Métodos para tratar afecciones asociadas con la activación del complemento dependiente de MASP-2
<130> OMER-1-29200
- 15 <150> US 11/645,359
<151> 22-12-2006
- <150> US 60/788,876
<151> 03-04-2006
- 20 <150> US 60/578,847
<151> 10-06-2004
- <150> US 11/150,883
<151> 09-06-2005
- 25 <160> 65
<170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
<211> 725
30 <212> DNA
<213> Homo sapiens
- <220>
<221> CDS
35 <222> (27)..(584)
- <400> 1
ggccaggcca gctggacggg cacacc atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt 53
Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu
1 5
- ctg tgt ggc tcg gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct 101
Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro
10 15 20 25
- gtg ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat 149
Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn
30 35 40
- gac cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg 197
Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu
45 50 55
- cgc ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag 245
Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu
60 65 70
- tac gac ttc gtc aag ctg agc tcg ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg 293
Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu
75 80 85

ES 2 589 315 T3

tgc ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act 341
 Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr
 90 95 100 105

ttc tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac 389
 Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr
 110 115 120

tcc aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag 437
 Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu
 125 130 135

gac att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac 485
 Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp
 140 145 150

cac cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca 533
 His His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala
 155 160 165

ggc tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gag cag agc ctc 581
 Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
 170 175 180 185

tag cctcccctgg agctccggcc tgcccagcag gtcagaagcc agagccagcc 634

tgctggcctc agctccgggt tgggctgaga tggctgtgcc ccaactccca ttcaccacc 694

atggacccaa taataaacct ggccccaccc c 725

<210> 2
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2
 Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

10

ES 2 589 315 T3

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

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

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

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

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

Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
 180 185

<210> 3
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3
 Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala
 1 5 10 15

Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp
 20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His
 35 40 45

Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
 50 55 60

Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr
 65 70 75 80

Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser
 85 90 95

Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
 100 105 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln
 115 120 125

Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His
 130 135 140

Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg
 145 150 155 160

Asn Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
 165 170

<210> 4
 <211> 2460
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

15

ES 2 589 315 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (22)..(2082)

5

<400> 4
 ggccagctgg acgggcacac c atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt ctg 51
 Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu 10
 1 5
 tgt ggc tcg gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct gtg 99
 Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val 25
 15 20
 ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat gac 147
 Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp 40
 30 35
 cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg cgc 195
 Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg 55
 45 50
 ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag tac 243
 Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr 65
 60 70
 gac ttc gtc aag ctg agc tcg ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg tgc 291
 Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys 90
 75 80
 ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act ttc 339
 Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe 105
 95 100
 tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac tcc 387
 Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser 120
 110 115
 aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag gac 435
 Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp 135
 125 130
 att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac cac 483
 Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His 150
 140 145

ES 2 589 315 T3

cac His 155	tgc Cys	cac His	aac Asn	cac His	ctg Leu 160	ggc Gly	ggt Gly	ttc Phe	tac Tyr	tgc Cys 165	tcc Ser	tgc Cys	cgc Arg	gca Ala	ggc Gly 170	531
tac Tyr	gtc Val	ctg Leu	cac His	cgt Arg 175	aac Asn	aag Lys	cgc Arg	acc Thr	tgc Cys 180	tca Ser	gcc Ala	ctg Leu	tgc Cys	tcc Ser 185	ggc Gly	579
cag Gln	gtc Val	ttc Phe	acc Thr 190	cag Gln	agg Arg	tct Ser	ggg Gly	gag Glu 195	ctc Leu	agc Ser	agc Ser	cct Pro	gaa Glu 200	tac Tyr	cca Pro	627
cgg Arg	ccg Pro	tat Tyr 205	ccc Pro	aaa Lys	ctc Leu	tcc Ser	agt Ser 210	tgc Cys	act Thr	tac Tyr	agc Ser	atc Ile 215	agc Ser	ctg Leu	gag Glu	675
gag Glu 220	ggg Gly	ttc Phe	agt Ser	gtc Val	att Ile	ctg Leu 225	gac Asp	ttt Phe	gtg Val	gag Glu 230	tcc Phe	ttc Phe	gat Asp	gtg Val	gag Glu	723
aca Thr 235	cac His	cct Pro	gaa Glu	acc Thr	ctg Leu 240	tgt Cys	ccc Pro	tac Tyr	gac Asp	ttt Phe 245	ctc Leu	aag Lys	att Ile	caa Gln	aca Thr 250	771
gac Asp	aga Arg	gaa Glu	gaa Glu	cat His 255	ggc Gly	cca Pro	ttc Phe	tgt Cys	ggg Gly 260	aag Lys	aca Thr	ttg Leu	ccc Pro	cac His 265	agg Arg	819
att Ile	gaa Glu	aca Thr	aaa Lys 270	agc Ser	aac Asn	acg Thr	gtg Val	acc Thr 275	atc Ile	acc Thr	ttt Phe	gtc Val	aca Thr 280	gat Asp	gaa Glu	867
tca Ser	gga Gly	gac Asp 285	cac His	aca Thr	ggc Gly	tgg Trp	aag Lys 290	atc Ile	cac His	tac Tyr	acg Thr	agc Ser 295	aca Thr	gcg Ala	cag Gln	915
cct Pro	tgc Cys 300	cct Pro	tat Tyr	ccg Pro	atg Met	ggc Ala 305	cca Pro	cct Pro	aat Asn	ggc Gly 310	cac His	gtt Val	tca Ser	cct Pro	gtg Val	963
caa Gln 315	gcc Ala	aaa Lys	tac Tyr	atc Ile	ctg Leu 320	aaa Lys	gac Asp	agc Ser	ttc Phe	tcc Ser 325	atc Ile	ttt Phe	tgc Cys	gag Glu 330	act Thr 330	1011
ggc Gly	tat Tyr	gag Glu	ctt Leu	ctg Leu 335	caa Gln	ggt Gly	cac His	ttg Leu	ccc Pro 340	ctg Leu	aaa Lys	tcc Ser	ttt Phe	act Thr 345	gca Ala	1059
gtt Val	tgt Cys	cag Gln	aaa Lys 350	gat Asp	gga Gly	tct Ser	tgg Trp	gac Asp 355	cgg Arg	cca Pro	atg Met	ccc Pro	gcg Ala 360	tgc Cys	agc Ser	1107
att Ile	gtt Val	gac Asp 365	tgt Cys	ggc Gly	cct Pro	cct Pro	gat Asp 370	gat Asp	cta Leu	ccc Pro	agt Ser	ggc Gly 375	cga Arg	gtg Val	gag Glu	1155
tac Tyr	atc Ile 380	aca Thr	ggt Gly	cct Pro	gga Gly	gtg Val 385	acc Thr	acc Thr	tac Tyr	aaa Lys	gct Ala 390	gtg Val	att Ile	cag Gln	tac Tyr	1203
agc Ser 395	tgt Cys	gaa Glu	gag Glu	acc Thr	ttc Phe 400	tac Tyr	aca Thr	atg Met	aaa Lys	gtg Val 405	aat Asn	gat Asp	ggg Gly	aaa Lys	tat Tyr 410	1251

ES 2 589 315 T3

gtg Val	tgt Cys	gag Glu	gct Ala	gat Asp 415	gga Gly	ttc Phe	tgg Trp	acg Thr	agc Ser 420	tcc Ser	aaa Lys	gga Gly	gaa Glu	aaa Lys 425	tca Ser	1299
ctc Leu	cca Pro	gtc Val	tgt Cys 430	gag Glu	cct Pro	gtt Val	tgt Cys	gga Gly 435	cta Leu	tca Ser	gcc Ala	cgc Arg	aca Thr 440	aca Thr	gga Gly	1347
ggg Gly	cgt Arg	ata Ile 445	tat Tyr	gga Gly	ggg Gly	caa Gln	aag Lys 450	gca Ala	aaa Lys	cct Pro	ggt Gly	gat Asp 455	ttt Phe	cct Pro	tgg Trp	1395
caa Gln	gtc Val 460	ctg Leu	ata Ile	tta Leu	ggt Gly 465	gga Thr	acc Thr	aca Thr	gca Ala	gca Ala	ggt Gly 470	gca Ala	ctt Leu	tta Leu	tat Tyr	1443
gac Asp 475	aac Asn	tgg Trp	gtc Val	cta Leu	aca Thr 480	gct Ala	gct Ala	cat His	gcc Ala	gtc Val 485	tat Tyr	gag Glu	caa Gln	aaa Lys	cat His 490	1491
gat Asp	gca Ala	tcc Ser	gcc Ala	ctg Leu 495	gac Asp	att Ile	cga Arg	atg Met	ggc Gly 500	acc Thr	ctg Leu	aaa Lys	aga Arg	cta Leu 505	tca Ser	1539
cct Pro	cat His	tat Tyr	aca Thr 510	caa Gln	gcc Ala	tgg Trp	tct Ser	gaa Glu 515	gct Ala	gtt Val	ttt Phe	ata Ile 520	cat His	gaa Glu	ggt Gly	1587
tat Tyr	act Thr	cat His 525	gat Asp	gct Ala	ggc Gly	ttt Phe	gac Asp 530	aat Asn	gac Asp	ata Ile	gca Ala	ctg Leu 535	att Ile	aaa Lys	ttg Leu	1635
aat Asn	aac Asn 540	aaa Lys	gtt Val	gta Val	atc Ile	aat Asn 545	agc Ser	aac Asn	atc Ile	acg Thr	cct Pro 550	att Ile	tgt Cys	ctg Leu	cca Pro	1683
aga Arg 555	aaa Lys	gaa Glu	gct Ala	gaa Glu	tcc Ser 560	ttt Phe	atg Met	agg Arg	aca Thr	gat Asp 565	gac Asp	att Ile	gga Gly	act Thr	gca Ala 570	1731
tct Ser	gga Gly	tgg Trp	gga Gly	tta Leu 575	acc Thr	caa Gln	agg Arg	ggt Gly	ttt Phe 580	ctt Leu	gct Ala	aga Arg	aat Asn	cta Leu 585	atg Met	1779
tat Tyr	gtc Val	gac Asp	ata Ile 590	ccg Pro	att Ile	gtt Val	gac Asp	cat His 595	caa Gln	aaa Lys	tgt Cys	act Thr	gct Ala 600	gca Ala	tat Tyr	1827
gaa Glu	aag Lys	cca Pro 605	ccc Pro	tat Tyr	cca Pro	agg Arg	gga Gly 610	agt Ser	gta Val	act Thr	gct Ala	aac Asn 615	atg Met	ctt Leu	tgt Cys	1875
gct Ala	ggc Gly 620	tta Leu	gaa Glu	agt Ser	ggg Gly 625	ggc Gly	aag Lys	gac Asp	agc Ser	tgc Cys	aga Arg 630	ggt Gly	gac Asp	agc Ser	gga Gly	1923
ggg Gly 635	gca Ala	ctg Leu	gtg Val	ttt Phe	cta Leu 640	gat Asp	agt Ser	gaa Glu	aca Thr	gag Glu 645	agg Arg	tgg Trp	ttt Phe	gtg Val	gga Gly 650	1971
gga Gly	ata Ile	gtg Val	tcc Ser	tgg Trp	ggt Gly	tcc Ser	atg Met	aat Asn	tgt Cys	ggg Gly	gaa Glu	gca Ala	ggt Gly	cag Gln	tat Tyr	2019

ES 2 589 315 T3

```

                655                660                665
gga gtc tac aca aaa gtt att aac tat att ccc tgg atc gag aac ata 2067
Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile
                670                675                680
att agt gat ttt taa cttgctgtc tgcagtcaag gattcttcat ttttagaaat 2122
Ile Ser Asp Phe
                685
gcctgtgaag accttggcag cgacgtggct cgagaagcat tcatcattac tgtggacatg 2182
gcagttgttg ctccacccaa aaaaacagac tccaggtgag gctgctgtca tttctccact 2242
tgccagttta attccagcct taccattga ctcaagggga cataaaccac gagagtgaca 2302
gtcatctttg cccaccagt gtaatgtcac tgctcaaatt acatttcatt accttaaaaa 2362
gccagtctct tttcactg gctgttggca tttctgtaaa ctgcctgtcc atgctctttg 2422
tttttaaact tgttcttatt gaaaaaaaa aaaaaaaaa 2460

```

<210> 5
 <211> 686
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

```

<400> 5
Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
 1                5                10                15
Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
 20                25                30
Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
 35                40                45
Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
 50                55                60
Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
 65                70                75                80
Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
 85                90                95
Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
100                105                110
Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
115                120                125
Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val

```

10

ES 2 589 315 T3

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

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

Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Glu Pro
 420 425 430

Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly Gly
 435 440 445

Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Ile Leu Gly
 450 455 460

Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn Trp Val Leu Thr
 465 470 475 480

Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala Ser Ala Leu Asp
 485 490 495

Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala
 500 505 510

Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala Gly
 515 520 525

Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val Ile
 530 535 540

Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu Ser
 545 550 555 560

Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu Thr
 565 570 575

Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro Ile
 580 585 590

Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr Pro
 595 600 605

Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly
 610 615 620

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu
 625 630 635 640

Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly
 645 650 655

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

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

5 <210> 6
 <211> 671
 <212> PRT

ES 2 589 315 T3

<213> Homo sapiens

<400> 6

Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala
 1 5 10 15

Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp
 20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His
 35 40 45

Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
 50 55 60

Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr
 65 70 75 80

Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser
 85 90 95

Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
 100 105 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln
 115 120 125

Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His
 130 135 140

Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg
 145 150 155 160

Asn Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln
 165 170 175

5

ES 2 589 315 T3

Arg Ser Gly Glu₁₈₀ Leu Ser Ser Pro Glu₁₈₅ Tyr Pro Arg Pro Tyr₁₉₀ Pro Lys
 Leu Ser Ser₁₉₅ Cys Thr Tyr Ser Ile₂₀₀ Ser Leu Glu Glu Gly₂₀₅ Phe Ser Val
 Ile Leu₂₁₀ Asp Phe Val Glu Ser₂₁₅ Phe Asp Val Glu Thr₂₂₀ His Pro Glu Thr
 Leu Cys Pro Tyr Asp Phe₂₃₀ Leu Lys Ile Gln Thr₂₃₅ Asp Arg Glu Glu His₂₄₀
 Gly Pro Phe Cys Gly₂₄₅ Lys Thr Leu Pro His₂₅₀ Arg Ile Glu Thr Lys₂₅₅ Ser
 Asn Thr Val Thr₂₆₀ Ile Thr Phe Val Thr₂₆₅ Asp Glu Ser Gly Asp₂₇₀ His Thr
 Gly Trp Lys₂₇₅ Ile His Tyr Thr Ser₂₈₀ Thr Ala Gln Pro Cys₂₈₅ Pro Tyr Pro
 Met Ala₂₉₀ Pro Pro Asn Gly His₂₉₅ Val Ser Pro Val Gln₃₀₀ Ala Lys Tyr Ile
 Leu Lys Asp Ser Phe Ser₃₁₀ Ile Phe Cys Glu Thr₃₁₅ Gly Tyr Glu Leu Leu₃₂₀
 Gln Gly His Leu Pro₃₂₅ Leu Lys Ser Phe Thr₃₃₀ Ala Val Cys Gln Lys₃₃₅ Asp
 Gly Ser Trp Asp₃₄₀ Arg Pro Met Pro Ala₃₄₅ Cys Ser Ile Val Asp₃₅₀ Cys Gly
 Pro Pro Asp₃₅₅ Asp Leu Pro Ser Gly₃₆₀ Arg Val Glu Tyr Ile₃₆₅ Thr Gly Pro
 Gly Val₃₇₀ Thr Thr Tyr Lys Ala₃₇₅ Val Ile Gln Tyr Ser₃₈₀ Cys Glu Glu Thr
 Phe Tyr Thr Met Lys Val₃₉₀ Asn Asp Gly Lys Tyr₃₉₅ Val Cys Glu Ala Asp₄₀₀
 Gly Phe Trp Thr Ser₄₀₅ Ser Lys Gly Glu Lys₄₁₀ Ser Leu Pro Val Cys₄₁₅ Glu
 Pro Val Cys Gly₄₂₀ Leu Ser Ala Arg Thr₄₂₅ Thr Gly Gly Arg Ile₄₃₀ Tyr Gly

ES 2 589 315 T3

Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Ile Leu
 435 440 445

Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn Trp Val Leu
 450 455 460

Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala Ser Ala Leu
 465 470 475 480

Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln
 485 490 495

Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala
 500 505 510

Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val
 515 520 525

Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu
 530 535 540

Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu
 545 550 555 560

Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro
 565 570 575

Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr
 580 585 590

Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser
 595 600 605

Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe
 610 615 620

Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp
 625 630 635 640

Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys
 645 650 655

Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe
 660 665 670

<210> 7
 <211> 4900
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5

<400> 7

ES 2 589 315 T3

cctgtcctgc ctgcctggaa ctctgagcag gctggagtca tggagtcgat tcccagaatc 60
 ccagagtcag ggaggctggg ggcaggggca ggtcactgga caaacagatc aaaggtgaga 120
 ccagcgtagg actgcagacc aggccaggcc agctggacgg gcacaccatg aggtaggtgg 180
 gcgccacagc ctccctgcag ggtgtggggg gggagcacag gcctgggcct caccgcccct 240
 gccctgcccc taggctgctg accctcctgg gccttctgtg tggctcggtg gccaccccct 300
 taggcccga a gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc atccccggc tttccagggg 360
 agtatgcaa tgaccaggag cggcgctgga ccctgactgc accccccggc taccgctgc 420
 gcctctactt caccacttc gacctggagc tctcccacct ctgagtagtac gacttcgtca 480
 aggtgccgct agacgggagg gctggggtt ctgagggtcg ggggggtccc aaggagtagc 540
 cagggttcag ggacacctgg gagcaggggc caggcttggc caggagggag atcaggcctg 600
 ggtcttgctt tcactccctg tgacacctga cccacagct gagctcgggg gccaaaggctg 660
 tggccacgct gtgcgggcag gagagcacag acacggagcg ggcccctggc aaggacactt 720
 tctactcgtt gggctccagc ctggacatta cttccgctc cgactactcc aacgagaagc 780
 cgttcacggg gttcgaggcc ttctatgcag ccgagggtga gccaaagagg gtcctgcaac 840
 atctcagtct gcgcagctgg ctgtgggggt aactctgtct taggccaggc agccctgcct 900
 tcagtttccc cacctttccc agggcagggg agaggcctct ggcctgacat catccacaat 960
 gcaaagacca aaacagccgt gacctccatt cacatgggct gagtgccaac tctgagccag 1020
 ggatctgagg acagcatcgc ctcaagtac gcagggactg gccgggagcg gcagctcacg 1080
 cctgtaattc cagcactttg ggaggccgag gctggcttga taatttgagg gtcaggagtt 1140
 caaggccagc cagggcaaca cggtgaaact ctatctccac taaaactaca aaaattagct 1200
 gggcgtgggt gtgcgcacct ggaatcccag ctactaggga ggctgaggca ggagaattgc 1260
 ttgaacctgc gaggtggagg ctgcagtga cagagattgc accactacac tccacctggg 1320
 cgacagacta gactccgtct caaaaaaca aaaacaaaa ccacgcaggg ccgagggccc 1380
 atttacaagc tgacaaagt ggccctgcca gcgggagcgc tgcaggatgt ttgattttca 1440
 gatcccagtc cctgcagaga ccaactgtgt gacctctggc aagtggctca atttctctgc 1500
 tccttagaag ctgctgcaag ggttcagcgc ttagccccg cccctgggt ttgattgact 1560
 cccctcatta gctgggtgac ctcgccgga cactgaaact cccactggtt taacagaggt 1620
 gatgtttgca tctttctccc agcgtgctg ggagcttga gcgaccctag gcctgtaagg 1680
 tgattggccc ggcaccagtc ccgcacccta gacaggacct aggcctcctc tgaggtccac 1740

ES 2 589 315 T3

tctgaggcca tggatctcct gggaggagtc caggctggat cccgcctctt tccctcctga 1800
 cggcctgcct ggccctgcct ctccccaga cattgacgag tgccagggtg ccccgggaga 1860
 ggcgccacc tgcgaccacc actgccacaa ccacctgggc ggtttctact gtcctgccc 1920
 cgcaggctac gtcctgcacc gtaacaagcg cacctgctca ggtgagggag gctgctggg 1980
 ccccaacgca ccctctcctg ggatacccg ggctcctcag ggccattgct gctctgccc 2040
 ggggtgcgga gggcctgggc ctggacactg ggtgcttcta ggccctgctg cctccagctc 2100
 ccctctcag ccctgcttcc cctctcagca gccaggctca tcagtgccac cctgccctag 2160
 cactgagact aattctaaca tcccactgtg tacctggttc cacctgggct ctgggaaccc 2220
 ctcatgtagc cacgggagag tcggggtatc taccctcgtt ccttgactg ggttctctgt 2280
 ccctgcactg ggggacgggc cagtgtctg gggcggtggc agccccacc tgtggcgctg 2340
 acctgctcc cccgactcgg tttctctct cggggtctct ccttgctct ctgatctctc 2400
 ttccagagca gagcctctag cctccccctg agctccggt gccagcagg tcagaagcca 2460
 gagccaggct gctggcctca gctccgggtt gggctgagat gctgtgcccc aactcccatt 2520
 caccaccat ggacccaata ataaacctgg cccaccacca cctgctgccg cgtgtctctg 2580
 ggggtgggagg gtcgggaggc ggtggggcgc gctcctctc gcctaccctc ctcacagcct 2640
 catgaacccc aggtctgtgg gagcctcctc catggggcca cacggtcctt ggccaccac 2700
 cctgttttga agatggggca ctgaggccgg agaggggtaa ggcctcgtc gagtccagg 2760
 ccccagaggc tgagcccaga gtaattctga accaccccca ttcagggtct ggccctggagg 2820
 agcctgacct acagaggaga caccctggga gatattcatt gaggggtaat ctggtcccc 2880
 gcaaatccag gggtgattcc cactgcccc taggcacagc cacgtggaag aaggcaggca 2940
 atgtggggc tcctcactc ctgaggcct cacaactcaa atgccccca ctgcagctgg 3000
 ggggtggggtg gtggtatggg atggggacca agccttctt gaaggataga gccagccca 3060
 acccccgcc cgtggcagc agcatcacgt gttccagcga ggaaggagag caccagactc 3120
 agtcatgatc actgttgct tgaacttcca agaacagccc cagggcaagg gtcaaaacag 3180
 gggaaagggg gtgatgagag atccttctt cggatgttcc tccaggaacc agggggctgg 3240
 ctggtcttgg ctgggttcgg gtaggagacc catgatgaat aaacttggga atcactgggg 3300
 tggctgtaag ggaatttagg ggagctccga aggggccctt aggctcagg agatgctcct 3360
 ctctttccc gaattcccag ggaccagga gagtgtccct tcttctctt cctgtgtgtc 3420
 catccacccc cccccccgc cctggcagag ctgggtggaac tcagtgtctt agcccctacc 3480
 ctggggttgc gactctggct caggacacca ccacgctccc tgggggtgtg agtgagggcc 3540
 tgtgcgctcc atcccagtg ctgcctgtt cagctaaagc ctcaaagcaa gagaaacccc 3600
 ctctctaagc ggcccctcag ccatcgggtg ggtcgtttgg tttctgggta ggccctcagg 3660

ES 2 589 315 T3

gctggccacc tgcagggccc agcccaaccc agggatgcag atgtcccagc cacatccctg 3720
 tcccagtttc ctgctcccca aggcattccac cctgctggtg gtgcgagggc tgatagaggg 3780
 cacgccaagt cactcccctg cccttccctc cttccagccc tgtgctccgg ccaggtcttc 3840
 acccagaggt ctggggagct cagcagccct gaataccac gcccgatcc caaactctcc 3900
 agttgcactt acagcatcag cctggaggag gggttcagtg tcattctgga ctttgtggag 3960
 tccttcgatg tggagacaca ccctgaaacc ctgtgtccct acgactttct caaggtctgg 4020
 ctctggggcc cctcatcttg tcccagatcc tcccccttca gccagctgc accccctact 4080
 tcctgcagca tggccccac cacgttcccg tcaccctcgg tgaccccacc tcttcaggtg 4140
 ctctatggag gtcaaggctg gggcttcgag tacaagtgtg ggaggcagag tggggagggg 4200
 caccccaatc catggcctgg gttggcctca ttggctgtcc ctgaaatgct gaggaggtgg 4260
 gttacttccc tccgccagc ccagaccag gcagctgtc cccagcttc atgagcttct 4320
 ttctcagatt caaacagaca gagaagaaca tggccattc tgtgggaaga cattgcccc 4380
 caggattgaa acaaaaagca acacggtgac catcacctt gtcacagatg aatcaggaga 4440
 ccacacaggc tgaagatcc actacacgag cacagtgagc aagtgggctc agatccttgg 4500
 tgaagcgca gagctgcctc tctctggagt gcaaggagct gtagagtgtg gggctcttct 4560
 gggcaggact aggaaggac accaggttta gtggtgctga ggtctgaggc agcagcttct 4620
 aaggggaagc acccgtgcc tcctcagcag caccagcat cttcaccact cattcttcaa 4680
 ccaccattc accatcact catcttttac ccaccaccc tttgccactc atccttctgt 4740
 cctcatcct tccaaccatt catcaatcac ccaccatcc atcctttgcc acacaacat 4800
 ccaccattc ttctacctac ccatectatc catccatcct tctatcagca tccttctacc 4860
 acccatcctt cgttcggtca tccatcatca tccatccatc 4900

<210> 8
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 8
 Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
 1 5 10 15

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

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

10

ES 2 589 315 T3

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

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

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

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

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

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala
130 135

<210> 9

<211> 181

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

10

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

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

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

Lys Arg Thr Cys Ser
180

<210> 10

ES 2 589 315 T3

<211> 293
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 10
 Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
 1 5 10 15
 Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
 20 25 30
 Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
 35 40 45
 Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
 50 55 60
 Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
 65 70 75 80
 Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
 85 90 95
 Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
 100 105 110
 Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
 115 120 125
 Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val
 130 135 140
 Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu
 145 150 155 160
 Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn
 165 170 175
 Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln Arg
 180 185 190
 Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys Leu
 195 200 205
 Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val Ile
 210 215 220
 Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu
 225 230 235 240
 Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His Gly
 245 250 255
 Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser Asn
 260 265 270
 Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr Gly
 275 280 285
 Trp Lys Ile His Tyr
 290

ES 2 589 315 T3

<210> 11

<211> 41

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys
1 5 10 15

Asp His His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg
20 25 30

Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys
35 40

10 <210> 12

<211> 242

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 12

Ile Tyr Gly Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val
5 10

ES 2 589 315 T3

```

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

```

Asp Phe

<210> 13

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

10

<400> 13

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ala Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu
1 5 10 15

<210> 14

15 <211> 15

<212> PRT

ES 2 589 315 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

5 <400> 14
Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu
1 5 10 15

10 <210> 15
<211> 43
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 15
Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp
1 5 10 15

Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser
20 25 30

Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln
35 40

20 <210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 16
Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn
1 5

30 <210> 17
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 17
Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr
1 5 10 15

40 Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe
20 25

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Péptido sintético

50 <400> 18
Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly
1 5

ES 2 589 315 T3

<210> 19
<211> 25
<212> PRT
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

10 <400> 19
Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys
1 5 10 15
Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val
20 25

<210> 20
<211> 960
15 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
20 <222> (51)..(797)

<400> 20
attaactgag attaaccttc cctgagtttt ctcacaccaa ggtgaggacc atg tcc 56

ES 2 589 315 T3

Met Ser
1

ctg ttt cca tca ctc cct ctc ctt ctc ctg agt atg gtg gca gcg tct 104
Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ser Met Val Ala Ala Ser
5 10 15

tac tca gaa act gtg acc tgt gag gat gcc caa aag acc tgc cct gca 152
Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys Pro Ala
20 25 30

gtg att gcc tgt agc tct cca ggc atc aac ggc ttc cca ggc aaa gat 200
Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly Lys Asp
35 40 45 50

ggg cgt gat ggc acc aag gga gaa aag ggg gaa cca ggc caa ggg ctc 248
Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln Gly Leu
55

aga ggc tta cag ggc ccc cct gga aag ttg ggg cct cca gga aat cca 296
Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly Asn Pro
70 75 80

ggg cct tct ggg tca cca gga cca aag ggc caa aaa gga gac cct gga 344
Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp Pro Gly
85 90 95

aaa agt ccg gat ggt gat agt agc ctg gct gcc tca gaa aga aaa gct 392
Lys Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg Lys Ala
100 105 110

ctg caa aca gaa atg gca cgt atc aaa aag ttg ctc acc ttc tct ctg 440
Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe Ser Leu
115 120 125 130

ggc aaa caa gtt ggg aac aag ttc ttc ctg acc aat ggt gaa ata atg 488
Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu Ile Met
135 140 145

acc ttt gaa aaa gtg aag gcc ttg tgt gtc aag ttc cag gcc tct gtg 536
Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala Ser Val
150 155 160

gcc acc ccc agg aat gct gca gag aat gga gcc att cag aat ctc atc 584
Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn Leu Ile
165 170 175

aag gag gaa gcc ttc ctg ggc atc act gat gag aag aca gaa ggg cag 632
Lys Glu Glu Ala Phe Leu Gly Ile Thr Asp Glu Lys Thr Glu Gly Gln
180 185 190

ttt gtg gat ctg aca gga aat aga ctg acc tac aca aac tgg aac gag 680
Phe Val Asp Leu Thr Gly Asn Arg Leu Thr Tyr Thr Asn Trp Asn Glu
195 200 205 210

ggt gaa ccc aac aat gct ggt tct gat gaa gat tgt gta ttg cta ctg 728
Gly Glu Pro Asn Asn Ala Gly Ser Asp Glu Asp Cys Val Leu Leu Leu
215 220 225

aaa aat ggc cag tgg aat gac gtc ccc tgc tcc acc tcc cat ctg gcc 776
Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro Cys Ser Thr Ser His Leu Ala
230 235 240

gtc tgt gag ttc cct atc tga aggggtcatat cactcaggcc ctcttgtct 827
Val Cys Glu Phe Pro Ile
245

ttttactgca acccacaggc ccacagtatg cttgaaaaga taaattatat caatttcctc 887

atatccagta ttgttccttt tgtgggcaat cactaaaaat gatcactaac agcaccaaca 947

aagcaataat agt 960

- 5 <210> 21
- <211> 248
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

ES 2 589 315 T3

<400> 21

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

5

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia consenso de péptido sintético

15 <220>

<221> CARACTERISTICA MISCELANEA
 <222> (1) .. (1)
 <223> en donde X en la posición 1 representa hidroxiprolina

5 <220>
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA
 <222> (4)..(4)
 <223> en donde X en la posición 4 representa un residuo hidrófobo

10 <400> 22
 Xaa Ḡly Lys Xaa Ḡly Pro
 1 5

<210> 23
 <211> 5

15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

20 <220>
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA
 <222> (1) .. (1)
 <223> en donde X representa hidroxiprolina

25 <400> 23
 Xaa Ḡly Lys Leu Ḡly
 1 5

<210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Péptido sintético

35 <220>
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA
 <222> (9)..(15)
 <223> en donde X en las posiciones 9 y 15 representa hidroxiprolina

40 <400> 24
 Ḡly Leu Arg Ḡly Leu Ḡln Ḡly Pro Xaa Ḡly Lys Leu Ḡly Pro Xaa Ḡly
 1 5 10 15

45 <210> 25
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA

55 <222> (3)..(27)
 <223> en donde X en las posiciones 3, 6, 15, 21, 24, 27 representa hidroxiprolina

<400> 25
 Ḡly Pro Xaa Ḡly Pro Xaa Ḡly Leu Arg Ḡly Leu Ḡln Ḡly Pro Xaa Ḡly
 1 5 10 15

Lys Leu Ḡly Pro Xaa Ḡly Pro Xaa Ḡly Pro Xaa
 20 25

- <210> 26
 <211> 53
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Péptido sintético
- 10 <220>
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 15 <220>
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 20 <220>
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 25 <220>
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA
 <222> (41)..(41)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 30 <220>
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA
 <222> (50)..(50)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 35 <400> 26
 Gly Lys Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly Lys Leu Gly Pro Xaa
 20 25 30
 Gly Asn xaa Gly Pro Ser Gly Ser xaa Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly
 35 40 45
 Asp xaa Gly Lys Ser
 50
- <210> 27
 <211> 33
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Péptido sintético
- 45 <220>
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA
 <222> (3)..(33)
 <223> en donde X en las posiciones 3, 6, 12, 18, 21, 30, 33 representa hidroxiprolina
- 50 <400> 27

ES 2 589 315 T3

Gly Ala xaa Gly Ser Xaa Gly Glu Lys Gly Ala Xaa Gly Pro Gln Gly
 1 5 10 15

Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Lys Met Gly Pro Lys Gly Glu Xaa Gly Asp
 20 25 30

Xaa

5 <210> 28
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

15 <220>
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA
 <222> (3)..(45)
 <223> en donde X en las posiciones 3, 6, 9, 27, 30, 36, 42, 45 representa hidroxiprolina

<400> 28
 Gly Cys xaa Gly Leu Xaa Gly Ala xaa Gly Asp Lys Gly Glu Ala Gly
 1 5 10 15

Thr Asn Gly Lys Arg Gly Glu Arg Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Lys
 20 25 30

Ala Gly Pro Xaa Gly Pro Asn Gly Ala Xaa Gly Glu Xaa
 35 40 45

20 <210> 29
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 29
 Leu Gln Arg Ala Leu Glu Ile Leu Pro Asn Arg Val Thr Ile Lys Ala
 1 5 10 15

Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile
 20

30 <210> 30
 <211> 559
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

35 <400> 30
 atgaggctgc tgaccctcct gggccttctg tgtggctcgg tggccacccc cttgggcccg 60
 aagtggcctg aacctgtgtt cgggcgctg gcatcccccg gctttccagg ggagtatgcc 120
 aatgaccagg agcggcgctg gaccctgact gaccccccg gctaccgcct gcgcctctac 180
 ttcaccact tcgacctgga gctctcccac ctctgcgagt acgacttcgt caagctgagc 240
 tcgggggcca aggtgctggc cacgctgtgc gggcaggaga gcacagacac ggagcgggccc 300

ES 2 589 315 T3

 cctggcaagg acactttcta ctcgctgggc tccagcctgg acattacctt ccgctccgac 360
 tactccaacg agaagccgtt cacggggttc gaggccttct atgcagccga ggacattgac 420
 gagtgccagg tggccccggg agaggcgccc acctgcgacc accactgcca caaccacctg 480
 ggcggtttct actgctcctg ccgcgcaggc tacgtcctgc accgtaacaa gcgcacctgc 540
 tcagccctgt gctccggcc 559

- 5 <210> 31
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
 <223> Oligo sintético
- <400> 31
 cgggcacacc atgaggctgc tgaccctct gggc 34
- 15 <210> 32
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
 <223> Oligo sintético
- <400> 32
 gacattacct tccgctccga ctccaacgag aag 33
- 25 <210> 33
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
 <223> Oligo sintético
- <400> 33
 agcagccctg aataccacg gccgtatccc aaa 33
- 35 <210> 34
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
 <223> Oligo sintético
- <400> 34
 cgggatccat gaggctgctg accctc 26
- 45 <210> 35
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
 <223> Oligo sintético
- 55 <400> 35
 ggaattccta ggctgcata 19
- <210> 36

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Oligo sintético

<400> 36
 ggaattccta cagggcgct 19

10 <210> 37
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligo sintético

<400> 37
 20 ggaattccta gtagtgat 19

<210> 38
 <211> 25
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligo sintético

30 <400> 38
 tgcggccgct gtagtgctg tcttt 25

<210> 39
 <211> 23
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligo sintético

40 <400> 39
 ggaattcact cgttattctc gga 23

<210> 40
 <211> 17
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> Oligo sintético

<400> 40 17
 tccgagaata acgagtg 17

55 <210> 41
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Oligo sintético

<400> 41
 65 cattgaaagc tttgggtag aagttgtc 29

<210> 42

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Oligo sintético
 <400> 42
 cgcggccgca gctgctcaga gtgtaga 27
 10 <210> 43
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Oligo sintético
 <400> 43
 20 cggtaagctt cactggctca gggaaata 28
 <210> 44
 <211> 37
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo sintético
 30 <400> 44
 aagaagcttg ccgccacat ggattggctg tggaaact 37
 <210> 45
 <211> 31
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo sintético
 40 <400> 45
 cgggatcctc aaactttctt gtccaccttg g 31
 <210> 46
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Oligo sintético
 <400> 46
 aagaaagctt gccccacca tgttctcact agctct 36
 55 <210> 47
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Oligo sintético
 <400> 47
 65 cgggatcctt ctccctctaa cactct 26
 <210> 48

ES 2 589 315 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 48
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 10 1 5

<210> 49
 <211> 4960
 <212> DNA
 15 <213> Homo Sapiens

<400> 49
 ccggacgtgg tggcgcacatgc ctgtaatccc agctactcgg gaggctgagg caggagaatt 60
 gctcgaaccc cggaggcaga ggtttggtgg ctcacacctg taatcccagc actttgcgag 120
 gctgaggcag gtgcatcgct ttggctcagg agttcaagac cagcctgggc aacacagggg 180
 gacccccatc tctacaaaaa acaaaaacaa atataaaggg gataaaaaaa aaaaaaagac 240
 aagacatgaa tccatgagga cagagtgtgg aagaggaagc agcagcctca aagttctgga 300
 agctggaaga acagataaac aggtgtgaaa taactgcctg gaaagcaact tctttttttt 360
 tttttttttt tttgaggtgg agtctcactc tgctgtccag gctggagtgc agtgggtgca 420
 tctcgatca ctgcaacctc cgctcccag gctcaagcaa ttctctgccc tcagcctccc 480

ES 2 589 315 T3

gagtagctgg gattataagt gcgcgctgcc acacctggat gatttttgta ttttagtag 540
agatgggatt tcaccatggt ggtcaggctg gtctcaaact cccaacctcg tgatccaccc 600
accttggcct cccaaagtgc tgggattaca ggtataagcc accgagccca gccaaaagcg 660
acttctaagc ctgcaagga atcgggaatt ggtggcacca ggtccttctg acagggttta 720
agaaattagc cagcctgagg ctgggcacgg tggtcacac ctgtaatccc agcactttgg 780
gaggctaagg caggtggatc acctgagggc aggagttcaa gaccagcctg accaacatgg 840
agaaaccca tccctaccaa aaataaaaaa tttagccaggt gtggtggtgc tcgcctgtaa 900
tcccagctac ttgggaggct gaggtgggag gattgcttga acacaggaag tagaggctgc 960
agtgagctat gattgcagca ctgcaactgaa gccggggcaa cagaacaaga tccaaaaaaa 1020
agggaggggt gaggggcaga gccaggattt gttccaggc tgttgttacc taggtccgac 1080
tcctggctcc cagagcagcc tgtcctgcct gcctggaact ctgagcaggc tggagtcatg 1140
gagtcgattc ccagaatccc agagtcaggg aggctggggg caggggcagg tcaactggaca 1200
aacagatcaa aggtgagacc agcgtagggc tgcagaccag gccaggccag ctggacgggc 1260
acaccatgag gtaggtggc gccacagcc tccctgcagg gtgtggggtg ggagcacagg 1320
cctgggccct caccgccct gccctgcca taggctgctg accctcctgg gccttctgtg 1380
tggctcggtg gccaccccct tgggcccga gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc 1440
atccccggc tttccagggg agtatgcaa tgaccaggag cggcgcctgga ccctgactgc 1500
acccccggc taccgcctgc gccttactt caccacttc gacctggagc tctcccact 1560
ctgcgagtac gacttcgca aggtgccgtc aggacgggag ggctgggggt tctcagggtc 1620
ggggggtccc caaggagtag ccagggttca gggacacctg ggagcagggg ccaggcttgg 1680
ccaggaggga gatcaggcct gggctctgcc ttcactcct gtgacacctg accccacagc 1740
tgagctcggg ggccaaggty ctggccacgc tgtgcccga ggagagcaca gacacggagc 1800
gggcccctgg caaggacact ttctactcgc tgggctccag cctggacatt accttccgct 1860
ccgactactc caacgagaag ccgttcacgg ggttcgaggc cttctatgca gccgagggty 1920
agccaagagg ggtcctgcaa catctcagtc tgcgcagctg gctgtggggg taactctgtc 1980
ttaggccagg cagccctgcc ttcagtttc ccaccttcc cagggcaggg gagaggcctc 2040
tggcctgaca tcatccaaa tgcaaagacc aaaacagccg tgacctcat tcacatgggc 2100
tgagtgcaa ctctgagcca gggatctgag gacagcatcg cctcaagtga cgcagggact 2160
ggccgggagc agcagctcac gcctgtaatt ccagcacttt gggaggccga ggctggctga 2220
tcatttgagg tcaggagttc aaggccagcc agggcaacac ggtgaaactc tatctccact 2280
aaaactacaa aaattagctg ggcgtggtgg tgcgcacctg gaatcccagc tactagggag 2340
gctgaggcag gagaattgct tgaacctgcg aggtggaggc tgcagtgaac agagattgca 2400

ES 2 589 315 T3

ccactacact ccagcctggg cgacagagct agactccgtc tcaaaaaaca aaaaacaaaa 2460
 acgacgcagg ggccgagggc cccatttaca gctgacaaag tggggccctg ccagcgggag 2520
 cgctgccagg atgtttgatt tcagatccca gtccctgcag agaccaactg tgtgacctct 2580
 ggcaagtggc tcaatttctc tgctccttag gaagctgctg caagggttca gcgctgtagc 2640
 cccgccccct gggtttgatt gactcccctc attagctggg tgacctcggg ccggacactg 2700
 aaactcccac tggtttaaca gaggtgatgt ttgcatcttt ctcccagcgc tgctgggagc 2760
 ttgcagcgac cctaggcctg taaggtgatt ggccccgcac cagtcccgca ccctagacag 2820
 gacgaggcct cctctgaggt ccactctgag gtcatggatc tcctgggagg agtccaggct 2880
 ggatccccgc tctttccctc ctgacggcct gcctggccct gcctctcccc cagacattga 2940
 cgagtgccag gtggccccgg gagaggcgcc cacctgcgac caccactgcc acaaccacct 3000
 gggcggtttc tactgtcctc gccgcgcagg ctacgtcctg caccgtaaca agcgcacctg 3060
 ctacgccctg tgctccggcc aggtcttcac ccagaggtct ggggagctca gcagccctga 3120
 ataccacagg ccgtatccca aactctccag ttgcacttac agcatcagcc tggaggaggg 3180
 gttcagtgtc attctggact ttgtggagtc cttcgatgtg gagacacacc ctgaaacctt 3240
 gtgtccctac gacttttctc agattcaaac agacagagaa gaacatggcc cattctgtgg 3300
 gaagacattg cccacagga ttgaaacaaa aagcaacacg gtgaccatca cctttgtcac 3360
 agatgaatca ggagaccaca caggctggaa gatccactac acgagcacag cgcacgcttg 3420
 cccttatccg atggcgccac ctaatggcca cgtttcacct gtgcaagcca aatacatcct 3480
 gaaagacagc ttctccatct tttgcgagac tggtatgag cttctgcaag gtcacttgcc 3540
 cctgaaatcc ttactgcag tttgtcagaa agatggatct tgggaccggc caatgcccgc 3600
 gtgcagcatt gttgactgtg gccctcctga tgatctaccc agtggccgag tggagtacat 3660
 cacaggtcct ggagtgacca cctacaaagc tgtgattcag tacagctgtg aagagacctt 3720
 ctacacaatg aaagtgaatg atggtaaata tgtgtgtgag gctgatggat tctggacgag 3780
 ctccaaagga gaaaaatcac tcccagtctg tgagcctggt tgtggactat cagccccgac 3840
 aacaggaggg cgtatatatg gagggcaaaa ggcaaacct ggtgattttc cttggcaagt 3900
 cctgatatta ggtggaacca cagcagcagg tgcactttta tatgacaact gggtcctaac 3960
 agctgctcat gccgtctatg agcaaaaaca tgatgatcc gccctggaca ttcgaatggg 4020
 caccctgaaa agactatcac ctattatac acaagcctgg tctgaagctg tttttataca 4080
 tgaaggttat actcatgatg ctggctttga caatgacata gactgatta aattgaataa 4140
 caaagttgta atcaatagca acatcacgcc tttttgtctg ccaagaaaag aagctgaatc 4200
 ctttatgagg acagatgaca ttggaactgc atctggatgg ggattaaccc aaaggggttt 4260

ES 2 589 315 T3

```
tcttgctaga aatctaattgt atgtcgacat accgattggt gaccatcaaa aatgtactgc 4320
tgcatatgaa aagccaccct atccaagggg aagtgtact gctaacatgc tttgtgctgg 4380
cttagaaagt gggggcaagg acagctgcag aggtgacagc ggagggggcac tgggtgttct 4440
agatagttaa acagagaggt ggtttgtggg aggaatagtg tcctgggggt ccatgaattg 4500
tggggaagca ggtcagtatg gagtctacac aaaagttatt aactatattc cctggatcga 4560
gaacataatt agtgattttt aacttgcgtg tctgcagtca aggattcttc attttagaa 4620
atgcctgtga agaccttggc agcgacgtgg ctgcagaagc attcatcatt actgtggaca 4680
tggcagttgt tgctccacc aaaaaaacag actccaggtg aggctgctgt catttctcca 4740
cttgccagtt taattccagc cttaccatt gactcaagg gacataaacc acgagagtga 4800
cagtcattct tgcaccacca gtgtaatgtc actgctcaa ttacatttca ttaccttaa 4860
aagccagtct cttttcatac tggctgttgg cttttctgta aactgcctgt ccatgctctt 4920
tgtttttaaa cttgttctta ttgaaaaaaa aaaaaaaaaa 4960
```

<210> 50
 <211> 2090
 5 <212> DNA
 <213> CDS de MASP-2 murina

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (33)..(2090)

```
<400> 50
ggcgtggac tgcagagcta tgggtggcaca cc atg agg cta ctc atc ttc ctg 53
Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu
1 5

ggt ctg ctg tgg agt ttg gtg gcc aca ctt ctg ggt tca aag tgg cct 101
Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro
10 15 20

gaa cct gta ttc ggg cgc ctg gtg tcc cct ggc ttc cca gag aag tat 149
Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr
25 30 35

gct gac cat caa gat cga tcc tgg aca ctg act gca ccc cct ggc tac 197
Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr
40 45 50 55

cgc ctg cgc ctc tac ttc acc cac ttt gac ctg gaa ctc tct tac cgc 245
Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser Tyr Arg
60 65 70

tgc gag tat gac ttt gtc aag ttg agc tca ggg acc aag gtg ctg gcc 293
Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala
75 80 85

aca ctg tgt ggg cag gag agt aca gac act gag cag gca cct ggc aat 341
Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn
90 95 100
```

ES 2 589 315 T3

gac Asp	acc Thr 105	ttc Phe	tac Tyr	tca Ser	ctg Leu	ggt Gly 110	ccc Pro	agc Ser	cta Leu	aag Lys	gtc Val 115	acc Thr	ttc Phe	cac His	tcc Ser	389
gac Asp 120	tac Tyr	tcc Ser	aat Asn	gag Glu	aag Lys 125	ccg Pro	ttc Phe	aca Thr	ggg Gly	ttt Phe 130	gag Glu	gcc Ala	ttc Phe	tat Tyr	gca Ala 135	437
gcg Ala	gag Glu	gat Asp	gtg Val	gat Asp 140	gaa Glu	tgc Cys	aga Arg	gtg Val	tct Ser 145	ctg Leu	gga Gly	gac Asp	tca Ser	gtc Val 150	cct Pro	485
tgt Cys	gac Asp	cat His	tat Tyr 155	tgc Cys	cac His	aac Asn	tac Tyr	ttg Leu 160	ggc Gly	ggc Gly	tac Tyr	tat Tyr	tgc Cys 165	tcc Ser	tgc Cys	533
aga Arg	gcg Ala	ggc Gly 170	tac Tyr	att Ile	ctc Leu	cac His	cag Gln 175	aac Asn	aag Lys	cac His	acg Thr	tgc Cys 180	tca Ser	gcc Ala	ctt Leu	581
tgt Cys	tca Ser 185	ggc Gly	cag Gln	gtg Val	ttc Phe	aca Thr 190	gga Gly	aga Arg	tct Ser	ggg Gly	tat Tyr 195	ctc Leu	agt Ser	agc Ser	cct Pro	629
gag Glu 200	tac Tyr	ccg Pro	cag Gln	cca Pro	tac Tyr 205	ccc Pro	aag Lys	ctc Leu	tcc Ser	agc Ser 210	tgc Cys	acc Thr	tac Tyr	agc Ser	atc Ile 215	677
cgc Arg	ctg Leu	gag Glu	gac Asp 220	ggc Gly	ttc Phe	agt Ser	gtc Val	atc Ile	ctg Leu 225	gac Asp	ttc Phe	gtg Val	gag Glu	tcc Ser 230	ttc Phe	725
gat Asp	gtg Val	gag Glu	acg Thr 235	cac His	cct Pro	gaa Glu	gcc Ala	cag Gln 240	tgc Cys	ccc Pro	tat Tyr	gac Asp 245	tcc Ser	ctc Leu	aag Lys	773
att Ile	caa Gln	aca Thr 250	gac Asp	aag Lys	ggg Gly	gaa Glu	cac His 255	ggc Gly	cca Pro	ttt Phe	tgt Cys	ggg Gly 260	aag Lys	acg Thr	ctg Leu	821
cct Pro	ccc Pro 265	agg Arg	att Ile	gaa Glu	act Thr	gac Asp 270	agc Ser	cac His	aag Lys	gtg Val	acc Thr 275	atc Ile	acc Thr	ttt Phe	gcc Ala	869
act Thr 280	gac Asp	gag Glu	tcg Ser	ggg Gly	aac Asn 285	cac His	aca Thr	ggc Gly	tgg Trp	aag Lys 290	ata Ile	cac His	tac Tyr	aca Thr	agc Ser 295	917
aca Thr	gca Ala	cgg Arg	ccc Pro	tgc Cys 300	cct Pro	gat Asp	cca Pro	acg Thr	ggc Ala 305	cca Pro	cct Pro	aat Asn	ggc Gly 310	agc Ser	att Ile	965
tca Ser	cct Pro	gtg Val	caa Gln 315	gcc Ala	acg Thr	tat Tyr	gtc Val	ctg Leu 320	aag Lys	gac Asp	agg Arg	ttt Phe	tct Ser 325	gtc Val	ttc Phe	1013
tgc Cys	aag Lys	aca Thr 330	ggc Gly	ttc Phe	gag Glu	ctt Leu	ctg Leu 335	caa Gln	ggc Gly	tct Ser	gtc Val	ccc Pro 340	ctg Leu	aaa Lys	tca Ser	1061
ttc Phe	act Thr	gct Ala	gtc Val	tgt Cys	cag Gln	aaa Lys	gat Asp	gga Gly	tct Ser	tgg Trp	gac Asp	cgg Arg	ccg Pro	atg Met	cca Pro	1109

ES 2 589 315 T3

Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro Gly Val Arg Val Ser Ala Asn Met
 600 605 610 615
 ctc tgt gct ggc tta gag act ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac 1925
 Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp
 620 625 630
 agt ggg ggg gca tta gtg ttt cta gat aat gag aca cag cga tgg ttt 1973
 Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe
 635 640 645
 gtg gga gga ata gtt tcc tgg ggt tcc att aat tgt ggg gcg gca ggc 2021
 Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly
 650 655 660
 cag tat ggg gtc tac aca aaa gtc atc aac tat att ccc tgg aat gag 2069
 Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu
 665 670 675
 aac ata ata agt aat ttc taa 2090
 Asn Ile Ile Ser Asn Phe
 680 685

5 <210> 51
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> CDS de MASP-2 murina

<400> 51
 Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr
 1 5 10 15
 Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser
 20 25 30
 Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp Thr
 35 40 45
 Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
 50 55 60
 Asp Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
 65 70 75 80
 Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
 85 90 95
 Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro Ser
 100 105 110
 Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
 115 120 125

10

ES 2 589 315 T3

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Val
 130 135 140

Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu
 145 150 155 160

Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn
 165 170 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln
 325 330 335

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

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

Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Gln
 370 375 380

ES 2 589 315 T3

Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe
 385 390 395 400
 Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe
 405 410 415
 Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro Val
 420 425 430
 Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly Gln
 435 440 445
 Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Gln
 450 455 460
 Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu Thr
 465 470 475 480
 Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu Asn
 485 490 495
 Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala
 500 505
 Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly
 515 520 525
 Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile
 530 535 540
 Asn Gly Ser Ile Met Pro Val Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser
 545 550 555 560
 Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr
 565 570 575
 Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile
 580 585 590
 Ala Asp His Gln Lys Cys Thr Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro Gly
 595 600 605
 Val Arg Val Ser Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly Gly
 610 615 620
 Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp
 625 630 635 640
 Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser
 645 650 655
 Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile
 660 665 670
 Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu Asn Ile Ile Ser Asn Phe
 675 680 685

- 5 <210> 52
- <211> 670
- <212> PRT
- <213> Proteína madura MASP-2 murina

ES 2 589 315 T3

<400> 52

Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val
 1 5 10 15

Ser Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp
 20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His
 35 40 45

Phe Asp Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
 50 55 60

Ser Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr
 65 70 75 80

Asp Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro
 85 90 95

Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
 100 105 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg
 115 120 125

Val Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr
 130 135 140

Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln
 145 150 155 160

Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly
 165 170 175

ES 2 589 315 T3

Arg Ser Gly Tyr 180 Leu Ser Ser Pro Glu 185 Tyr Pro Gln Pro Tyr 190 Pro Lys
 Leu Ser Ser 195 Cys Thr Tyr Ser Ile 200 Arg Leu Glu Asp Gly 205 Phe Ser Val
 Ile Leu 210 Asp Phe Val Glu Ser 215 Phe Asp Val Glu Thr 220 His Pro Glu Ala
 Gln Cys Pro Tyr Asp Ser 230 Leu Lys Ile Gln Thr 235 Asp Lys Gly Glu His 240
 Gly Pro Phe Cys Gly 245 Lys Thr Leu Pro Pro 250 Arg Ile Glu Thr Asp Ser 255
 His Lys Val Thr 260 Ile Thr Phe Ala Thr 265 Asp Glu Ser Gly Asn His Thr 270
 Gly Trp Lys 275 Ile His Tyr Thr Ser 280 Thr Ala Arg Pro Cys 285 Pro Asp Pro
 Thr Ala 290 Pro Pro Asn Gly Ser 295 Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val
 Leu Lys Asp Arg Phe Ser 310 Val Phe Cys Lys Thr 315 Gly Phe Glu Leu Leu 320
 Gln Gly Ser Val Pro 325 Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp 335
 Gly Ser Trp Asp 340 Arg Pro Met Pro Glu 345 Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly 350
 Pro Pro Asp 355 Asp Leu Pro Asn Gly 360 His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro 365
 Gln Val 370 Thr Thr Tyr Lys Ala Val 375 Ile Gln Tyr Ser 380 Cys Glu Glu Thr
 Phe Tyr Thr Met Ser Ser 390 Asn Gly Lys Tyr Val 395 Cys Glu Ala Asp Gly 400
 Phe Trp Thr Ser Ser 405 Lys Gly Glu Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro 415
 Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly

ES 2 589 315 T3

420 425 430

Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly
435 440 445

Gln Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu
450 455 460

Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu
465 470 475 480

Asn Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln
485 490 495

Ala Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala
500 505 510

Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr
515 520 525

Ile Asn Gly Ser Ile Met Pro Val Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala
530 535 540

Ser Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu
545 550 555 560

Thr Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro
565 570 575

Ile Ala Asp His Gln Lys Cys Thr Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro
580 585 590

Gly Val Arg Val Ser Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly
595 600 605

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu
610 615 620

Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly
625 630 635 640

Ser Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val
645 650 655

Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu Asn Ile Ile Ser Asn Phe
660 665 670

<210> 53
 <211> 2091
 5 <212> DNA
 <213> CDS de MASP-2 de rata

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (10)..(2067)

<400> 53

ES 2 589 315 T3

tggcacaca	atg	agg	cta	ctg	atc	gtc	ctg	ggt	ctg	ctt	tgg	agt	ttg	gtg	51	
	Met	Arg	Leu	Leu	Ile	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Trp	Ser	Leu	Val		
	1				5					10						
gcc	aca	ctt	ttg	ggc	tcc	aag	tgg	cct	gag	cct	gta	ttc	ggg	cgc	ctg	99
Ala	Thr	Leu	Leu	Gly	Ser	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Val	Phe	Gly	Arg	Leu	
15				20					25					30		
gtg	tcc	ctg	gcc	ttc	cca	gag	aag	tat	ggc	aac	cat	cag	gat	cga	tcc	147
Val	Ser	Leu	Ala	Phe	Pro	Glu	Lys	Tyr	Gly	Asn	His	Gln	Asp	Arg	Ser	
			35						40					45		
tgg	acg	ctg	act	gca	ccc	cct	ggc	ttc	cgc	ctg	cgc	ctc	tac	ttc	acc	195
Trp	Thr	Leu	Thr	Ala	Pro	Pro	Gly	Phe	Arg	Leu	Arg	Leu	Tyr	Phe	Thr	
			50				55						60			
cac	ttc	aac	ctg	gaa	ctc	tct	tac	cgc	tgc	gag	tat	gac	ttt	gtc	aag	243
His	Phe	Asn	Leu	Glu	Leu	Ser	Tyr	Arg	Cys	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Lys	
		65					70					75				
ttg	acc	tca	ggg	acc	aag	gtg	cta	gcc	acg	ctg	tgt	ggg	cag	gag	agt	291
Leu	Thr	Ser	Gly	Thr	Lys	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Cys	Gly	Gln	Glu	Ser	
	80					85					90					
aca	gat	act	gag	cgg	gca	cct	ggc	aat	gac	acc	ttc	tac	tca	ctg	ggt	339
Thr	Asp	Thr	Glu	Arg	Ala	Pro	Gly	Asn	Asp	Thr	Phe	Tyr	Ser	Leu	Gly	
95					100					105					110	
ccc	agc	cta	aag	gtc	acc	ttc	cac	tcc	gac	tac	tcc	aat	gag	aag	cca	387
Pro	Ser	Leu	Lys	Val	Thr	Phe	His	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	
			115						120					125		
ttc	aca	gga	ttt	gag	gcc	ttc	tat	gca	gcg	gag	gat	gtg	gat	gaa	tgc	435
Phe	Thr	Gly	Phe	Glu	Ala	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	
			130					135					140			
aga	aca	tcc	ctg	gga	gac	tca	gtc	cct	tgt	gac	cat	tat	tgc	cac	aac	483
Arg	Thr	Ser	Leu	Gly	Asp	Ser	Val	Pro	Cys	Asp	His	Tyr	Cys	His	Asn	
		145					150					155				
tac	ctg	ggc	ggc	tac	tac	tgc	tcc	tgc	cga	gtg	ggc	tac	att	ctg	cac	531
Tyr	Leu	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Cys	Arg	Val	Gly	Tyr	Ile	Leu	His	
	160					165					170					
cag	aac	aag	cat	acc	tgc	tca	gcc	ctt	tgt	tca	ggc	cag	gtg	ttc	act	579
Gln	Asn	Lys	His	Thr	Cys	Ser	Ala	Leu	Cys	Ser	Gly	Gln	Val	Phe	Thr	
175				180					185					190		
ggg	agg	tct	ggc	ttt	ctc	agt	agc	cct	gag	tac	cca	cag	cca	tac	ccc	627
Gly	Arg	Ser	Gly	Phe	Leu	Ser	Ser	Pro	Glu	Tyr	Pro	Gln	Pro	Tyr	Pro	
				195					200					205		

ES 2 589 315 T3

aaa	ctc	tcc	agc	tgc	gcc	tac	aac	atc	cgc	ctg	gag	gaa	ggc	ttc	agt	675
Lys	Leu	Ser	Ser	Cys	Ala	Tyr	Asn	Ile	Arg	Leu	Glu	Glu	Gly	Phe	Ser	
			210					215					220			
atc	acc	ctg	gac	ttc	gtg	gag	tcc	ttt	gat	gtg	gag	atg	cac	cct	gaa	723
Ile	Thr	Leu	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Phe	Asp	Val	Glu	Met	His	Pro	Glu	
		225					230					235				
gcc	cag	tgc	ccc	tac	gac	tcc	ctc	aag	att	caa	aca	gac	aag	agg	gaa	771
Ala	Gln	Cys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Lys	Arg	Glu	
	240					245					250					
tac	ggc	ccg	ttt	tgt	ggg	aag	acg	ctg	ccc	ccc	agg	att	gaa	act	gac	819
Tyr	Gly	Pro	Phe	Cys	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Pro	Arg	Ile	Glu	Thr	Asp	
255				260						265				270		
agc	aac	aag	gtg	acc	att	acc	ttt	acc	acc	gac	gag	tca	ggg	aac	cac	867
Ser	Asn	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Phe	Thr	Thr	Asp	Glu	Ser	Gly	Asn	His	
			275						280					285		
aca	ggc	tgg	aag	ata	cac	tac	aca	agc	aca	gca	cag	ccc	tgc	cct	gat	915
Thr	Gly	Trp	Lys	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Gln	Pro	Cys	Pro	Asp	
			290					295					300			
cca	acg	gcg	cca	cct	aat	ggt	cac	att	tca	cct	gtg	caa	gcc	acg	tat	963
Pro	Thr	Ala	Pro	Pro	Asn	Gly	His	Ile	Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Thr	Tyr	
		305					310					315				
gtc	ctg	aag	gac	agc	ttt	tct	gtc	ttc	tgc	aag	act	ggc	ttc	gag	ctt	1011
Val	Leu	Lys	Asp	Ser	Phe	Ser	Val	Phe	Cys	Lys	Thr	Gly	Phe	Glu	Leu	
	320					325					330					
ctg	caa	ggt	tct	gtc	ccc	ctg	aag	tca	ttc	act	gct	gtc	tgt	cag	aaa	1059
Leu	Gln	Gly	Ser	Val	Pro	Leu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Cys	Gln	Lys	
335					340					345				350		
gat	gga	tct	tgg	gac	cgg	ccg	ata	cca	gag	tgc	agc	att	att	gac	tgt	1107
Asp	Gly	Ser	Trp	Asp	Arg	Pro	Ile	Pro	Glu	Cys	Ser	Ile	Ile	Asp	Cys	
				355					360					365		
ggc	cct	ccc	gat	gac	cta	ccc	aat	ggc	cac	gtg	gac	tat	atc	aca	ggc	1155
Gly	Pro	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Asn	Gly	His	Val	Asp	Tyr	Ile	Thr	Gly	
			370					375					380			
cct	gaa	gtg	acc	acc	tac	aaa	gct	gtg	att	cag	tac	agc	tgt	gaa	gag	1203
Pro	Glu	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Val	Ile	Gln	Tyr	Ser	Cys	Glu	Glu	
		385					390					395				
act	ttc	tac	aca	atg	agc	agc	aat	ggt	aaa	tat	gtg	tgt	gag	gct	gat	1251
Thr	Phe	Tyr	Thr	Met	Ser	Ser	Asn	Gly	Lys	Tyr	Val	Cys	Glu	Ala	Asp	
	400					405					410					
gga	ttc	tgg	acg	agc	tcc	aaa	gga	gaa	aaa	tcc	ctc	ccg	gtt	tgc	aag	1299
Gly	Phe	Trp	Thr	Ser	Ser	Lys	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Pro	Val	Cys	Lys	
415					420					425				430		
cct	gtc	tgt	gga	ctg	tcc	aca	cac	act	tca	gga	ggc	cgt	ata	att	gga	1347
Pro	Val	Cys	Gly	Leu	Ser	Thr	His	Thr	Ser	Gly	Gly	Arg	Ile	Ile	Gly	
				435					440					445		
gga	cag	cct	gca	aag	cct	ggt	gac	ttt	cct	tgg	caa	gtc	ttg	tta	ctg	1395
Gly	Gln	Pro	Ala	Lys	Pro	Gly	Asp	Phe	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	
			450					455					460			

ES 2 589 315 T3

ggt gaa act aca gca gca ggt gct ctt ata cat gac gac tgg gtc cta 1443
 Gly Glu Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu
 465 470 475
 aca gcg gct cat gct gta tat ggg aaa aca gag gcg atg tcc tcc ctg 1491
 Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu
 480 485 490
 gac atc cgc atg ggc atc ctc aaa agg ctc tcc ctc att tac act caa 1539
 Asp Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln
 495 500 505 510
 gcc tgg cca gag gct gtc ttt atc cat gaa ggc tac act cac gga gct 1587
 Ala Trp Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala
 515 520 525
 ggt ttt gac aat gat ata gca ctg att aaa ctc aag aac aaa gtc aca 1635
 Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr
 530 535 540
 atc aac aga aac atc atg ccg att tgt cta cca aga aaa gaa gct gca 1683
 Ile Asn Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala
 545 550 555
 tcc tta atg aaa aca gac ttc gtt gga act gtg gct ggc tgg ggg tta 1731
 Ser Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu
 560 565 570
 acc cag aag ggg ttt ctt gct aga aac cta atg ttt gtg gac ata cca 1779
 Thr Gln Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro
 575 580 585 590
 att gtt gac cac caa aaa tgt gct act gcg tat aca aag cag ccc tac 1827
 Ile Val Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr
 595 600 605
 cca gga gca aaa gtg act gtt aac atg ctc tgt gct ggc cta gac cgc 1875
 Pro Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg
 610 615 620
 ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga ggg gca tta gtg ttt 1923
 Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe
 625 630 635
 cta gac aat gaa aca cag aga tgg ttt gtg gga gga ata gtt tcc tgg 1971
 Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp
 640 645 650
 ggt tct att aac tgt ggg ggg tca gaa cag tat ggg gtc tac acg aaa 2019
 Gly Ser Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys
 655 660 665 670
 gtc acg aac tat att ccc tgg att gag aac ata ata aat aat ttc taa 2067
 Val Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe
 675 680 685
 ttgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2091

<210> 54

<211> 685

<212> PRT

<213> CDS de MASP-2 de rata

<400> 54

5

ES 2 589 315 T3

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

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

Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser Trp Thr
35 40 45

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

Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Thr
65 70 75 80

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

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

Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Thr
130 135 140

Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu
145 150 155 160

Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn
165 170 175

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

Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu
195 200 205

Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser Ile Thr
210 215 220

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu Ala Gln
225 230 235 240

ES 2 589 315 T3

Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu Tyr Gly
 245 250 255
 Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser Asn
 260 265 270
 Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr Gly
 275 280 285
 Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp Pro Thr
 290 295 300
 Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu
 305 310 315 320
 Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln
 325 330 335
 Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly
 340 345 350
 Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro
 355 360 365
 Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Glu
 370 375 380
 Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe
 385 390 395 400
 Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe
 405 410 415
 Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Lys Pro Val
 420 425 430
 Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly Gly Gln
 435 440 445
 Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Glu
 450 455 460
 Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu Thr Ala
 465 470 475 480
 Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu Asp Ile
 485 490 495

ES 2 589 315 T3

Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln Ala Trp
500 505 510

Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly Phe
515 520 525

Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile Asn
530 535 540

Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser Leu
545 550 555 560

Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln
565 570 575

Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile Val
580 585 590

Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr Pro Gly
595 600 605

Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly Gly
610 615 620

Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp
625 630 635 640

Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser
645 650 655

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

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

<210> 55

<211> 670

5 <212> PRT

<213> Proteína madura MASP-2 de rata

<400> 55

Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val
1 5 10 15

Ser Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser Trp
20 25 30

10

ES 2 589 315 T3

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

ES 2 589 315 T3

Asn Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser
 530 535 540
 Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr
 545 550 555
 Gln Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile
 565 570 575
 Val Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr Pro
 580 585 590
 Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly
 595 600 605
 Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu
 610 615 620
 Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly
 625 630 635 640
 Ser Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val
 645 650 655
 Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe
 660 665 670

- 5 <210> 56
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
 <223> Cebador PCR de MASP-2 de Homo Sapiens
 <400> 56
 atgaggctgc tgaccctct ggccttc 28
- 15 <210> 57
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
 <223> Cebador PCR de MASP-2 de Homo Sapiens
 <400> 57
 gtgccctcc tgcgtcacct ctg 23
- 25 <210> 58
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
 <223> Cebador PCR de MASP-2 de Homo Sapiens
 <400> 58
 cagaggtgac gcaggagggg cac 23
- 35 <210> 59
 <211> 27
 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR de MASP-2 de Homo Sapiens
 5 <400> 59
 ttaaaatcac taattatggt ctgatc 27
 <210> 60
 10 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador PCR de MASP-2 murina
 <400> 60
 atgaggctac tcatcttct gg 22
 <210> 61
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Cebador PCR de MASP-2 murina
 <400> 61
 ctgcagaggt gacgcagggg ggg 23
 30 <210> 62
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Cebador PCR de MASP-2 murina
 <400> 62
 40 cccccctgc gtcacctg cag 23
 <210> 63
 <211> 29
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR de MASP-2 murina
 <400> 63
 50 ttagaaatta cttattatgt tctcaatcc 29
 <210> 64
 <211> 29
 55 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido de MASP-2 de rata
 60 <400> 64
 gaggtgacgc aggaggggca ttagtggtt 29
 <210> 65
 65 <211> 37
 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido de MASP-2 de rata

5

<400> 65

ctagaaacac taatgccct cctgcgtcac ctctgca 37

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente inhibidor de MASP-2 para uso como medicamento, que inhibe selectivamente la activación del complemento dependiente de MASP-2 y a la vez deja intacta la funcionalidad de activación de la vía del complemento clásica dependiente de C1q, en donde el agente es un anticuerpo o su fragmento que se une al polipéptido de MASP-2 de longitud total, pero no se une a un fragmento N-terminal de MASP-2 que consiste en los dominios CUBI-EGF-CUBII y no se une al fragmento C-terminal de MASP-2 que consiste en los dominios CCPII-SP.
2. El agente para uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo.
- 10 3. El agente para uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o su fragmento es policlonal, o un anticuerpo recombinante, o donde el anticuerpo posee función efectora reducida, donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano, o donde el anticuerpo se produce en un animal no humano transgénico deficiente de MASP-2.
- 15 4. Una composición farmacéutica para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 como se expone para uso en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 5. Un agente inhibidor de MASP-2 según la reivindicación 1 o 2, para uso en la inhibición de los efectos de la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que lo necesita, en donde el sujeto padece una afección mediada por el complemento dependiente de MASP-2 seleccionada entre:
 - (i) una lesión de isquemia-reperfusión, en donde la lesión de isquemia –reperfusión está asociada con reparación de un aneurisma aórtico, derivación cardiopulmonar, reanastomosis vascular en relación con el trasplante de órganos y/o reimplante de extremidades/dígitos, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio y reanimación hemodinámica después de un choque y/o procedimientos quirúrgicos;
 - (ii) artritis reumatoidea;
 - (iii) degeneración macular relacionada con la edad.
- 25 6. Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, para uso en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad.
7. Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, para uso en el tratamiento de la artritis reumatoidea.
8. Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, para uso en el tratamiento de la lesión de isquemia-reperfusión asociada con aneurisma aórtico.
- 30 9. Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, para uso en el tratamiento de una lesión de isquemia-reperfusión asociada con derivación cardiopulmonar.
10. Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, para uso en el tratamiento de una lesión de isquemia-reperfusión asociada con reanastomosis vascular en conexión con trasplantes de órganos y/o reimplante de extremidades/dígitos.
- 35 11. Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, para uso en el tratamiento de lesión de isquemia-reperfusión asociada con accidente cerebrovascular.
12. Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, para uso en el tratamiento de una lesión de isquemia-reperfusión asociada con lesión pulmonar aguda.
- 40 13. Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, para uso en el tratamiento de una lesión de isquemia-reperfusión asociada con infarto de miocardio.
14. Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, para uso en el tratamiento de una lesión de isquemia-reperfusión asociada con reanimación hemodinámica después de un choque y/o procedimientos quirúrgicos.

Vía clásica

Vía de lectinas

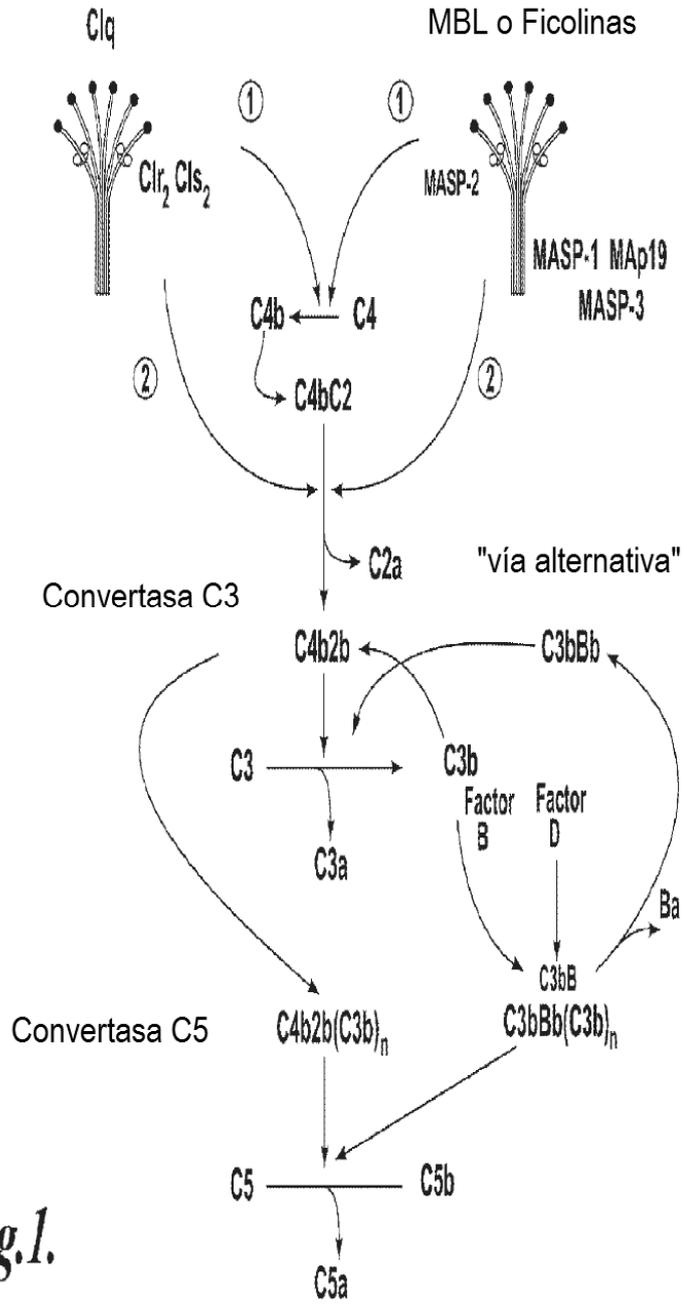


Fig.1.

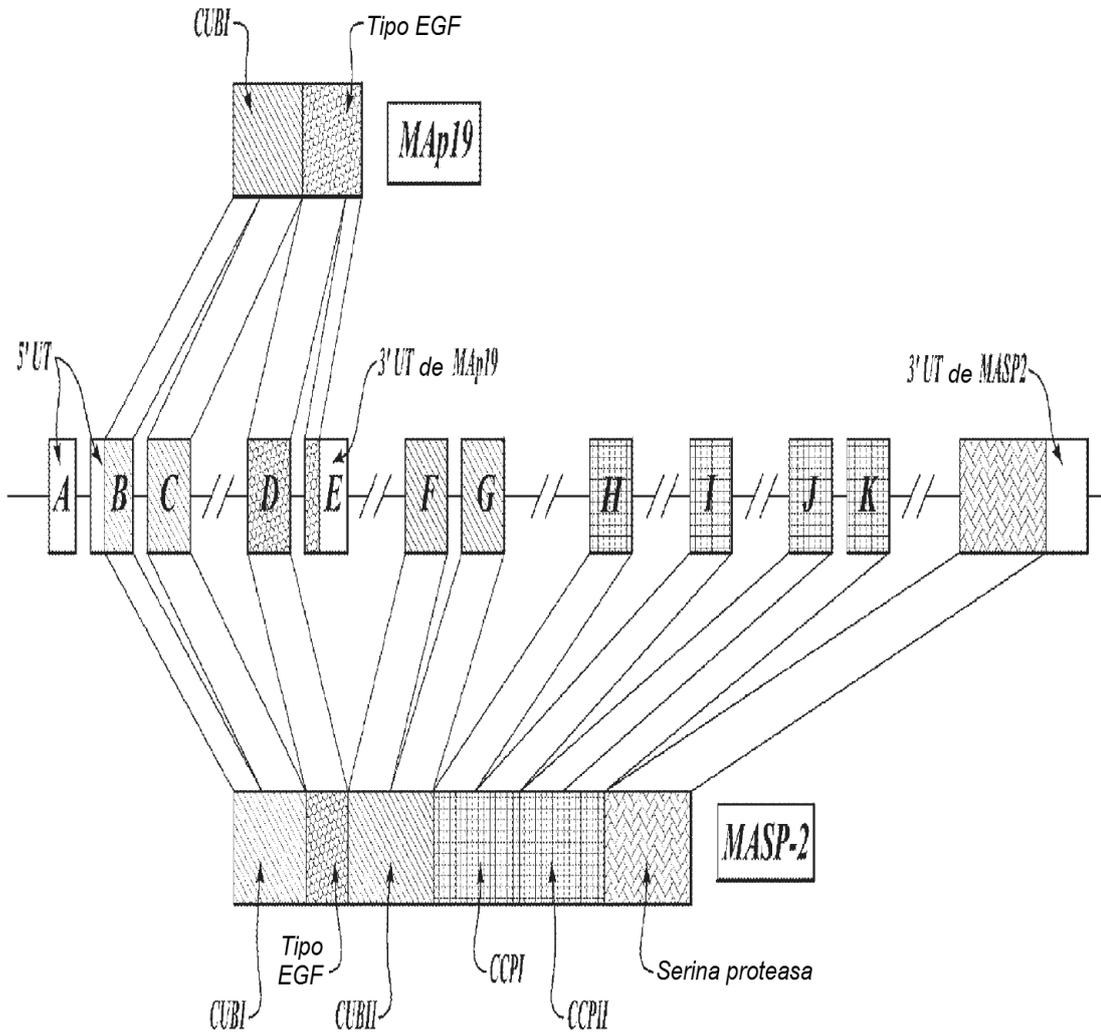
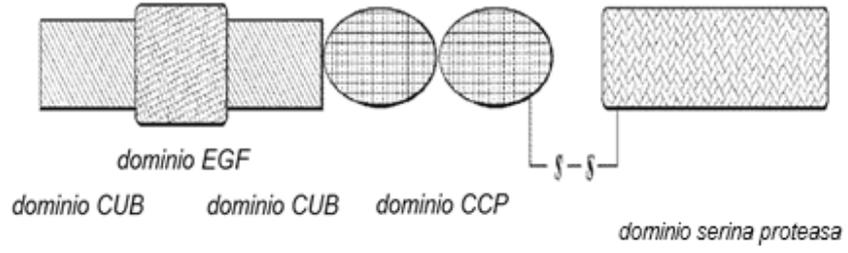


Fig.2.

Clr/Clk/MASP-1/MASP-2/MASP-3

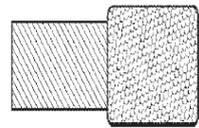
Fig.3A.



Map19

EQSL

Fig.3B.



dominio CUB dominio EGF

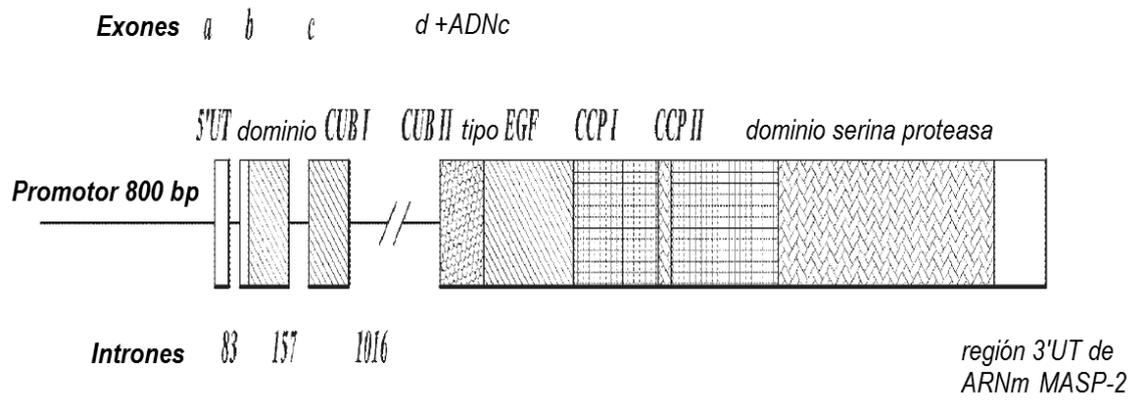


Fig.5.

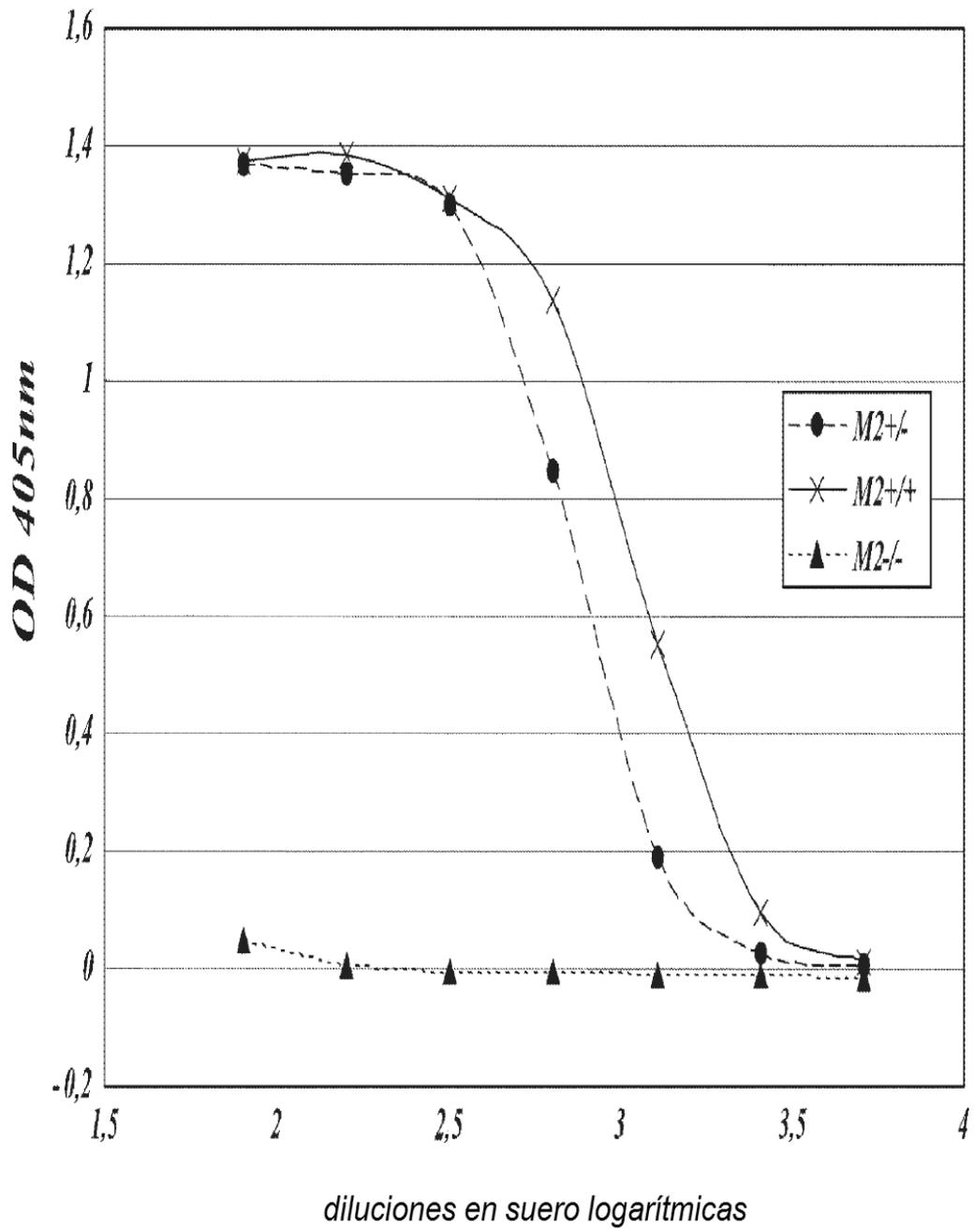


Fig.6A.

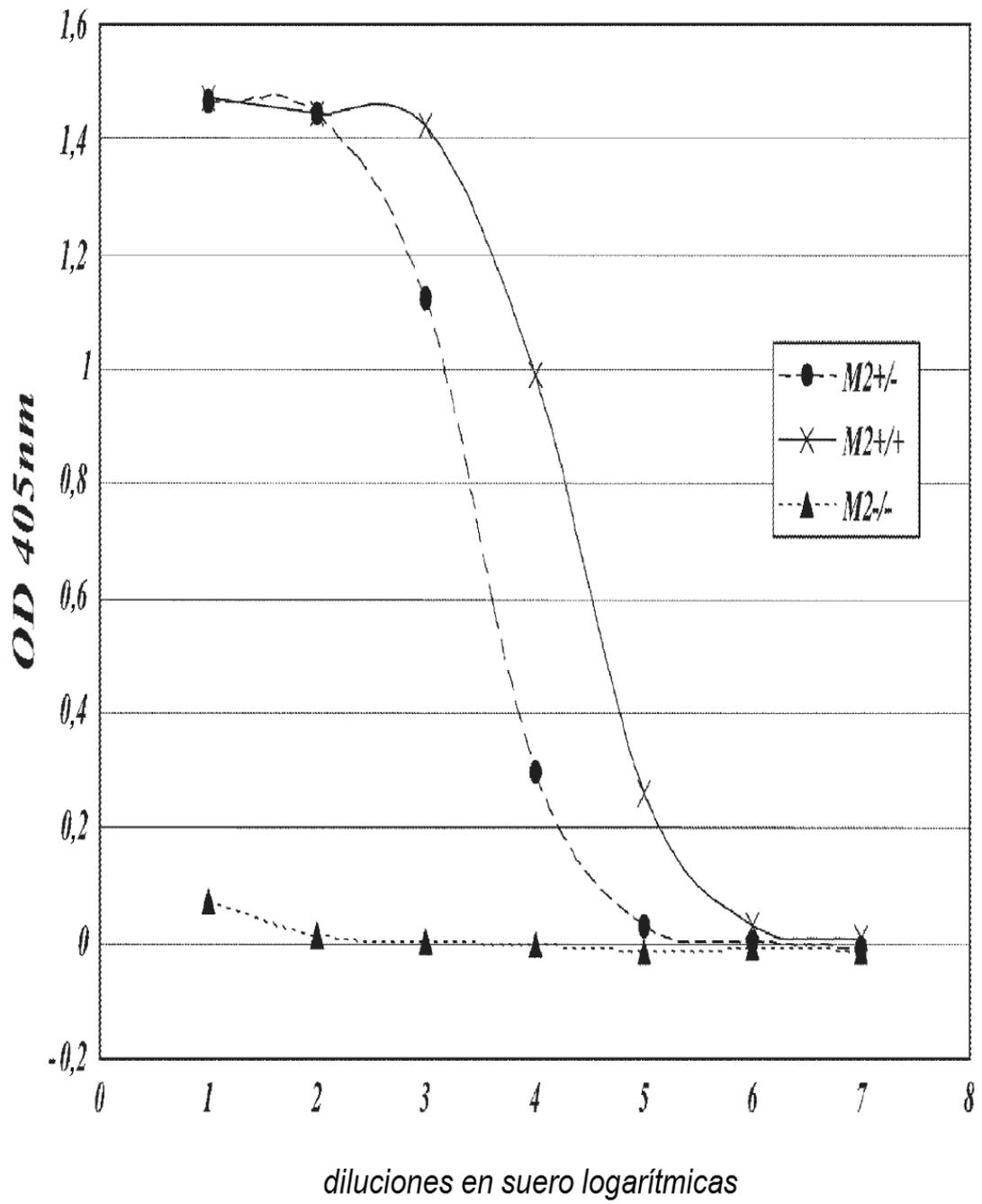


Fig.6B.

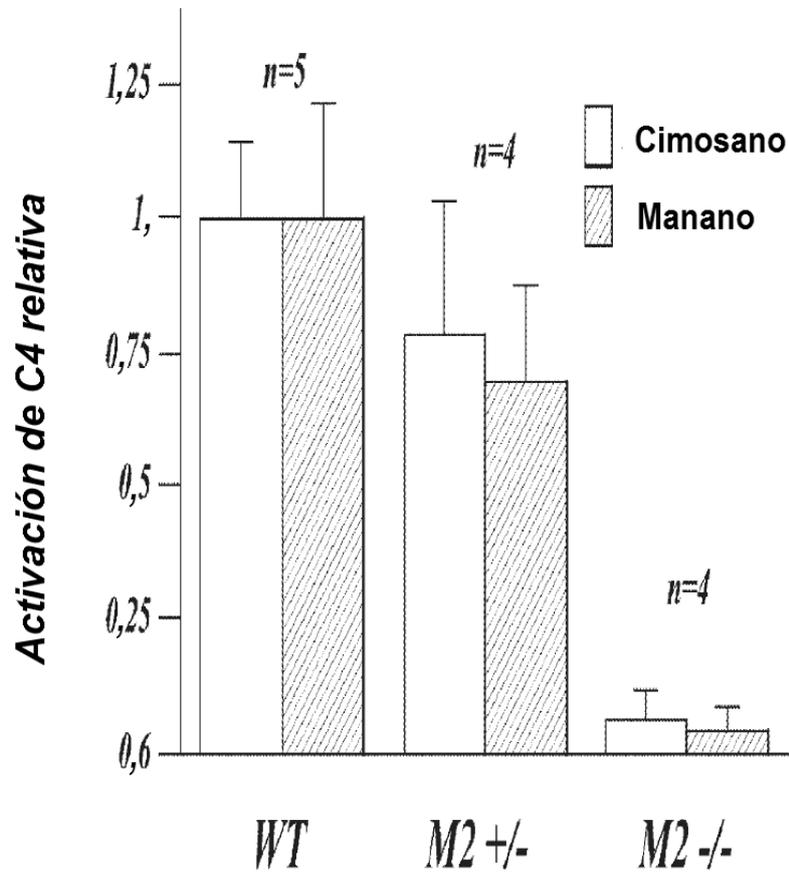


Fig.6C.

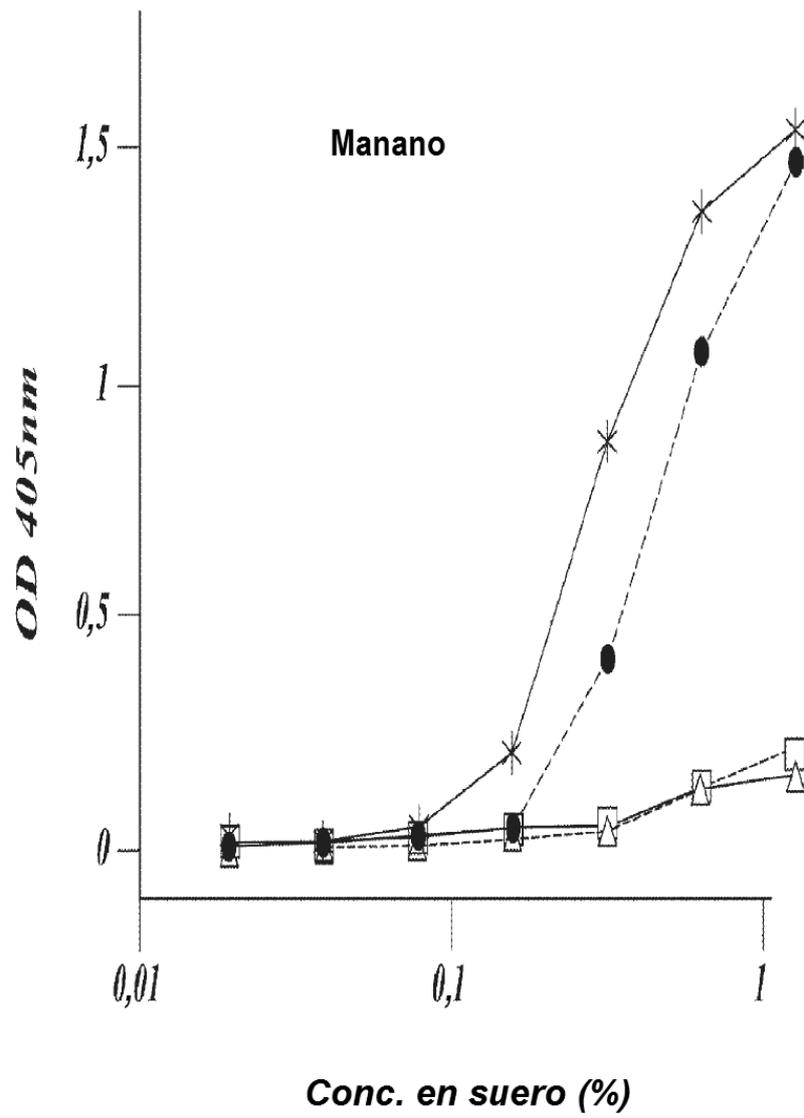


Fig.7A.

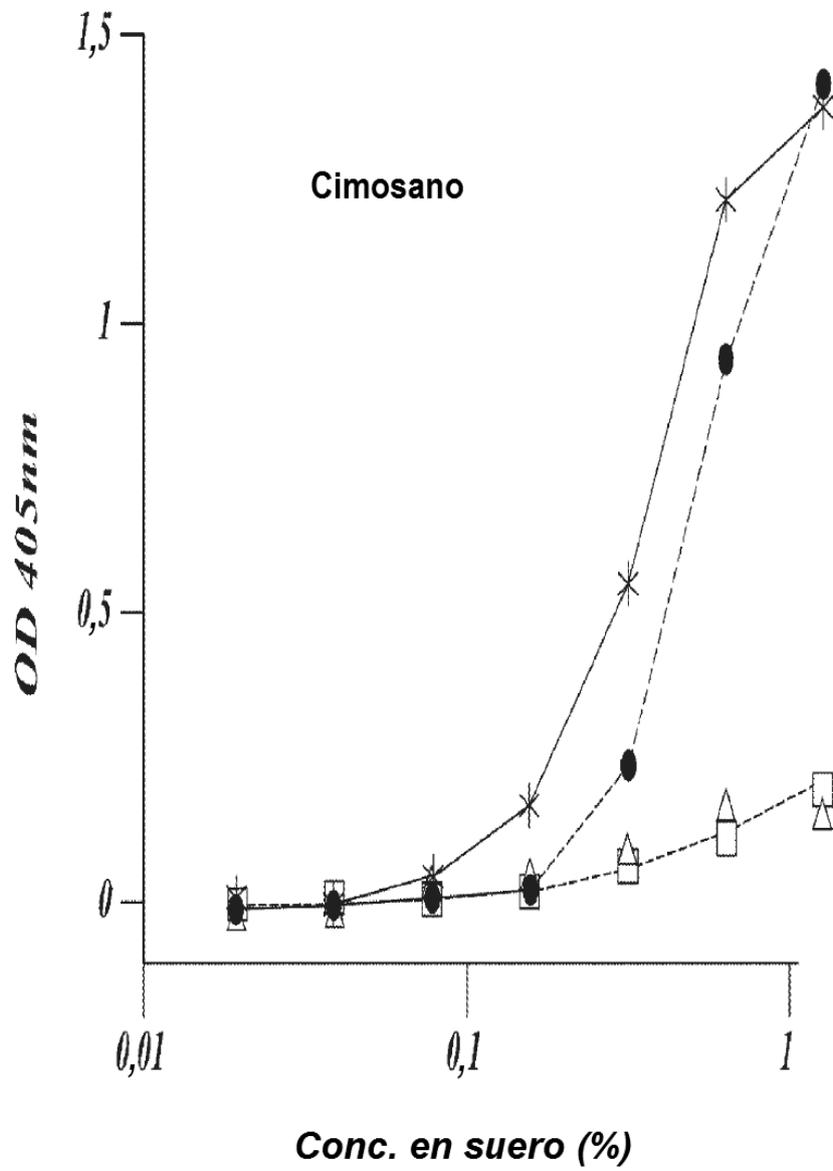


Fig. 7B.

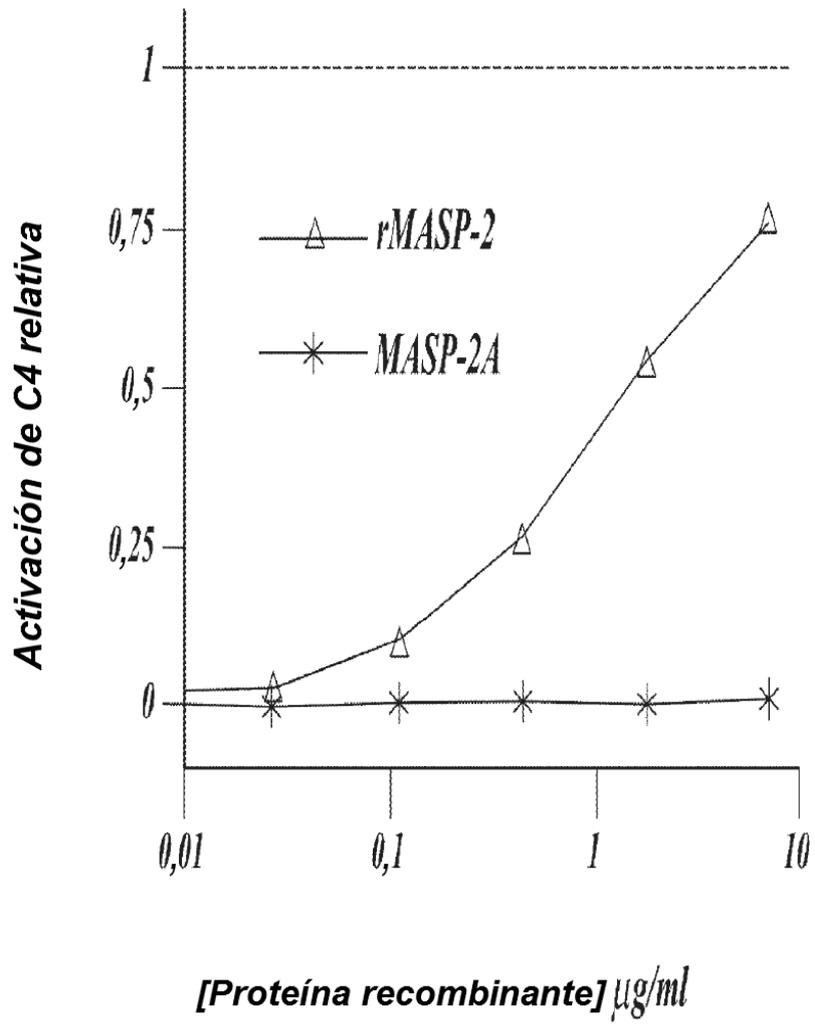


Fig.8.

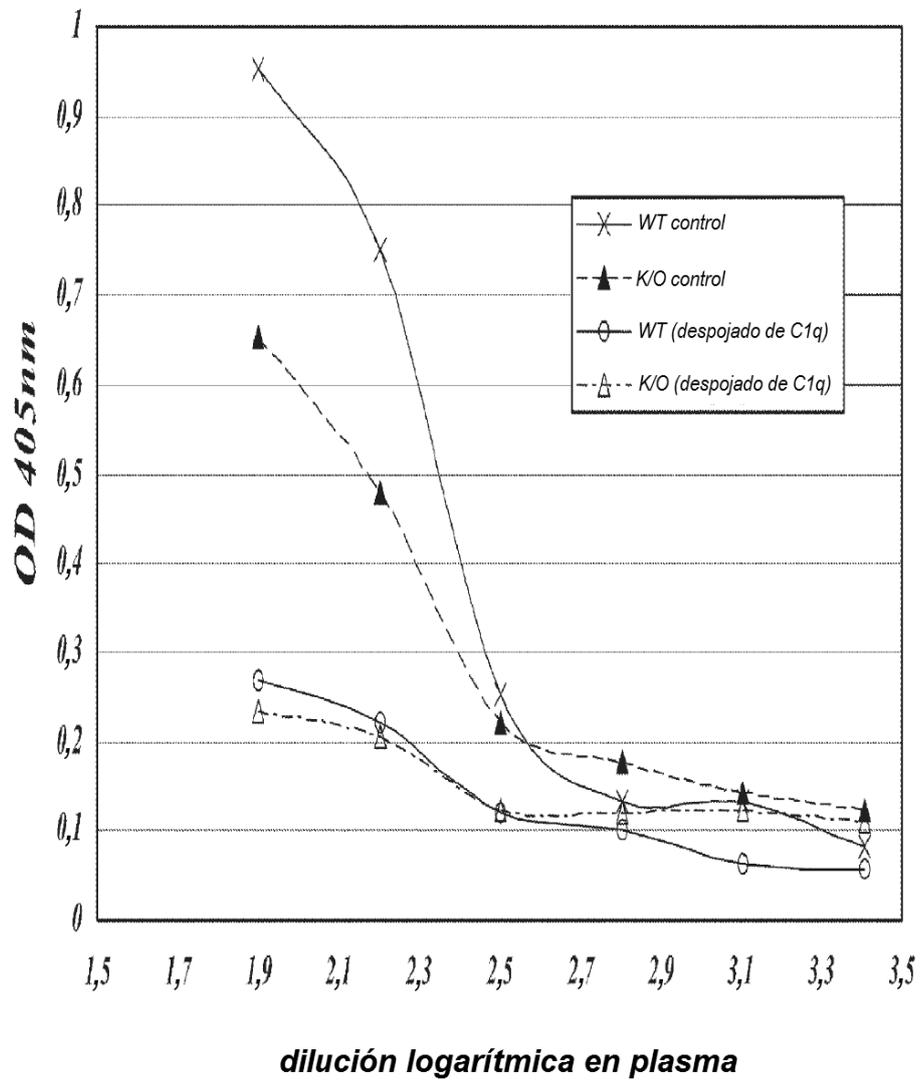


Fig.9.

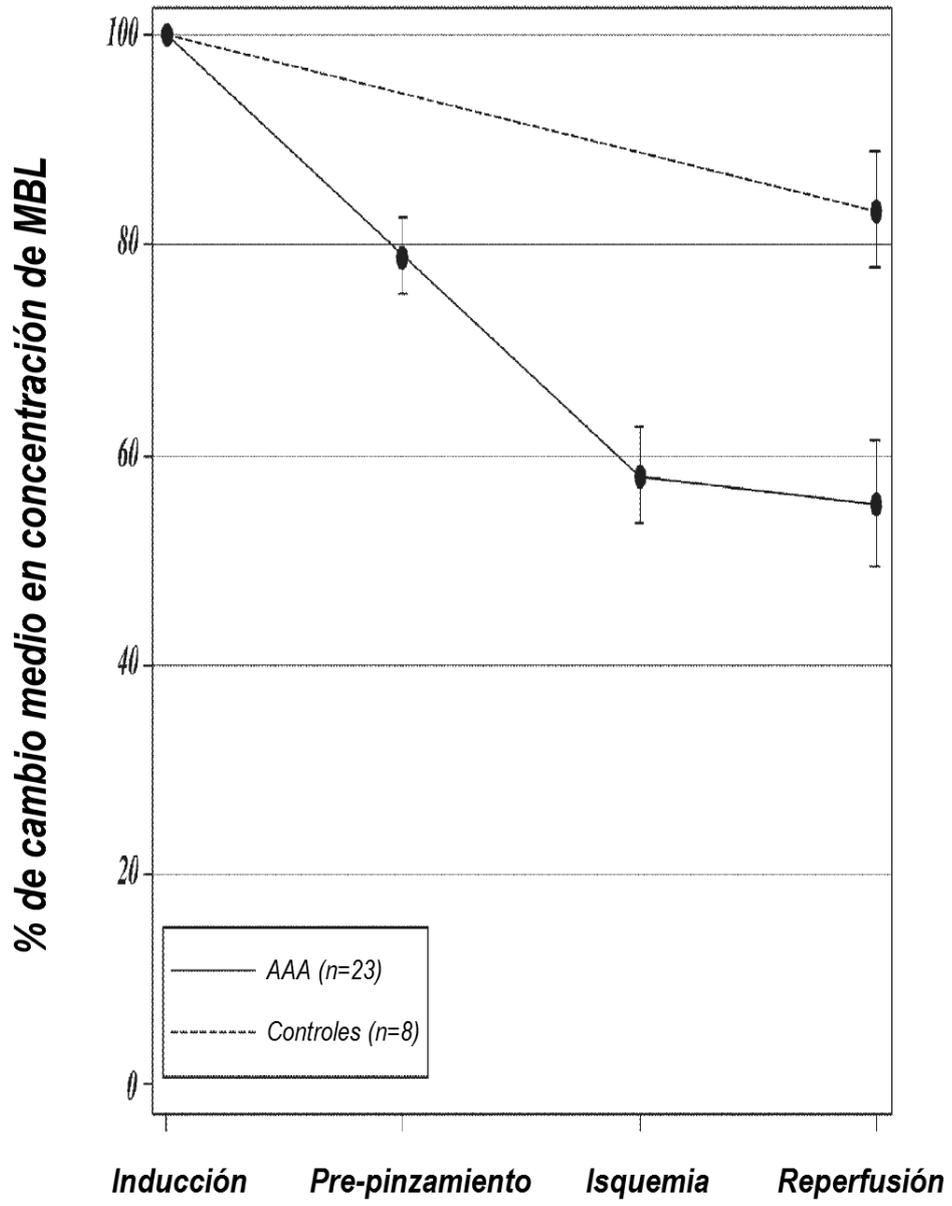


Fig.10.

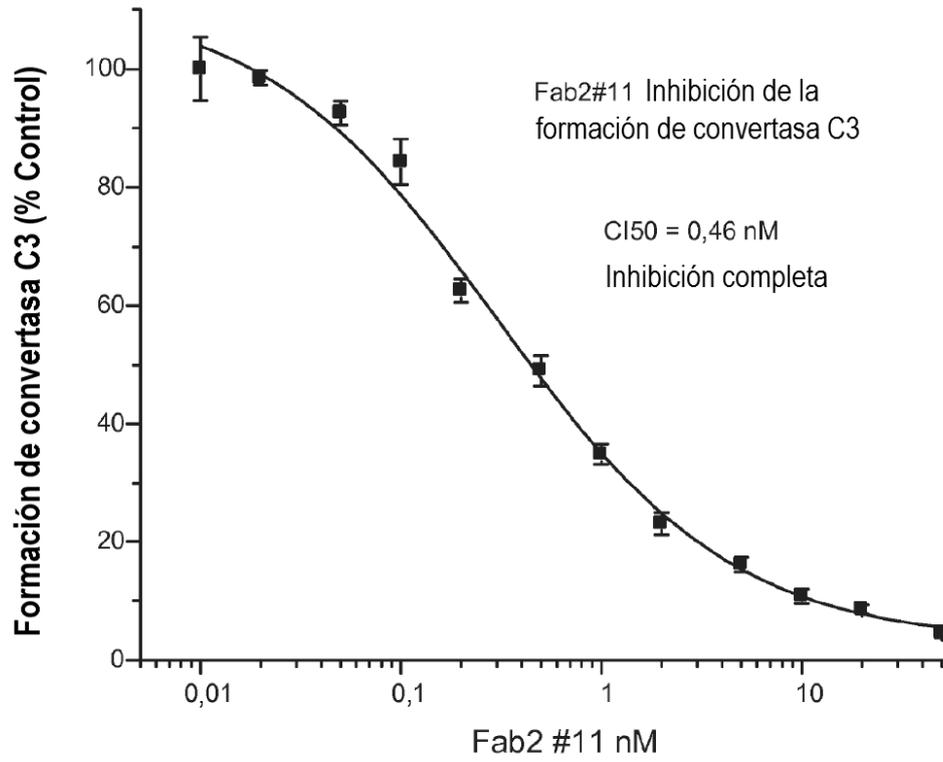


Fig.11A.

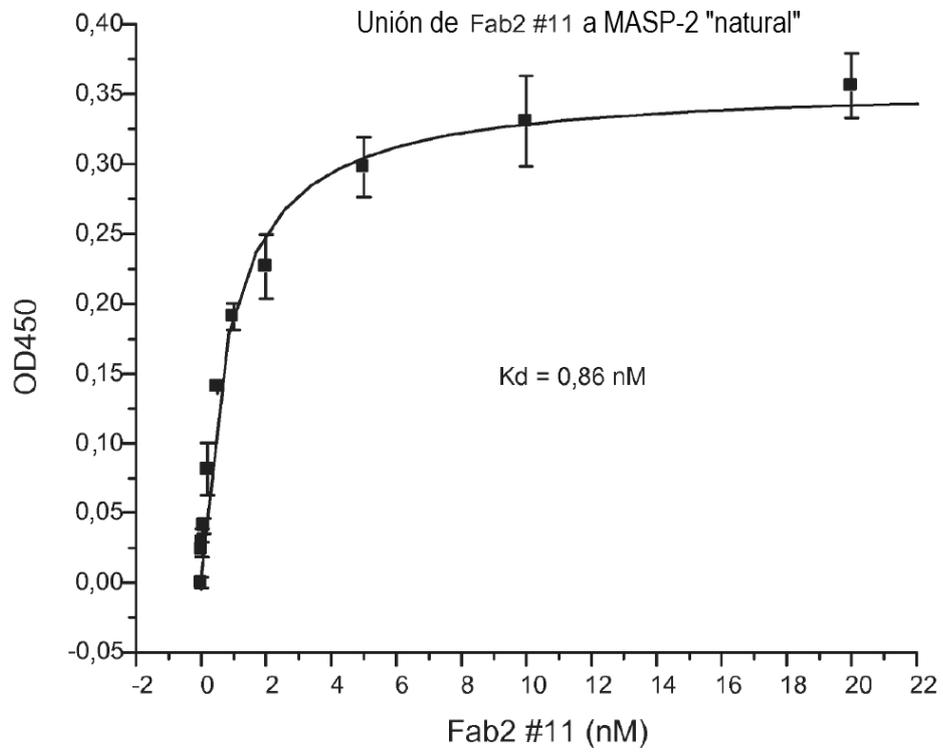


Fig.11B.

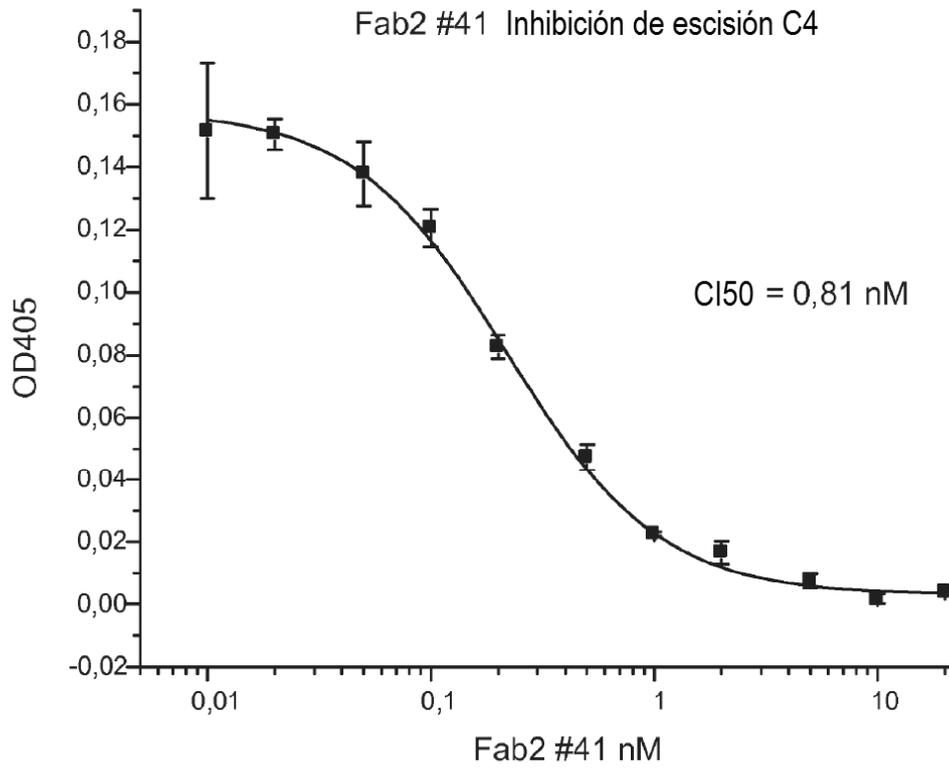


Fig.11C.

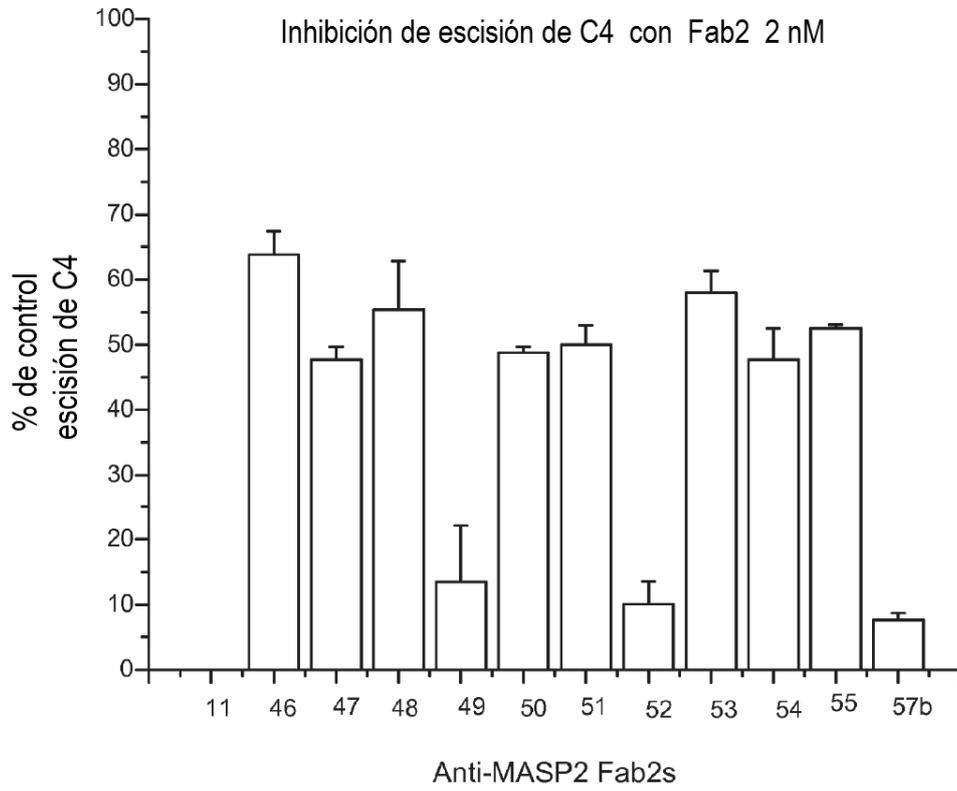


Fig.12.

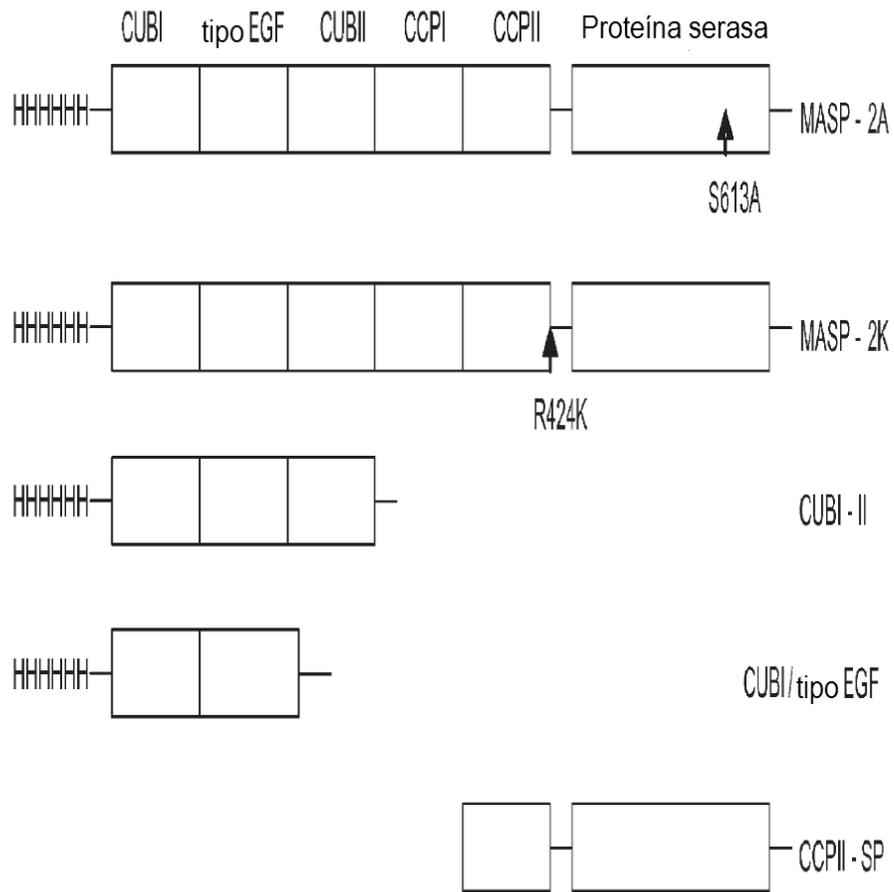


Fig.13.

Unión de AbD Ab #40 y #60 a polipéptidos MASP2 de rata

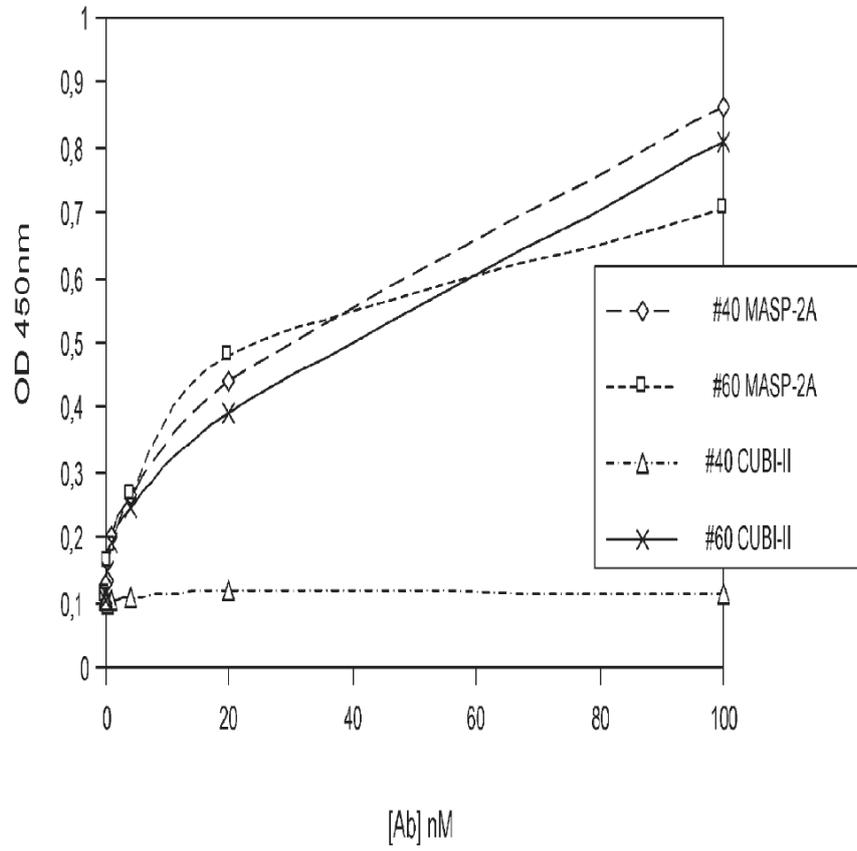


Fig.14.

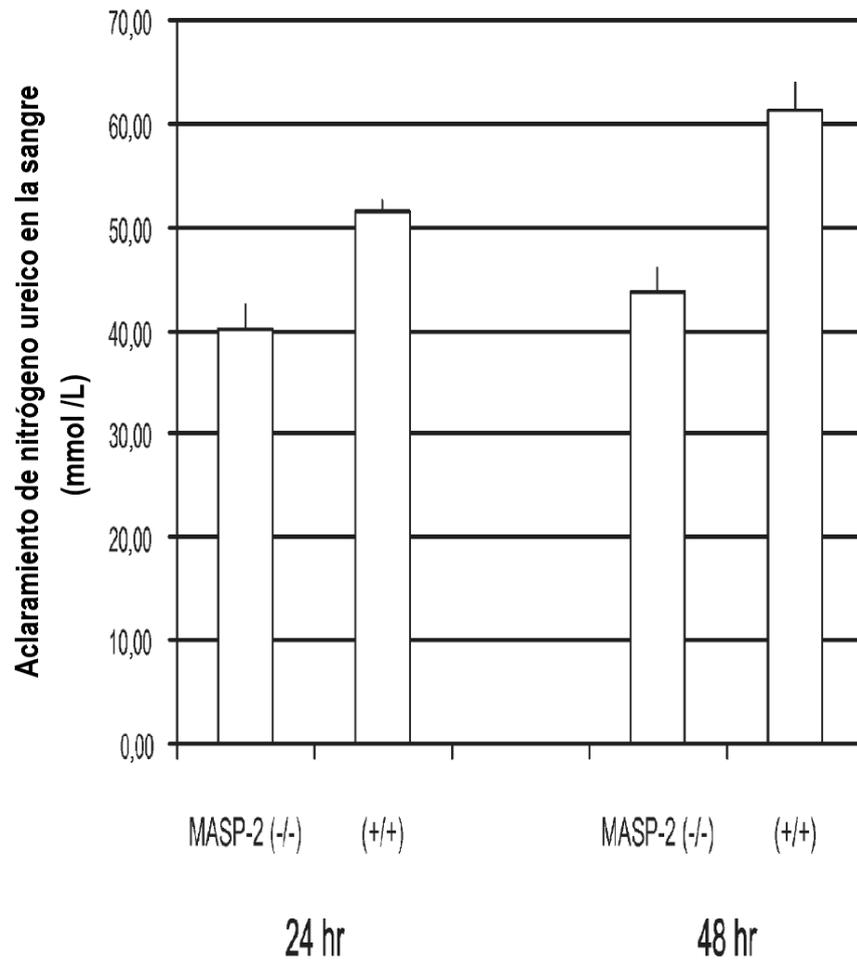


Fig.15.

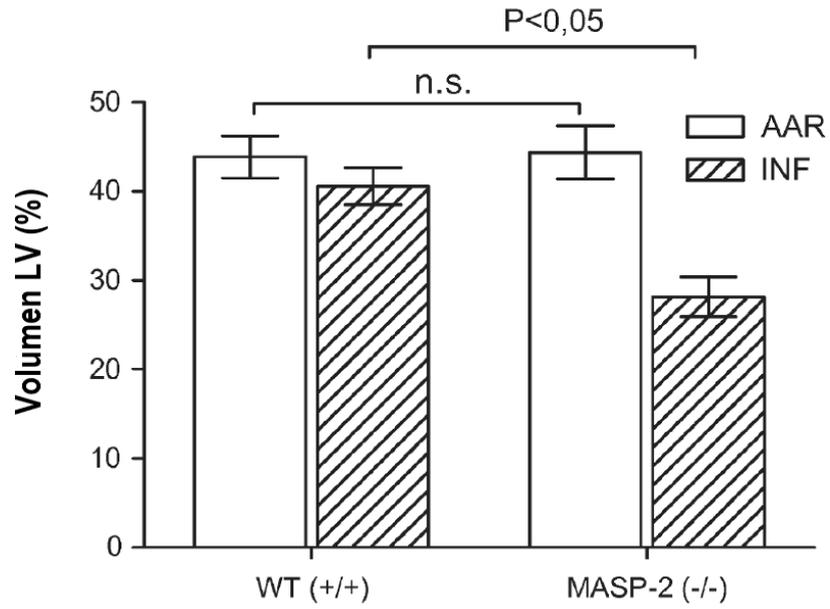


Fig.16A.

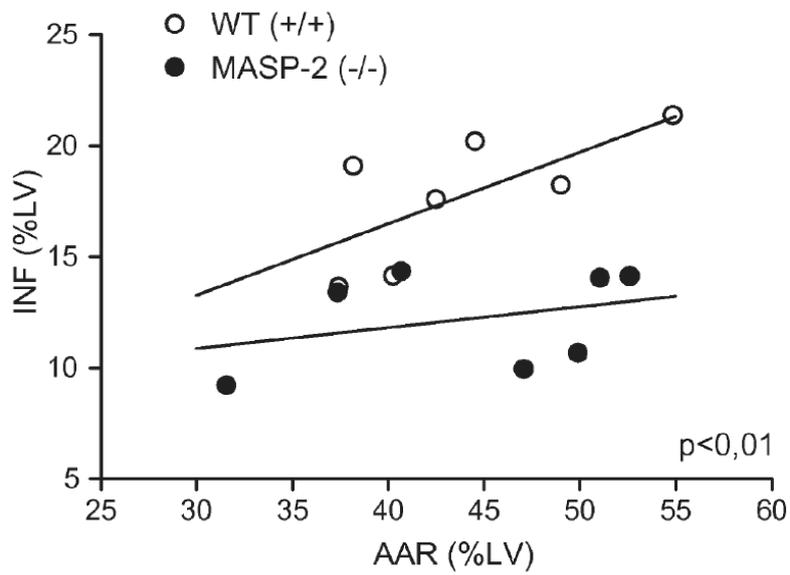


Fig.16B.

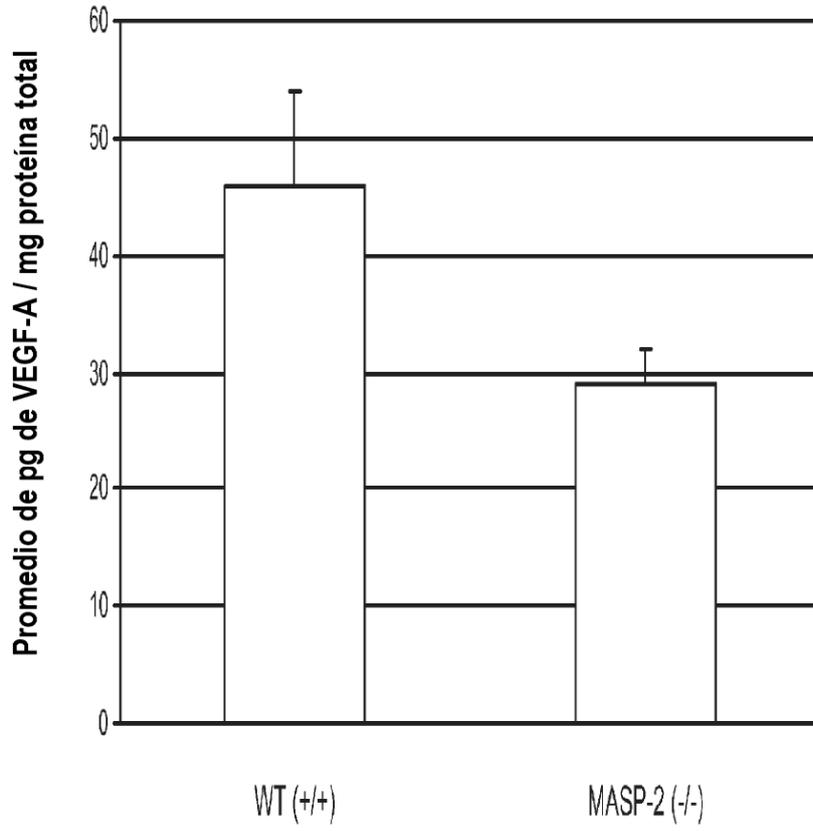


Fig.17A.

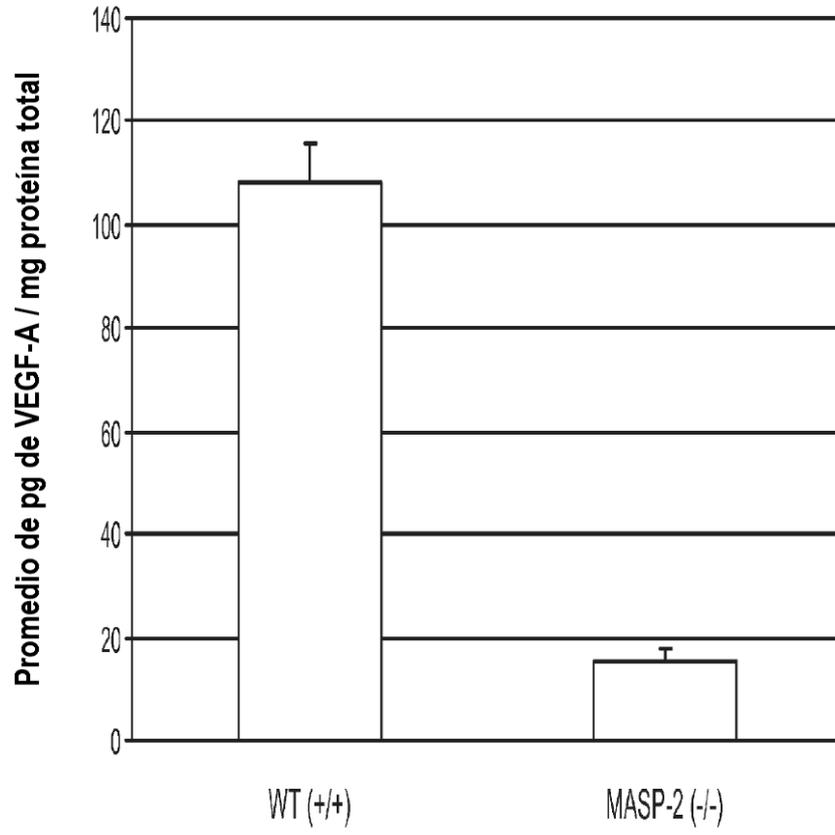


Fig.17B.

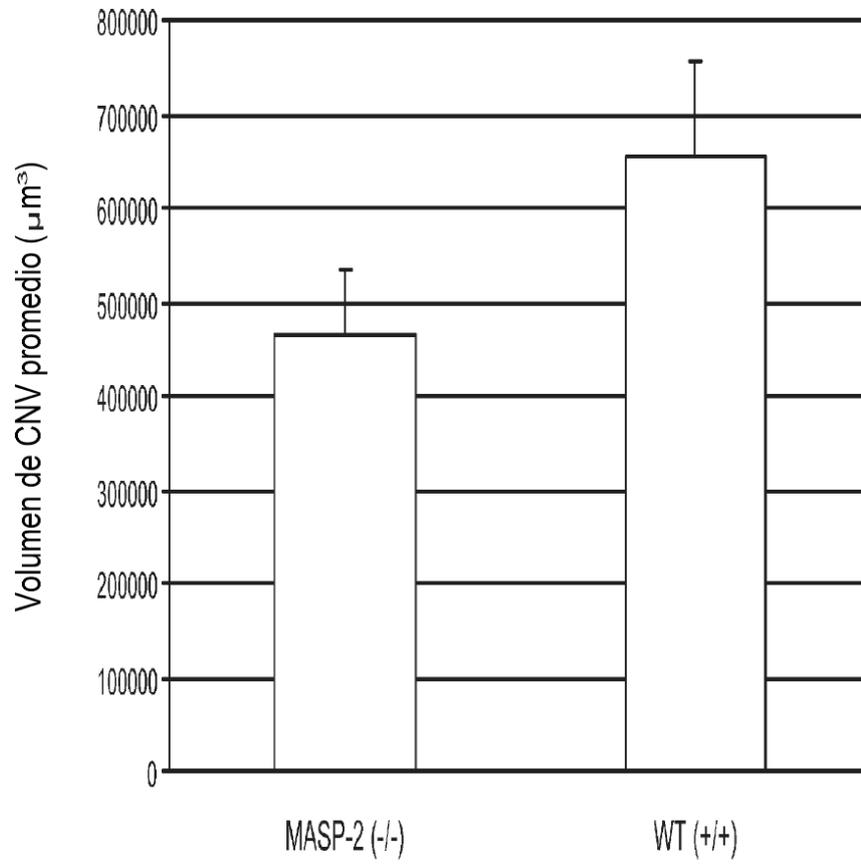


Fig.18.

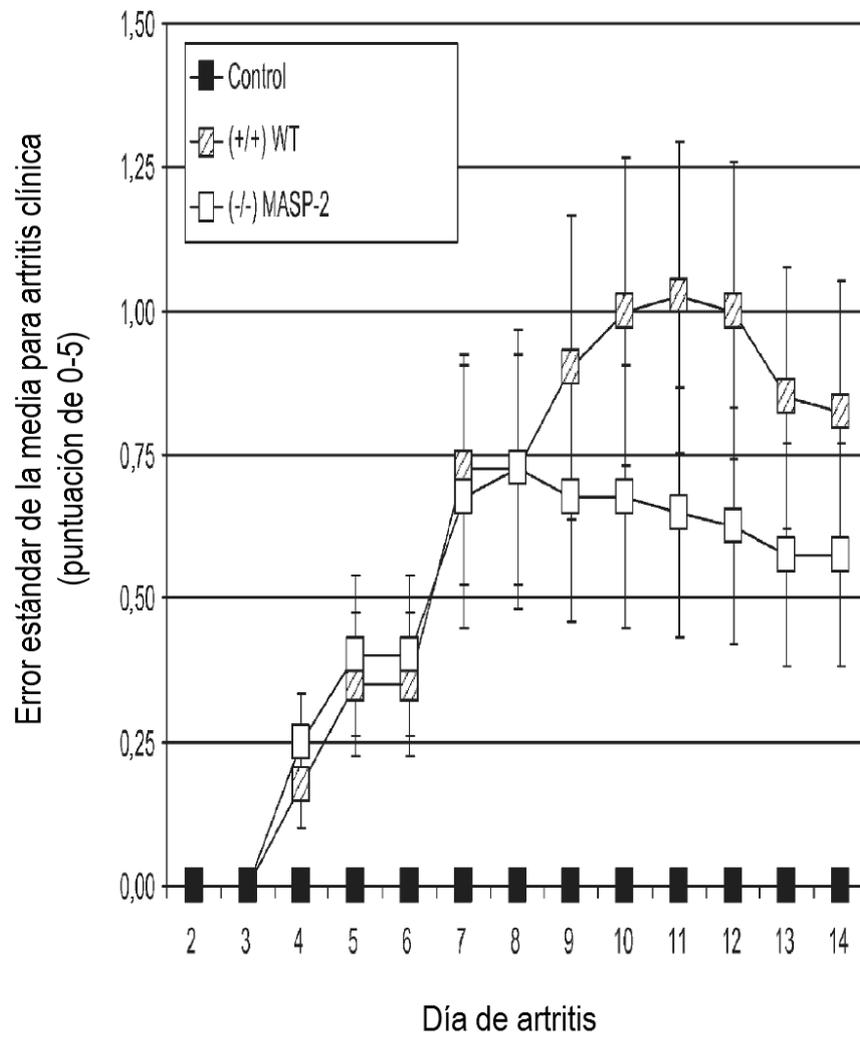


Fig.19.

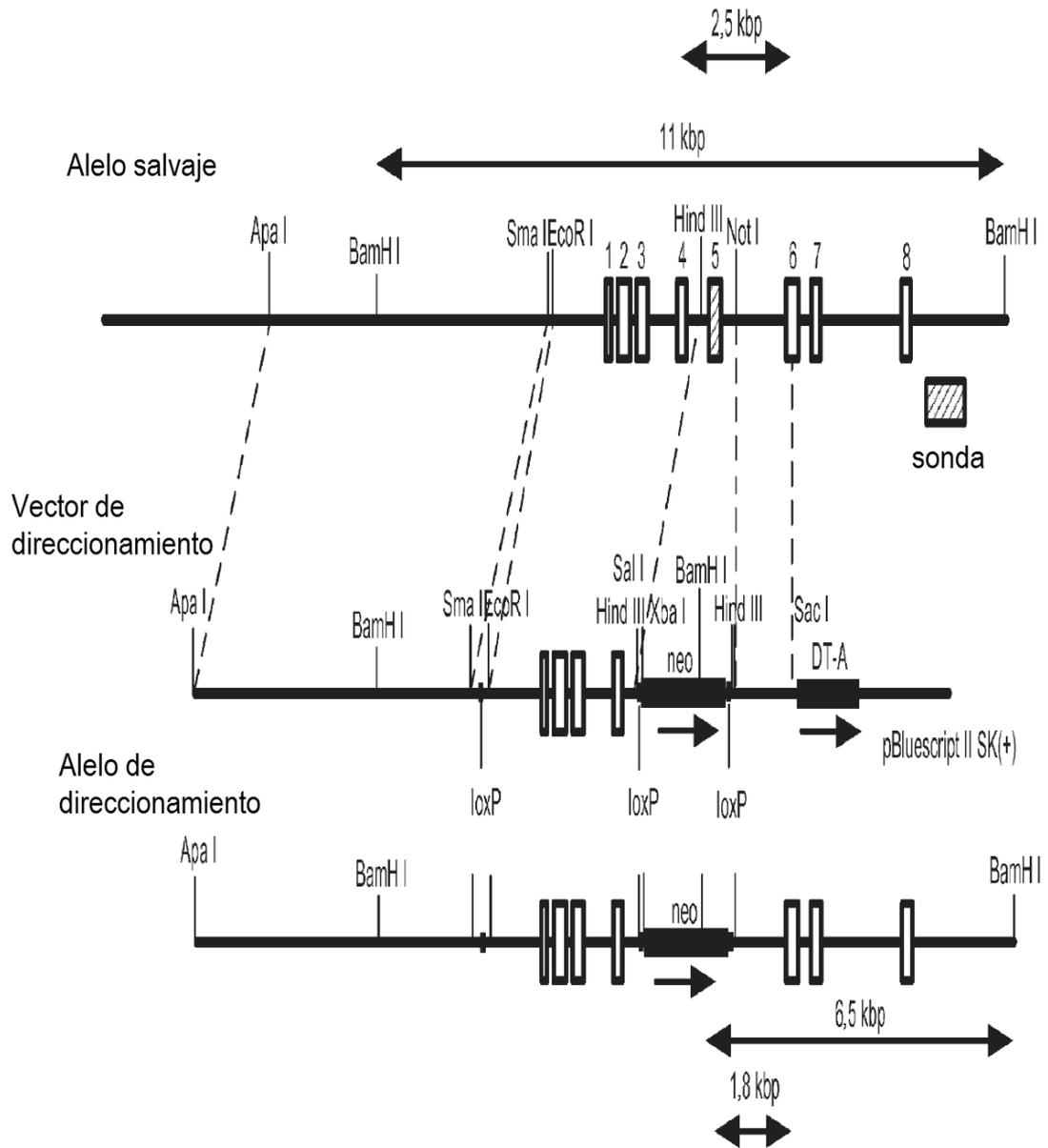


Fig.20A.

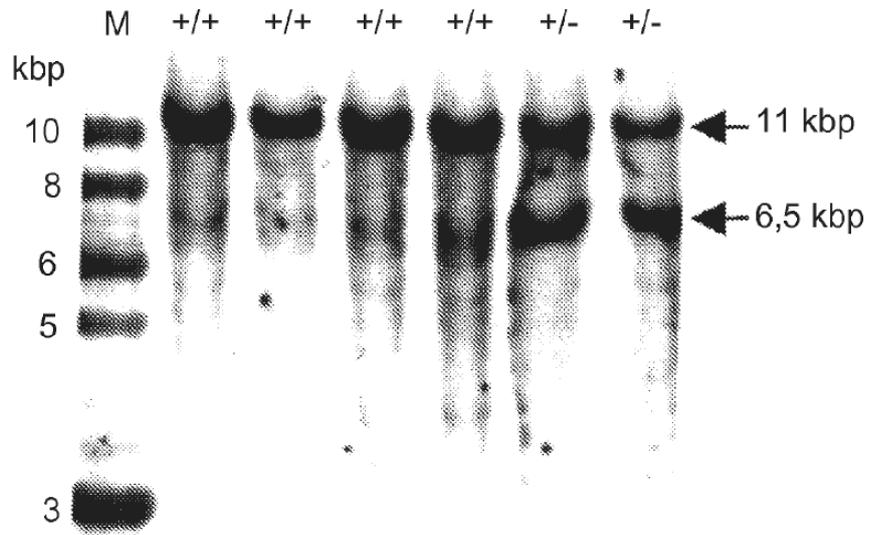


Fig.20B.

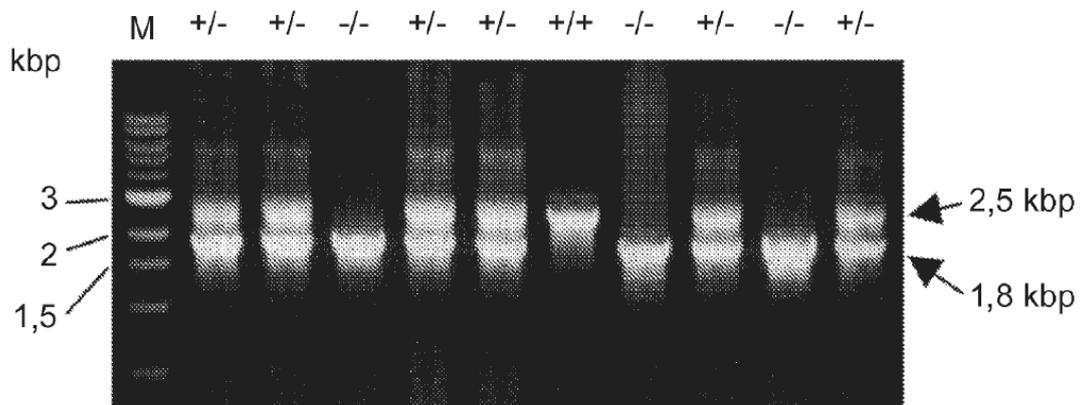


Fig.20C.

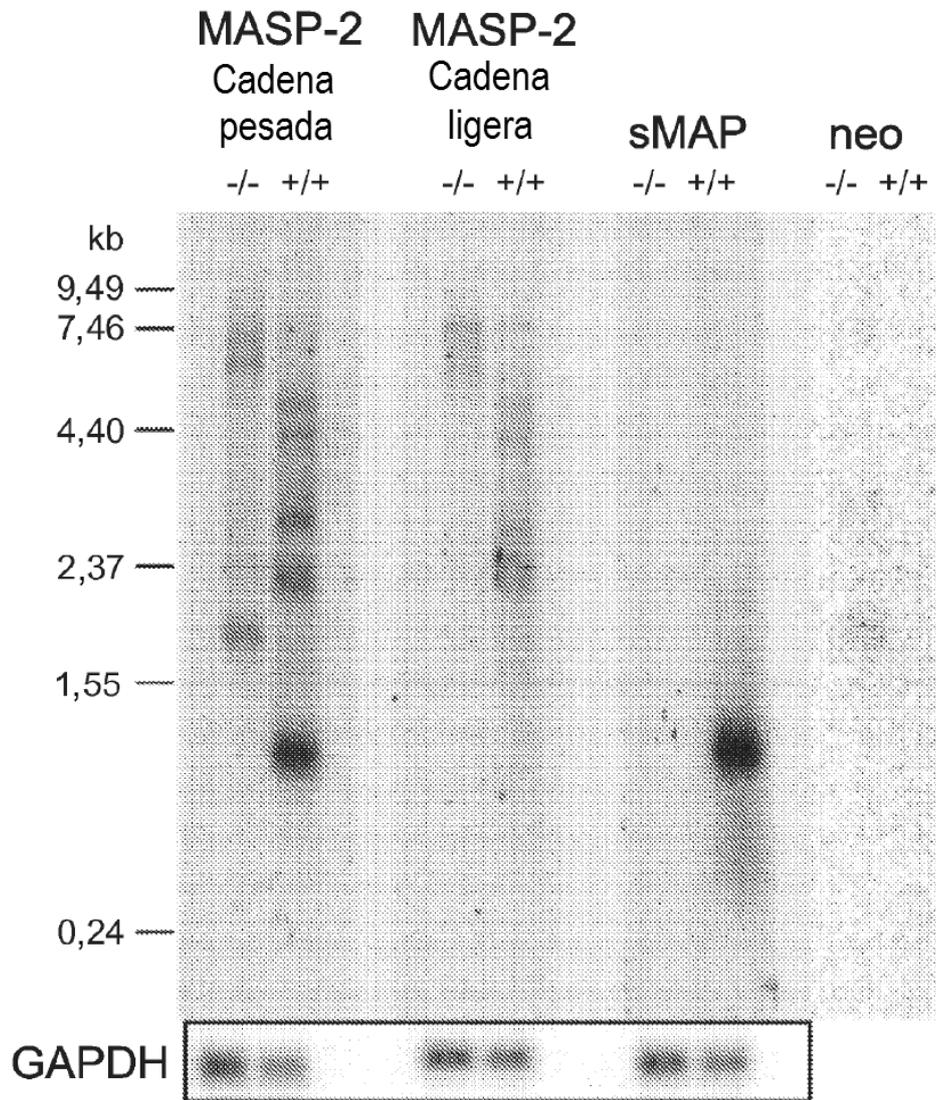


Fig.21A.

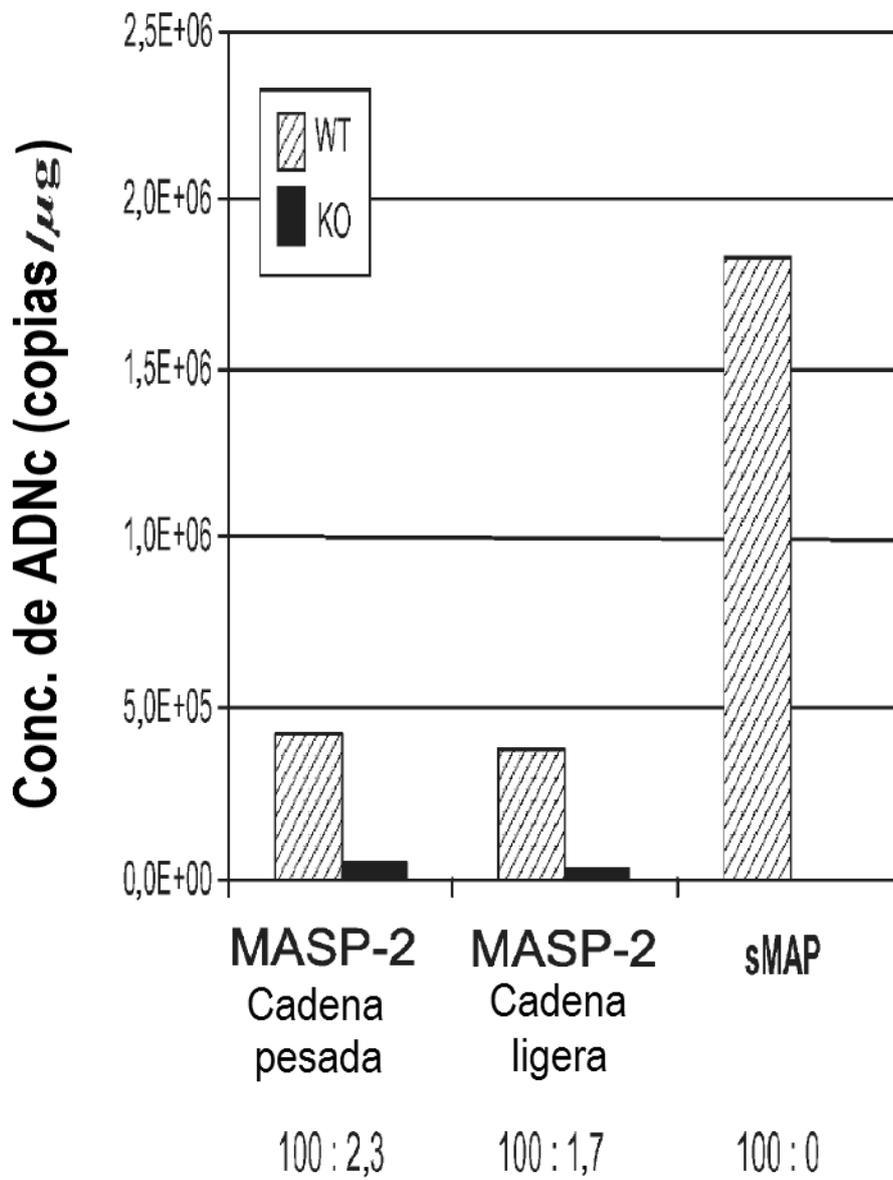


Fig.21B.

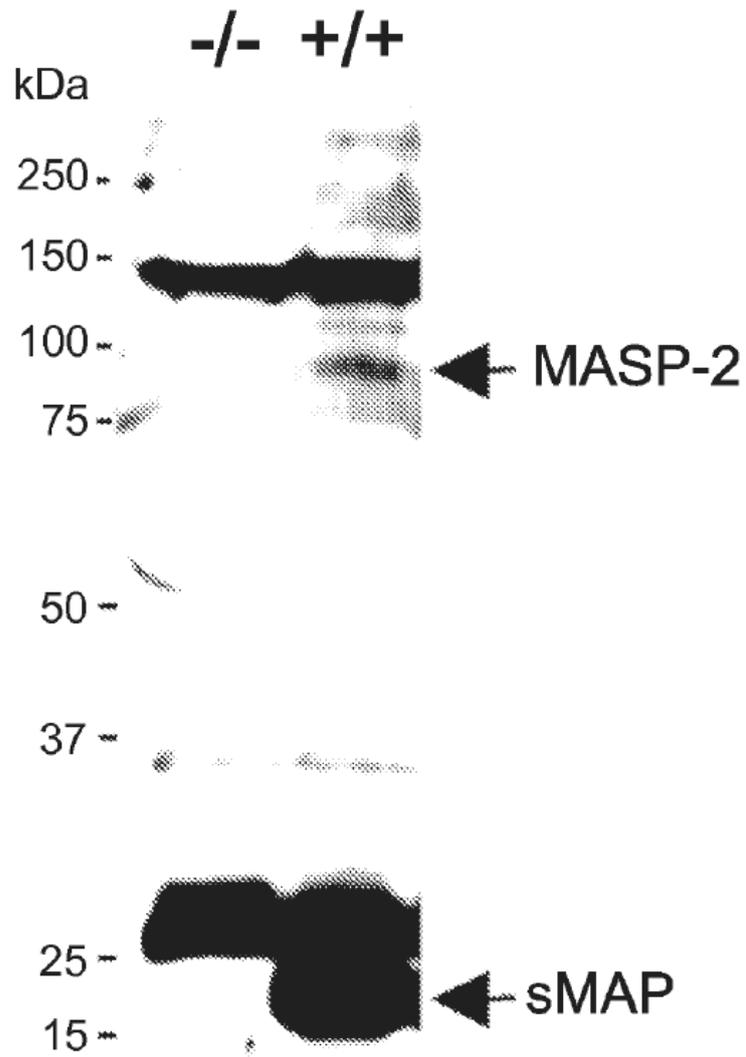


Fig.22A.

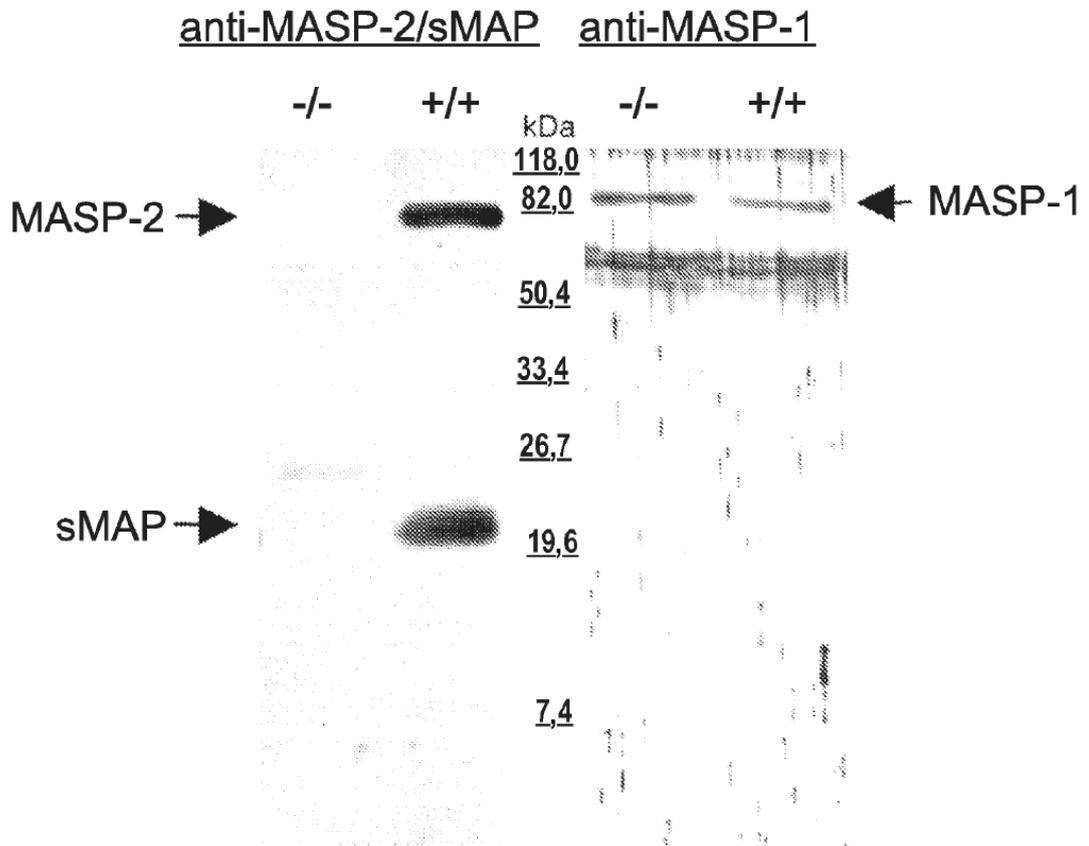


Fig.22B.

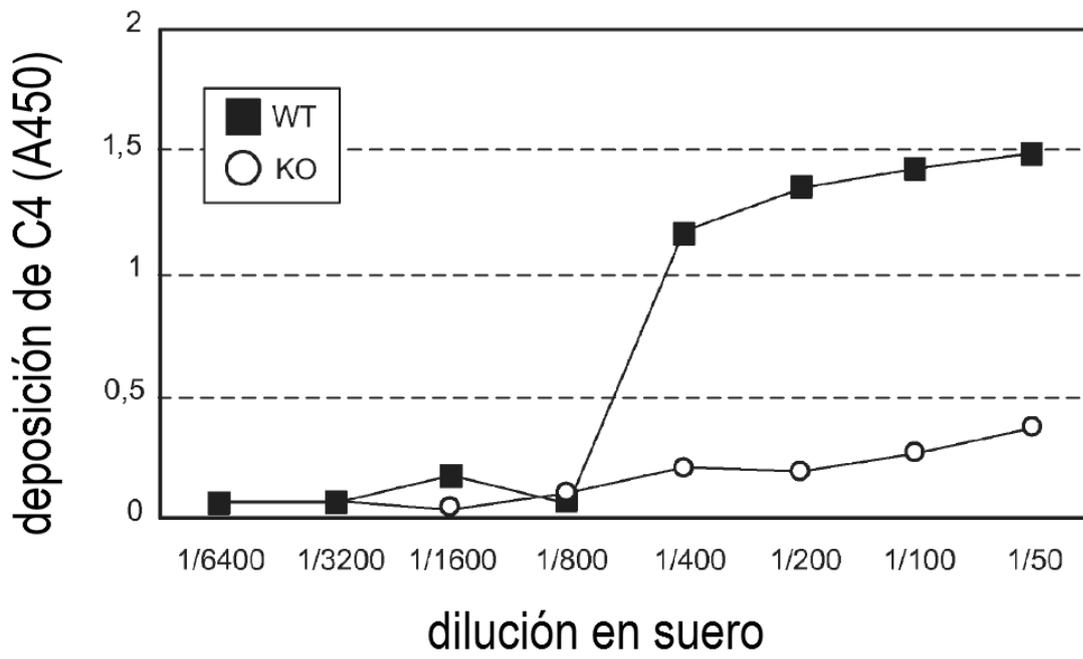


Fig.23A.

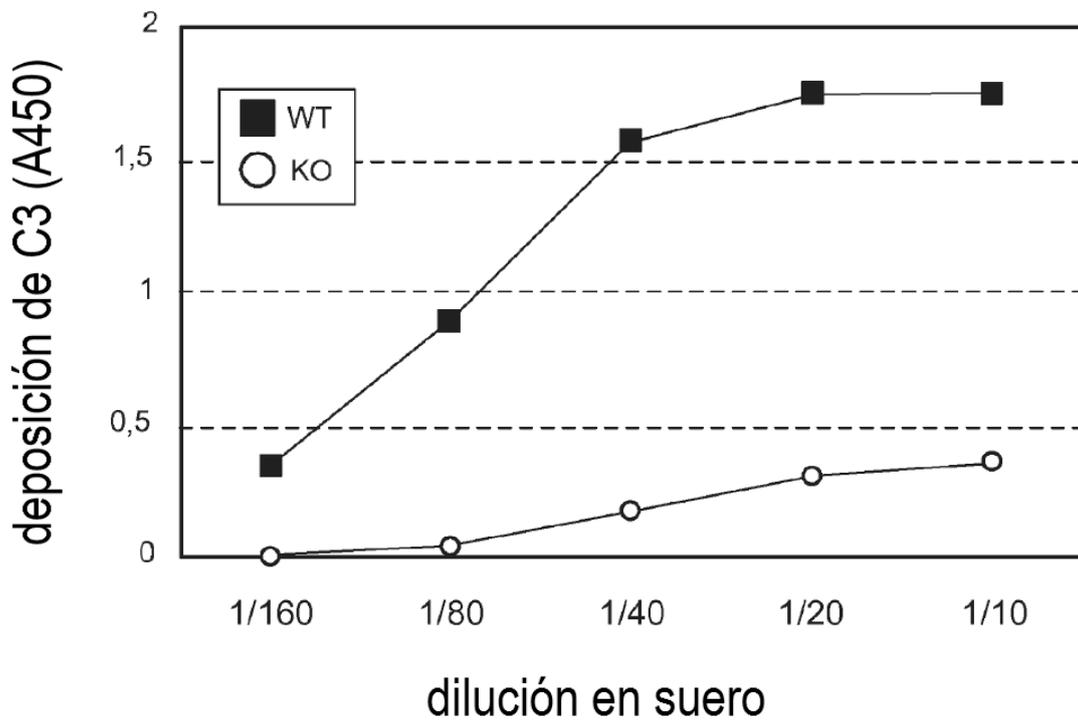


Fig.23B.

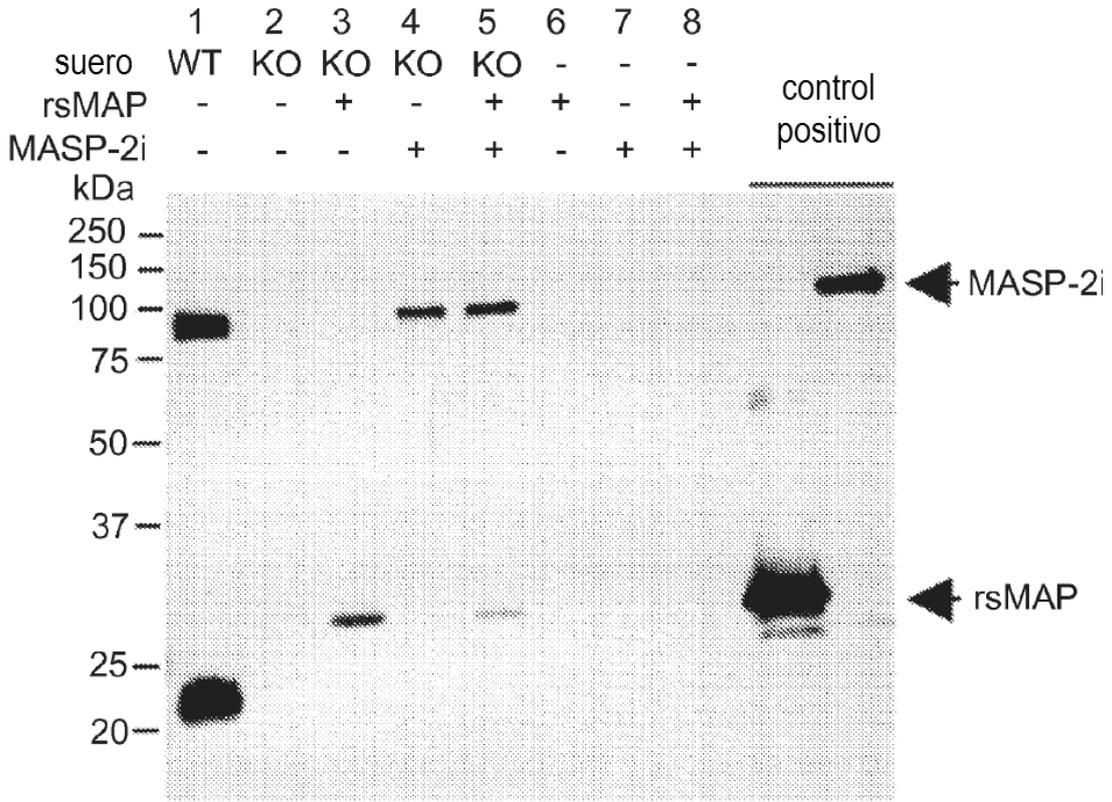


Fig.24A.

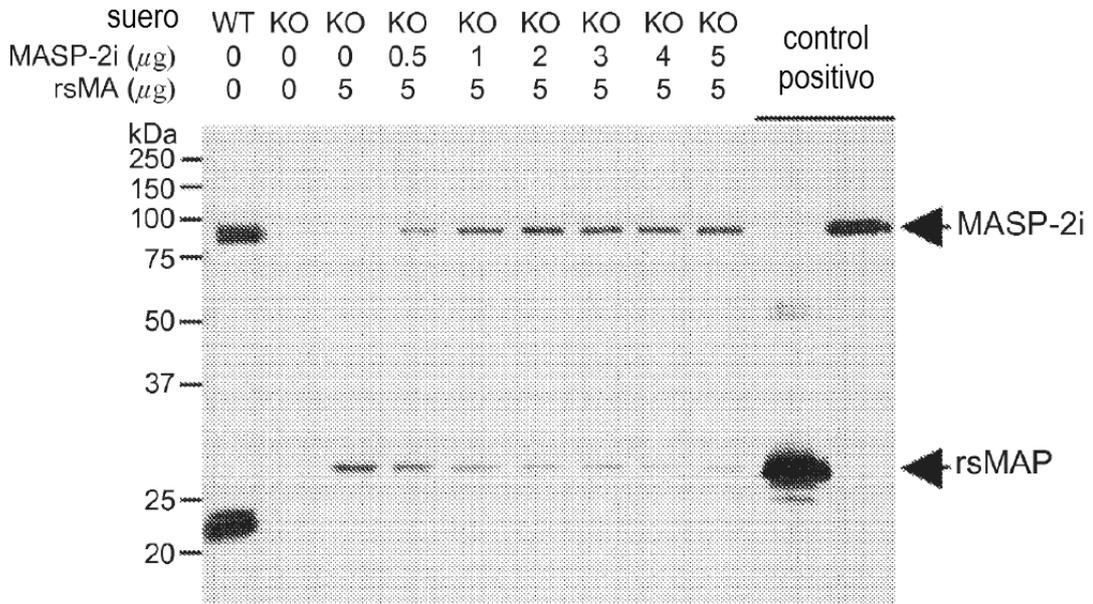


Fig.24B.

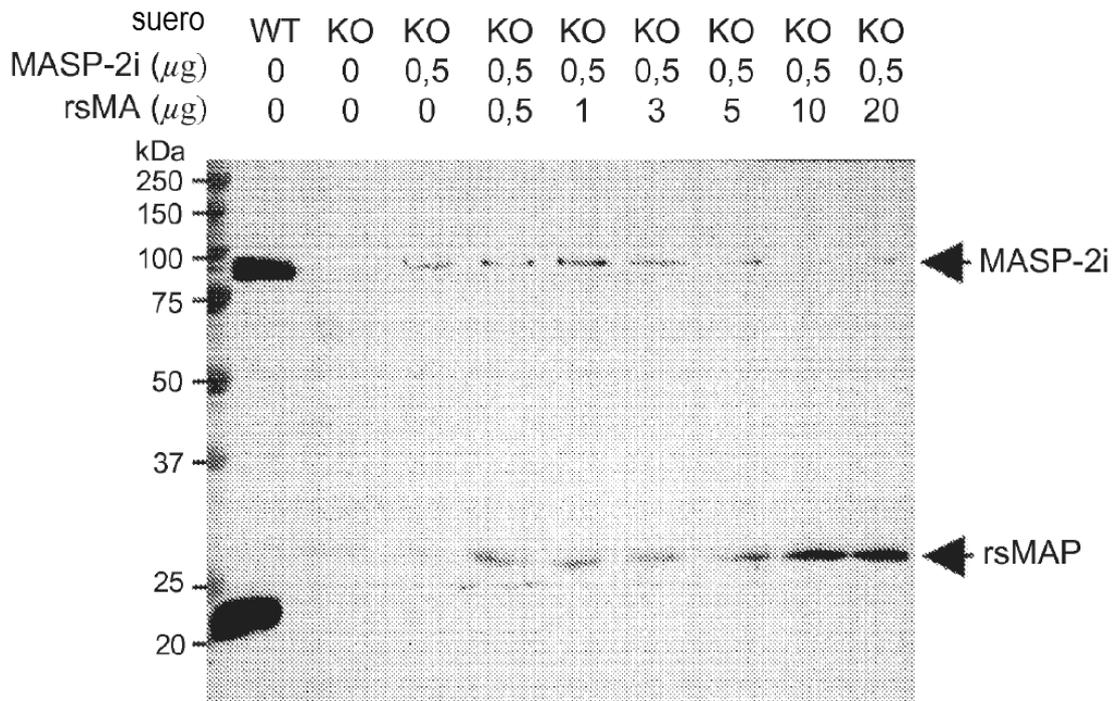


Fig.24C.

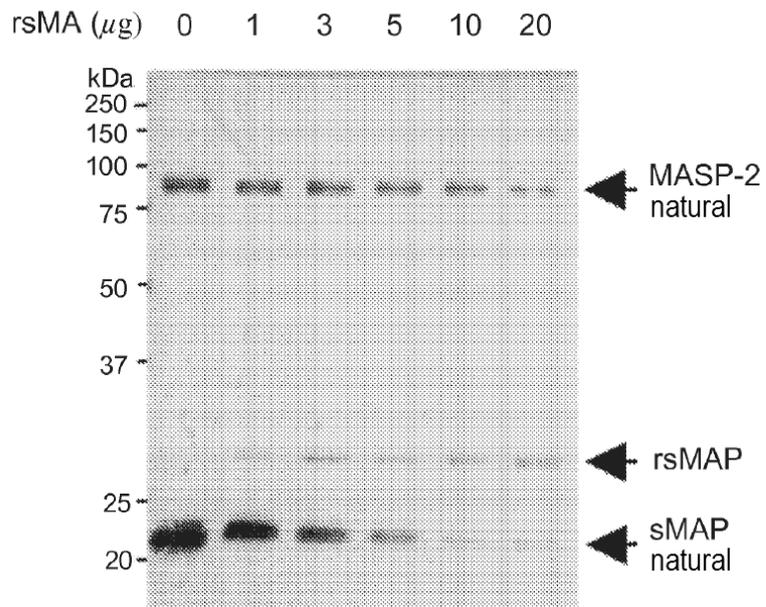


Fig.24D.

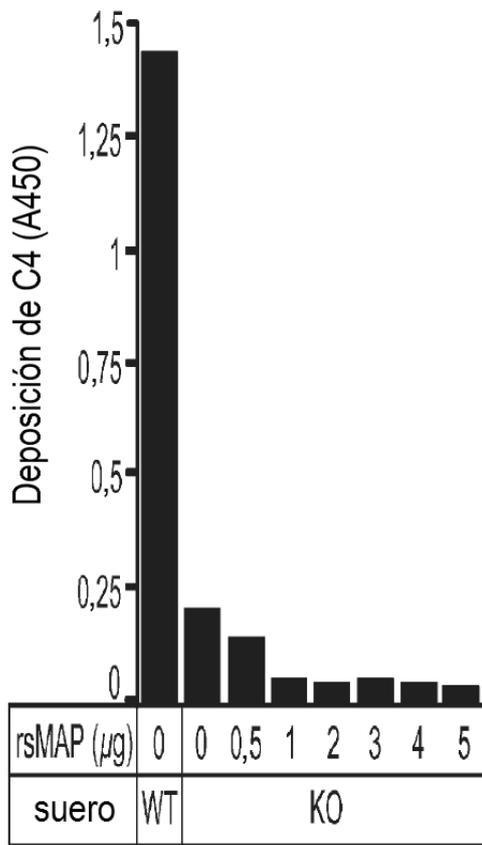


Fig.25A.

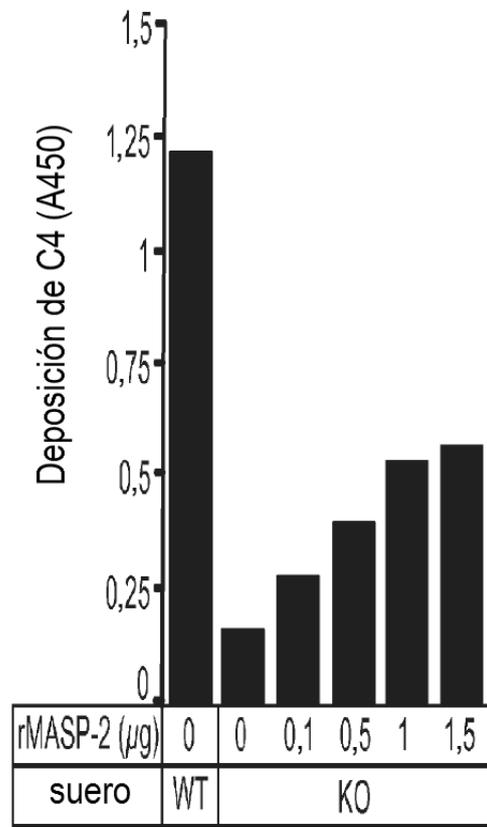


Fig.25B.

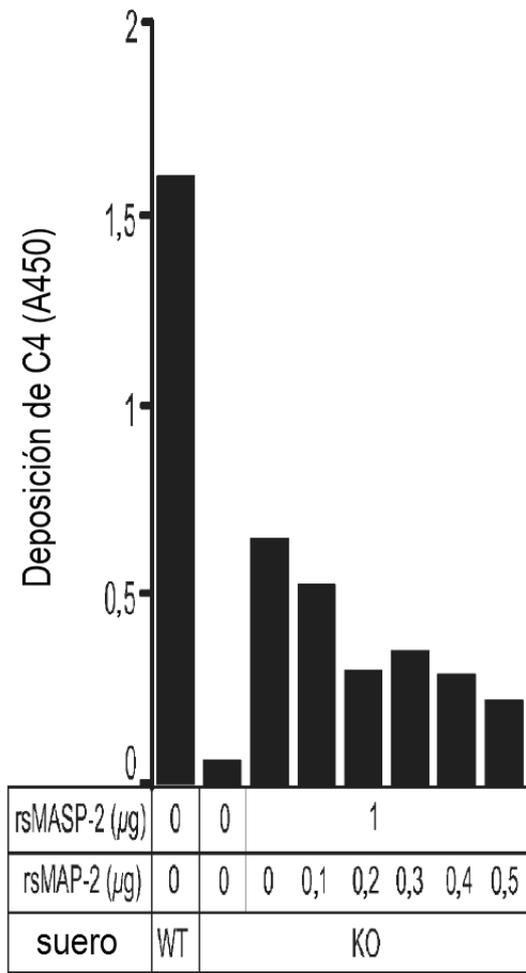


Fig.26A.

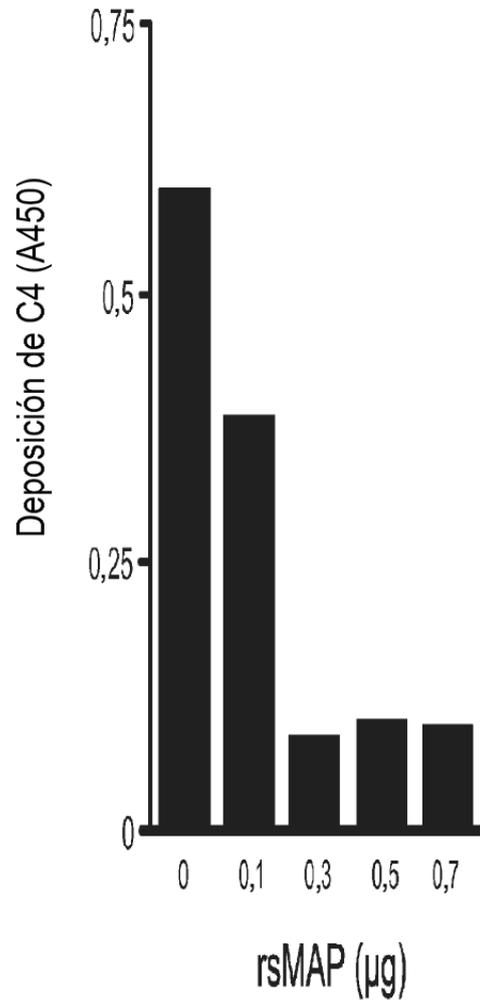


Fig.26B.

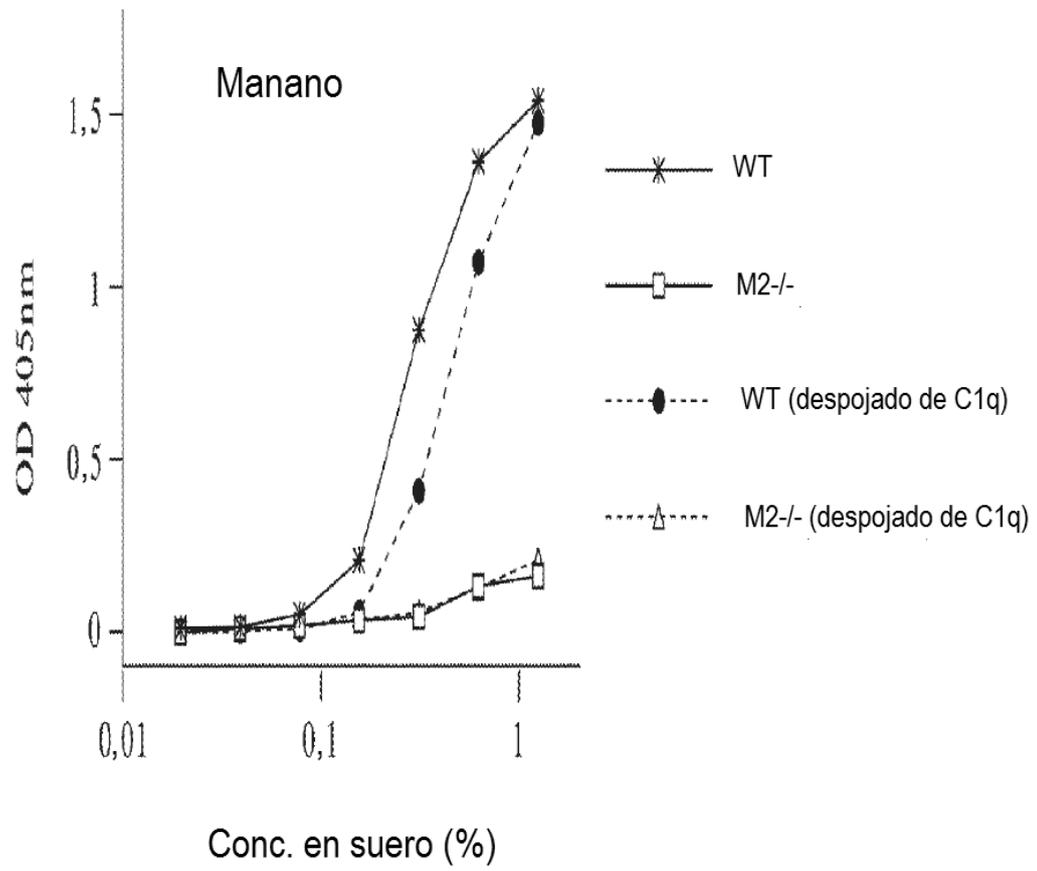


Fig.27A.

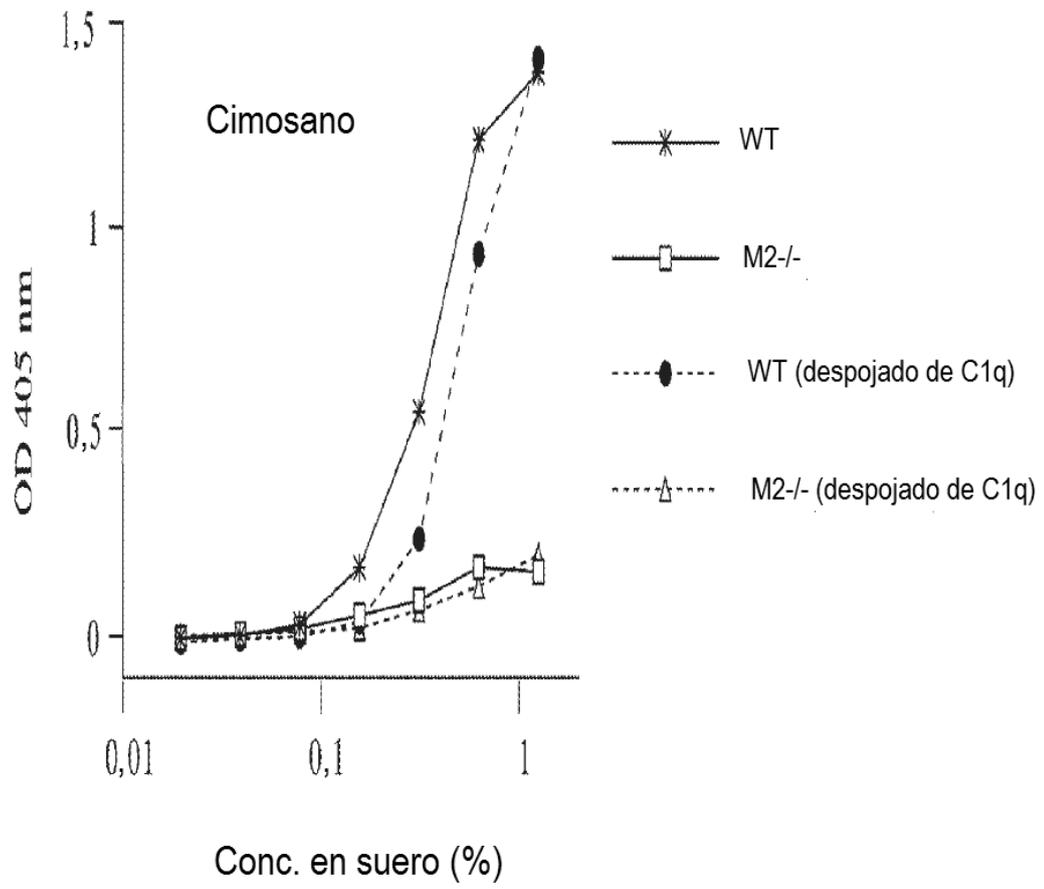


Fig.27B.

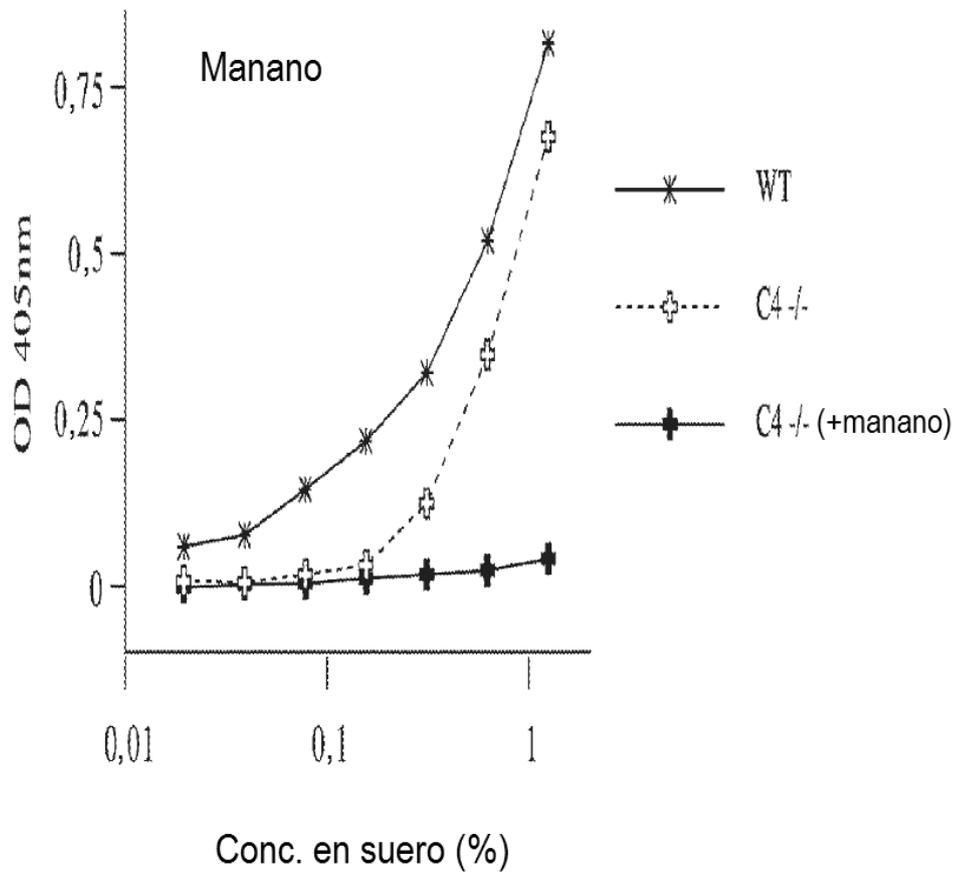


Fig.27C.