

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 497**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 38/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2005** **PCT/US2005/020647**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2005** **WO05123128**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2005** **E 05765604 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016** **EP 1753456**

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

30 Prioridad:

10.06.2004 US 578847 P

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

15.02.2017

73 Titular/es:

OMEROS CORPORATION (50.0%)
201 Elliott Avenue West
Seattle, WA 98119, US y
UNIVERSITY OF LEICESTER (50.0%)

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 601 497 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.* 15:417-431, 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 séptico, 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.* 262:7451-7454, 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-hidroxilo 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 carbohidrato que comúnmente decoran a microorganismos tales como bacterias, levadura, parásitos y ciertos virus.

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 glucoproteínas 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 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 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 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. Med.* 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 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 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 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. Med.* 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 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.
- 10 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-traduccion conocida como enlace tioéster. El grupo tioéster está compuesto por una glutamina cuyo grupo carbonilo terminal está unido al grupo sulfhidrido 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 C3 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.

15 **Compendio de la invención**

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que inhibe MASP-2 por unión específica a la SEC ID NO:6 para usar en el tratamiento de la degeneración macular asociada al envejecimiento, o la prevención o el tratamiento de una reacción inflamatoria debida a un trasplante de órganos o tejido.

- 20 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 puede inhibir 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.

El agente inhibidor de MASP-2 puede ser un anticuerpo anti-MASP-2 o su fragmento. El anticuerpo anti-MASP-2 puede tener la función efectora reducida. En algunas realizaciones, el agente inhibidor de MASP-2 es un péptido inhibidor de MASP-2 o un inhibidor de MASP-2 no peptídico.

- 30 También 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 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 proporcionan 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.

- 40 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.

- 45 En la presente memoria se describen métodos para el tratamiento de lesiones de reperusión por isquemia, tratando a un sujeto que experimenta una reperusión 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, 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.

- 50 En la presente memoria 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.

- 55 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

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 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.

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 antinmembrana 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.
- 10
- 15 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 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 soriásica, espondilitis anquilosante u otras espondiloartropatías y artropatías cristalinas o lupus eritematoso sistémico (SLE).
- 25 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 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, epidermolisis 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 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.).

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.
- 40
- 45 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 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 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 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. También se describen 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 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 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 MASP-19 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 en 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^{-/-}; y

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

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)
- 5 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)
- 10 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)
- 15 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
- TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLC GQ (péptido CUBI)
- SEC ID NO: 16 TFRSDYSN (núcleo de la región de unión a MBL)
- 20 SEC ID NO: 17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (región de unión a MBL) SEC ID NO: 18 IDECQVAPG (PÉPTIDO EGF)
- SEC ID NO: 19 ANMLCAGLESGGKDSCRGDSSGALV (núcleo de la región de unión a serina proteasa)
- INHIBIDORES DE PÉPTIDOS:
- SEC ID NO:20 ADNc de longitud total MBL
- 25 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 GKDGRDGTKEKGEPGQGLRGLQGPOGKLGPOG SEC ID NO:27 GAOGSOGKEKGAOGPQGPOGPOGKMGPKGEOGDO (h-ficolina humana)
- 30 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)
- 35 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'

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 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

CEBADORES DE CLONACIÓN:

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

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

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

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:

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

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

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

20 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

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

25 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

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

30 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

35 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.

I. Definiciones

40 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.

45 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.

- 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.
- 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.
- Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "agente inhibidor de MASP-2" se refiere a cualquier agente que inhibe o actúa 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. 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).
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 complementaridad del anticuerpo son de origen no humano.
- 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.
- 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.
- 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).

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 Ie, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys o Pro. Por aminoácido "hidrófilo" se entiende o bien Gly, Asn, Gln, 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 Gln. Por aminoácido "ácido" se entiende o bien Glu o Asp. Por aminoácido "básico" se entiende o bien Lys, Arg o His.

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 siguientes 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.

II. La vía alternativa, una nueva comprensión

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; Pangburn, 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.

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 opsonina 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 opsonina 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 morbilidad 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 (sCR1) 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 sCR1 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. Med.* 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 (sCR1) 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. Med.* 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 morbilidad resultante de complicaciones de I/R de miocardio. Dos de estos inhibidores, sCR1 (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 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 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 morbilidad postoperatoria.

Así, un aspecto de la invención se dirige 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 inhibitoras de MASP-2 de la presente invención adecuadamente comienzan inmediatamente después o lo más pronto posible después de un evento de isquemia y reperusión. En casos en los que la reperusión 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 reperusión. La administración se puede repetir periódicamente según lo determinado por el 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 reperusión (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).

Así, un aspecto de la invención está dirigido al 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 inhibidora 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 inhibidora de MASP-2 puede revestirse o incorporarse al stent.

Trasplante

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/reperfusión y posiblemente, por anticuerpos dirigidos contra el injerto (Baldwin, W.M., et al., *Springer Seminol 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.

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.

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; Nickleit, 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.

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.

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.

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 sCR1. 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, C1q 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 beneficiosos de la inhibición del complemento en la supervivencia, y los inventores creen que la inhibición de MASP-2 puede ser útil en el xenotrasplante.

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* (68):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.

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 alotéxico. 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.

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 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.

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.

Así, un aspecto de la invención se dirige a 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.

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).

Así, un aspecto de la invención proporciona 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

En un aspecto, la presente invención proporciona 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. Al poner en práctica este aspecto de la invención, 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.

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).

Según la presente invención, 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 este aspecto de la presente invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-MASP-2 y sus fragmentos, péptidos inhibidores de MASP-2, moléculas pequeñas, receptores solubles de MASP-2 e 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.

En algunas realizaciones, 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.

En una realización, un agente inhibidor de MASP-2 útil en los métodos de la invención 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. En otra realización, un agente inhibidor de MASP-2 se une 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.

El polipéptido de MASP-2 exhibe una estructura molecular similar a MASP-1, MASP-3, y C1r y C1s, las proteasas del sistema del complemento C1. 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 *MA SP 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") (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).

Los expertos en la técnica reconocerán que las secuencias descritas 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.

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 C1r/C1s/de erizo de mar Vegf/ósea N-terminal (CUBI) (aa 1-121 de SEC ID NO:6), un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico (aa 122-166), un segundo dominio CUBI (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 *MA SP 2* resultante en MAP19 que se muestra en la FIGURA 3B. MAP19 es una proteína no enzimática que contiene la región CUBI-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 Ca^{2+} 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.* 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M. et al., *J. Exp. Med.* 775:1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 168:3502-3506, 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.* 166:5068, 2001). Se ha demostrado también que los dominios CUBIEGFCUBII 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

En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el agente inhibidor de MASP-2 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 multispecíficos, 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. 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
MA SP-2 recombinante	Policlonal de rata	Peterson, S.V., et al., <i>Mol. Immunol.</i> 37:803-811, 2000

ANTÍGENO	TIPO DE ANTICUERPO	REFERENCIA
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
MASP-2	MoAb de ratón	Peterson, S.V., et al., <i>Mol. Immunol.</i> 35:409

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* 332:738-740 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'l 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.* 148:3062-3071, 1992; van de Winkel, J.G., et al., *Immunol. Today* 14:215-221, 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* 16:535-539, 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 GKDSRCGDAGGALVFL	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 ANMLCAGLESGGKDSRCGDSSGALY	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 epítipo 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).

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 inmunsorbentes 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.* 51:660-672, 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.

Anticuerpos quiméricos/humanizados

Los anticuerpos monoclonales útiles en el método de la invención 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.

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.* 12:437, 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.

Fragmentos de inmunoglobulina

Los agentes inhibidores de MASP-2 útiles en el método de la 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 multispecíficos 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 Fcγ. Hay varios métodos mediante los cuales uno puede producir un MoAb que evita las interacciones con el receptor de Fcγ. 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 $\gamma 4$ 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 Fv de las cadenas pesada y ligera están conectadas. Los fragmentos Fv pueden estar conectados por un enlazador peptídico para formar una proteína de unión al antígeno monocatenaria (scFv). 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 scFv 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.

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.).

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).

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.

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 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 α -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.

5 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 10 500 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.

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 C5a_{desArg} son rápidamente aclarados por la unión a los receptores de la superficie celular y en consecuencia están presentes en concentraciones muy reducidas, mientras que C3a_{desArg} 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 calicreína; antagonistas de los receptores de taquinina, incluidos antagonistas de subtipo de receptores neuroquinina₁ 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 eicosanoides 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 (sCR1). 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 sCR1 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* 11:450-6, 1990; Marino I.R., et al., *Transplant Proc.* 1071-6, 1990; Johnstone, P.S., et al., *Transplantation* 54:573-6, 1992). El uso de sCR1 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 reumatoidea), 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.

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.

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.

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.

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

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

- 5 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.
- 10 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.

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* 9:271, 1989; Hori, R., et al., *Pharm. Res.* 6:813, 1989; Yamakawa, I., et al., *J. Pharm. Sci.* 79:505, 1990; Yoshihiro, I., et al., *J. Controlled Release* 10:195, 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* 12:235, 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.

Las composiciones de 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 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

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 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.

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 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 infle, 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 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.

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

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, 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 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, nitrilo, 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.* 411:77, 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 láctico)).

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.

Los métodos y composiciones 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

Este ejemplo describe la generación de una cepa de ratón deficiente de MASP-2 (MASP-2^{-/-}) pero suficiente de MAP19 (MAP19^{+/+}).

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.

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 MAP19 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 MAP19, 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.

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:

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 C1. 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:

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 (Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_3 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);

5 c. LTA (μg /pocillo en 100 μl tampón de recubrimiento o 2 μg /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 μg /pocillo en 100 μl tampón de recubrimiento)

f. 100 μl /pocillo de *S. aureus* DSM20233 fijada a formalina ($\text{OD}_{550}=0,5$) en tampón de recubrimiento.

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

10 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, NaN_3 1,5 mM, pH 7,4) durante 1-3 horas; luego lavando las placas 3X con TBS/tween/ Ca^{2+} (TBS con 0,05% Tween 20 y CaCl_2 5 mM, MgCl_2 1 mM, pH 7,4).

15 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 4°C. Los pocillos que recibieron solamente tampón se usaron como controles negativos.

20 5) Después de la incubación durante la noche a 4°C, las placas se lavaron 3X con TBS/tween/ Ca^{2+} . C4 humano (100 μl /pocillo de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diluido en BBS (barbital 4 mM, NaCl 145 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 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/ Ca^{2+} .

6) Se detectó la deposición de C4b con un C4c antihumano de pollo conjugado a fosfatasa alcalina (diluido 1:1000 en TBS/tween/ Ca^{2+} , 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/ Ca^{2+} .

25 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.

30 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.

35 Ensayo de deposición de C3b:

1) Se recubren placas de microtitulación Nunc Maxisorb (Maxisorb, Nunc, cat. No. 442404, Fisher Scientific) con 1 μg /pocillo manano (M7504 Sigma) o cualquier otro ligando diluido en tampón de recubrimiento (Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_3 35 mM, pH 9,6) y se incuba durante toda la noche a 4°C.

40 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, NaN_3 1,5 mM, pH 7,4) durante 1-3 horas.

3) Las placas se lavan en TBS/tw/ Ca^{++} (TBS con 0,05% Tween 20 y CaCl_2 5 mM) y se añade BBS diluido a las muestras de suero (barbital 4 mM, NaCl 145 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 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 C1q IgG antihumano de conejo (Dako, Glostrup, Dinamarca), de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

4) Después de incubar durante toda la noche a 4°C 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-

50

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 incubaba 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 substituyó 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, MASP19+/+ 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 siguiente 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.* 165:2637-2642, 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* 19:4485-90, 1991; Kaufman, *Methods in Enzymology*, 185:537-66 (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 'GAGGTGACGCAGGAGGGGCATTAGTGTTT 3' (SEC ID NO: 64)

5' CTAGAAACACTAATGCCCTCCTGCGTCACCTCTGCA 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*1 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

- 5 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
- 10 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'-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 'CGGGATCCATGA GGCTGCTGACCCT C-3' (SEC ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGGCTGCAT A (SEC ID NO:35)
SEC ID NO:9 CUBIEGF (aa 1-166 de SEC ID NO:6)	5 'CGGGATCCATGA GGCTGCTGACCCT C-3' (SEC ID NO:34)	5 'GGA ATTCCTAC AGGGCGC T-3' (SEC ID NO:36)
SEC ID NO: 10 CUBIEGFCUBII (aa 1-293 de SEC ID NO:6)	5 'CGGGATCCATGA GGCTGCTGACCCT C-3' (SEC ID NO:34)	5 'GG AATTCCTAGTAGTGGA T 3' (SEC ID NO:37)
SEC ID NO:4 MASP-2 humana	5'ATGAGGCTGCTG ACCCTCCTGGGCC 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'GTGCCCCTCCTGCGTCAC CTCTG 3' (SEC ID NO: 57) hMASP-2_ala_inverso
SEC ID NO:50 ADNc de MASP-2 murina	5'ATGAGGCTACTC ATCTTCCTGG3' (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 GGGGGG 3' (SEC ID NO: 61) mMASP-2_ala_inverso

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

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-2A recombinante promedió en aproximadamente 1,5 mg/litro de medio de cultivo para cada una de las tres especies.

25 Purificación de la proteína MASP-2A: 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.

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) (provistas por Jadwiga Chroboczek, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, Francia) se mantienen en medio TC100 (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 bácmido 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, hidrocloreto 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 1,2 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, hidrocloreto de trietanolamina 50 mM, pH 7,4 y se aplican a una columna TSK G3000 SWG (7,5 x 600 mm) (Tosohas, 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-2A de rata o humano en PBS y se fusionan 4 días después.

- 5 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 µl de la suspensión en medio Iscove (Gibco, Grand Island, N.Y.), enriquecido con suero bovino fetal al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, hipoxantina 0,1 mM, aminopterina 0,4 µM y timidina 16 µM.
- 10 Se añaden 200 µl 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.

- 15 Ensayo de ELISA: Pocillos de placas de microensayo Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.) se recubren añadiendo 50 µl 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 µl 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 µl de sobrenadantes de cultivo de cada pocillo de fusión y se mezclan con 50 µl 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 µl 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.).
- 20
- 25

Ensayo de unión a MASP-2:

- 30 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.

- 35 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 µl/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 µl 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 µl de ácido fosfórico 1M, y la placa se lee a 450 nm en una lectora de microplacas (SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).
- 40
- 45

- 50 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.

- 55 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, MAP19⁺ 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, MAP19⁺, 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:

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 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 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 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.

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.

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 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., *Scand. J. Immunol.* 35:539-549, 1992). Para la clonación del gen V_K, se prepara ADNc bicatenario usando un cebador NotI-MAK1 (5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGCTTT-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 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 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 MAGI (5'-CGCGGCCGCTGCTCAGAGTGTAGA-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. El producto digerido se usa como molde en PCR con el oligonucleótido AD1 y MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGGAAATA-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-MAGI 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 κ humanos, respectivamente, para dar pSV2neo V_H -huC γ 1 y pSV2neo V_K -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_K (5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACAACCTCT-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 pSV2neo V_H -huC γ 1 y pSV2neo V_K -huC γ 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-idiotípico de ratón a MoAb de MASP-2. Un MoAb de MASP-2 anti-idiotípico se puede preparar inmunizando a ratones con MoAb anti-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

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.

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 triptico, 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).

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.

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, C1r y C1s). 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 Immunsytem, Uppsala, Suecia) y se mide usando el sustrato colorimétrico fosfato de p-nitrofenilo.

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.

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-/-.

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 humano 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 C1q 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.

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/- despojado 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.

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 activación adicional del complemento, y las muestras se enfrían inmediatamente a 5°C. Las muestras luego se conservan a -70°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.

Los Ejemplos 14-16 y 18-23 son ejemplos de referencia incluidos con fines informativos.

Ejemplo 14

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. 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.

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.

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.

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.

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

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 accidentes cerebrovasculares.

Ejemplo 15

- 5 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 µl 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, ½ 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

- 35 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).

40 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.

50 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 µl) 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 incuban 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.

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.

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*.

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.

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.

Métodos: Se anestesian ratones MASP-2^{-/-} y/o MASP-2^{+/+}. El riñón izquierdo del donante se diseca 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.

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).

Antecedentes y fundamentos: La artritis inducida por colágeno (CIA) representa una poliartitis 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.

- 5 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 DBA/1LacJ.

- 10 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.

- 15 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 MASP-2^{-/-}, hMASP-2^{+/+} DBA/1LacJ CIA con genes inactivados.

20 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.

- 25 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 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.

- 35 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 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.

- 40 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 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.

50 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).

- 55 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; Asimakopoulou, G., *Perfusion* 14:269-77, 1999). También

se ha demostrado que la vía del complemento alternativa cumple una función predominante en la activación del 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. Med.* 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*.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Omeros Corporation
Schwaeble, H.W.
Stover, C.M.
5 Tedford, C. E.
Parent, J.B.
Fujita, T.

<120> Métodos para tratar afecciones asociadas con la activación del complemento dependiente de MASP-2

<130> OMER-1-25400

<150> US 60/578,847

<151> 10-06-2004

<160> 65

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 725

<212> ADN

<213> Homo sapien

<220>

<221> CDS

<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

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

```

ES 2 601 497 T3

```

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 cctccctgg agctccggcc tgcccagcag gtcagaagcc agagccagcc 634

tgctggcctc agctccgggt tgggctgaga tggctgtgcc ccaactccca ttcaccacc 694

atggacccaa taataaacct ggccccaccc c 725

```

<210> 2
 <211> 185
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapien

```

<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

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

ES 2 601 497 T3

<211> 170
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

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> ADN
 <213> Homo sapien

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

<400> 4

ES 2 601 497 T3

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 tgc 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	70
60 65	
gac ttc gtc aag ctg agc tgc 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 Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe	105
95 100	
tac tgc 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	
cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca ggc	531
His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly	170
155 160	
tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gcc ctg tgc tcc ggc	579
Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly	185
175 180	
cag gtc ttc acc cag agg tct ggg gag ctc agc agc cct gaa tac cca	627
Gln Val Phe Thr Gln Arg Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro	200
190 195	
cgg ccg tat ccc aaa ctc tcc agt tgc act tac agc atc agc ctg gag	675
Arg Pro Tyr Pro Lys Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu	215
205 210	
gag ggg ttc agt gtc att ctg gac ttt gtg gag tcc ttc gat gtg gag	723
Glu Gly Phe Ser Val Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu	230
220 225	

ES 2 601 497 T3

aca cac cct gaa acc ctg tgt ccc tac gac ttt ctc aag att caa aca Thr His Pro Glu Thr Leu Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr 235 240 245 250	771
gac aga gaa gaa cat ggc cca ttc tgt ggg aag aca ttg ccc cac agg Asp Arg Glu Glu His Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg 255 260 265	819
att gaa aca aaa agc aac acg gtg acc atc acc ttt gtc aca gat gaa Ile Glu Thr Lys Ser Asn Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu 270 275 280	867
tca gga gac cac aca ggc tgg aag atc cac tac acg agc aca gcg cag Ser Gly Asp His Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln 285 290 295	915
cct tgc cct tat ccg atg gcg cca cct aat ggc cac gtt tca cct gtg Pro Cys Pro Tyr Pro Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val 300 305 310	963
caa gcc aaa tac atc ctg aaa gac agc ttc tcc atc ttt tgc gag act Gln Ala Lys Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr 315 320 325 330	1011
ggc tat gag ctt ctg caa ggt cac ttg ccc ctg aaa tcc ttt act gca Gly Tyr Glu Leu Leu Gln Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala 335 340 345	1059
gtt tgt cag aaa gat gga tct tgg gac cgg cca atg ccc gcg tgc agc Val Cys Gln Lys Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser 350 355 360	1107
att gtt gac tgt ggc cct cct gat gat cta ccc agt ggc cga gtg gag Ile Val Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu 365 370 375	1155
tac atc aca ggt cct gga gtg acc acc tac aaa gct gtg att cag tac Tyr Ile Thr Gly Pro Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr 380 385 390	1203
agc tgt gaa gag acc ttc tac aca atg aaa gtg aat gat ggt aaa tat Ser Cys Glu Glu Thr Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr 395 400 405 410	1251
gtg tgt gag gct gat gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa aaa tca Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser 415 420 425	1299
ctc cca gtc tgt gag cct gtt tgt gga cta tca gcc cgc aca aca gga Leu Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly 430 435 440	1347
ggg cgt ata tat gga ggg caa aag gca aaa cct ggt gat ttt cct tcg Gly Arg Ile Tyr Gly Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp 445 450 455	1395
caa gtc ctg ata tta ggt gga acc aca gca gca ggt gca ctt tta tat Gln Val Leu Ile Leu Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr 460 465 470	1443
gac aac tgg gtc cta aca gct gct cat gcc gtc tat gag caa aaa cat Asp Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His 475 480 485 490	1491
gat gca tcc gcc ctg gac att cga atg ggc acc ctg aaa aga cta tca Asp Ala Ser Ala Leu Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser 495 500 505 510	1539

ES 2 601 497 T3

495	500	505	
cct cat tat aca caa gcc tgg tct gaa gct gtt ttt ata cat gaa ggt Pro His Tyr Thr Gln Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly 510 515 520			1587
tat act cat gat gct ggc ttt gac aat gac ata gca ctg att aaa ttg Tyr Thr His Asp Ala Gly Phe Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu 525 530 535			1635
aat aac aaa gtt gta atc aat agc aac atc acg cct att tgt ctg cca Asn Asn Lys Val Val Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro 540 545 550			1683
aga aaa gaa gct gaa tcc ttt atg agg aca gat gac att gga act gca Arg Lys Glu Ala Glu Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala 555 560 565 570			1731
tct gga tgg gga tta acc caa agg ggt ttt ctt gct aga aat cta atg Ser Gly Trp Gly Leu Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met 575 580 585			1779
tat gtc gac ata ccg att gtt gac cat caa aaa tgt act gct gca tat Tyr Val Asp Ile Pro Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr 590 595 600			1827
gaa aag cca ccc tat cca agg gga agt gta act gct aac atg ctt tgt Glu Lys Pro Pro Tyr Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys 605 610 615			1875
gct ggc tta gaa agt ggg ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga Ala Gly Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly 620 625 630			1923
ggg gca ctg gtg ttt cta gat agt gaa aca gag agg tgg ttt gtg gga Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly 635 640 645 650			1971
gga ata gtg tcc tgg ggt tcc atg aat tgt ggg gaa gca ggt cag tat Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr 655 660 665			2019
gga gtc tac aca aaa gtt att aac tat att ccc tgg atc gag aac ata Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile 670 675 680			2067
att agt gat ttt taa cttgogtgtc tgcagtcgaag gattottcat ttttagaaat Ile Ser Asp Phe 685			2122
gcctgtgaag accttggcag cgacgtggct cgagaagcat tcatcattac tgtggacatg			2182
gcagttgttg ctccacccaa aaaaacagac tccaggtgag gctgctgtca tttctccact			2242
tgccagttaa attccagcct taccattga ctcaagggga cataaaccac gagagtgaca			2302
gtcatotttg cccacccagt gtaatgtcac tgctcaaatt acatttcatt accttaaaaa			2362
gccagtctct tttcatactg gctgttggca tttctgtaaa ctgcctgtcc atgctctttg			2422
tttttaaaact tggttatt gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa			2460

<210> 5

<211> 686

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 5

ES 2 601 497 T3

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

ES 2 601 497 T3

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 Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Tyr Pro Met
 290 295 300
 Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val Gln Ala Lys Tyr Ile Leu
 305 310 315 320
 Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Leu Gln
 325 330 335
 Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly
 340 345 350
 Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser Ile Val Asp Cys Gly Pro
 355 360 365
 Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro Gly
 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 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

ES 2 601 497 T3

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

<210> 6

<211> 671

5 <212> PRT

<213> Homo sapien

<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

10

ES 2 601 497 T3

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
 Arg Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys
 180 185 190
 Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val
 195 200 205
 Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr
 210 215 220
 Leu Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His
 225 230 235 240
 Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser
 245 250 255
 Asn Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr
 260 265 270
 Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Tyr Pro
 275 280 285
 Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val Gln Ala Lys Tyr Ile
 290 295 300
 Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Leu
 305 310 315 320
 Gln Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp

ES 2 601 497 T3

325	330	335
Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser Ile Val Asp Cys Gly		
340	345	350
Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro		
355	360	365
Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr		
370	375	380
Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp		
385	390	395
Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Glu		
405	410	415
Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly		
420	425	430
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
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
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

ES 2 601 497 T3

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> ADN

<213> Homo sapien

<400> 7

cctgtcctgc ctgcctggaa ctctgagcag gctggagtca tggagtcatg tcccagaatc	60
ccagagtcag ggaggctggg ggcaggggca ggtcactgga caaacagatc aaaggtgaga	120
ccagcgtagg actgcagacc aggccaggcc agctggacgg gcacaccatg aggtaggtgg	180
gcgccacagc ctccctgcag ggtgtggggg gggagcacag gcctgggcct caccgcccct	240
gcctgcccc taggtgtctg accctcctgg gccttctgtg tggtctgggt gccaccccct	300
taggcccga gtggcctgaa cctgtgttct ggccgctggc atcccccggc tttccagggg	360
agtatgccaa tgaccaggag cgccgctgga ccctgactgc acccccggc taccgcctgc	420
gcctctactt caccacttc gacctggagc tctccacct ctgcgagtac gacttcgtca	480
aggtgccgtc agacgggagg gctgggggtt ctcagggtcg gggggcctcc aaggagtagc	540
cagggttcag ggacacctg gagcaggggc caggcttggc caggaggag atcaggcctg	600
ggtcttgctt tactccctg tgacacctga cccacagct gagctcgggg gccaaaggtgc	660
tggccacgct gtgcgggag gagagcacag acacggagcg ggcccctggc aaggacactt	720
tctactcgct gggctccagc ctggacatta ccttcgctc cgactactcc aacgagaagc	780
cgttcacggg gttcgaggcc ttctatgcag ccgagggtga gccaaagggt gtcctgcaac	840
atctcagtct gcgcagctgg ctgtgggggt aactctgtct taggccaggc agccctgcct	900
tcagtttccc cacctttccc agggcagggg agaggcctct ggctgacat catccacaat	960
gcaaagacca aaacagccgt gacctccatt cacatgggct gaggccaac tctgagccag	1020
ggatctgagg acagcatcgc ctcaagtgc gcagggactg gccgggagcg gcagctcacg	1080
cctgtaattc cagcactttg ggaggccgag gctggcttga taatttgagg gtcaggagtt	1140
caaggccagc cagggaaca cggtgaaact ctatctccac taaaactaca aaaattagct	1200

ES 2 601 497 T3

gggcgtggtg gtgcgcacct ggaatcccag ctactagggg ggctqaggca ggagaattgc 1260
 ttgaacctgc gaggtggagg ctgcagtgaa cagagattgc accactacac tccacctggg 1320
 cgacagacta gactccgtct caaaaaaaca aaaacaaaaa ccacgcaggg ccgaggggccc 1380
 atttacaagc tgacaaagtg ggccctgccg gcgggagcgc tgcaggatgt ttgattttca 1440
 gatcccagtc cctgcagaga ccaactgtgt gacctctggc aagtggctca atttctctgc 1500
 tccttagaag ctgctgcaag ggttcagcgc tgtagcccg cccctgggt ttgattgact 1560
 cccctcatta gctgggtgac ctcgcccgga cactgaaact cccactggtt taacagaggt 1620
 gatgtttgca tctttctccc agcgtctctg ggagcttgca gcgacctag gctgtgaag 1680
 tgattggccc ggcaccagtc ccgcacccta gacaggacct aggcctcttc tgagggtccac 1740
 totgaggtea tggatctctt gggaggagtc caggctggat ccgcctctt tcctctctga 1800
 cggcctgcct ggcctgcct ctccccaga cattgacgag tgcagggtgg ccccgggaga 1860
 ggcgcaccac tgcgaccacc actgccaca ccaactgggc ggtttctact gctcctgcg 1920
 cgcaggetac gtcctgcacc gtaacaagc cacctgctca ggtgaggag gctgcctcgg 1980
 ccccaacgca cctctctctg ggataccgg ggctcctcag gccattgct gctctgcca 2040
 ggggtgcgga gggcctgggc ctggacactg ggtgcttcta ggcctgctg cctccagctc 2100
 cccttctcag cctgcttcc cctctcagca gccaggctca tcagtgccac cctgccctag 2160
 cactgagact aattctaaca tcccactgtg taactggttc caactgggt ctgggaaccc 2220
 ctcatgtagc caggggagag togggtatc taacctcgtt ccttgactg ggttctgtt 2280
 ccctgcactg ggggacgggc cagtgtctct gggcgtgggc agccccacc tgtggcgtg 2340
 accctgctcc cccgactcgg ttctctctct cggggtctct ccttgcctct ctgatctctc 2400
 ttccagagca gagcctctag cctccctgg agctccggct gccagcagg tcagaagcca 2460
 gagccaggct gctggcctca gctccgggtt gggtgagat gctgtgccc aactccatt 2520
 caccacccat ggaccocaata ataaacotgg cccacccca cctgctgccg cgtgtctctg 2580
 ggggtggagg gtcgggaggc ggtggggcgc gctcctctct gcctaccctc ctacagcct 2640
 catgaacccc aggtctgttg gagcctctc catggggcca cagggtcctt ggcctcacc 2700
 cctgttttga agatggggca ctgaggccgg agaggggtaa ggcctcgtc ggtccaggt 2760
 ccccagaggc tgagccaga gtaatcttga accacccca ttcagggtct ggcctggagg 2820
 agcotgacct acagaggaga caccctggga gatattcatt gaggggtaat ctggtccccc 2880
 gcaaatccag gggtgattcc cactgccca taggcacagc cactggaag aaggcaggca 2940
 atgttggggc tctcacttc ctagaggcct cacaactcaa atgccccca ctgcagctgg 3000
 ggggtggggt gtggtatgg atggggacca agccttctt gaaggataga gccagccca 3060
 acaccccgcc ccgtggcagc agcatcagc gtccagcga ggaaggagag caccagactc 3120
 agtcatgate actgttgctt tgaacttoca agaacagccc cagggaagg gtcaaacag 3180

ES 2 601 497 T3

```

gggaaagggg gtgatgagag atccttcttc cggatgttcc tccaggaacc agggggctgg 3240
ctggtcttgg ctgggttcgg gtaggagacc catgatgaat aaacttgga atcactgggg 3300
tggctgtaag ggaatttagg ggagctccga aggggccctt aggctcgagg agatgtcct 3360
ctcttttccc gaattcccag ggaccagga gagtgtccct tcttctctt cctgtgtgtc 3420
catccacccc cgcccccg cctggcagag ctgggtggaac tcagtgtctc agccctacc 3480
ctgggggttg gactctgget caggacacca ccacgtccc tgggggtgtg agtgagggcc 3540
tgtgcgtccc atcccagtg ctgcctgttt cagctaaagc ctcaaagcaa gagaaacccc 3600
ctctctaagc ggccctcag ccatcgggtg ggtcgtttgg tttctgggtg ggccctcagg 3660
gctggccacc tgcaggggcc agcccaaccc agggatgcag atgtcccagc cacatccctg 3720
tccagtttc ctgctcccca aggcattcc cctgtgtttg gtgcgagggc tgatagaggg 3780
cacgccaagt cactcccctg ccttccctc ctccagccc tgtgtctcgg ccaggtcttc 3840
accagaggt ctggggagct cagcagccct gaataccac gccgtatcc caaactctc 3900
agttgcactt acagcatcag cctggaggag gggttcagtg tcattctgga ctttgtggag 3960
tccttcgatg tggagacaca cctgaaacc ctgtgtccct acgactttct caaggtctgg 4020
ctcctgggccc cctcatcttg tccagatcc tccccctca gccagctgc acccctact 4080
tcctgcagca tggccccac caggttccc tcacctcgg tgacccacc tcttcagggtg 4140
ctctatggag gtcaaggctg gggcttcgag tacaagtgtg ggaggcagag tggggagggg 4200
caccccaatc catggcctgg gttggcctca ttgggtgtcc ctgaaatgtc gaggagggtg 4260
gttacttccc tccgccagc ccagaccag gcagctgtc ccagctttc atgagcttct 4320
ttctcagatt caaacagaca gagaagaaca tggccattc tgtgggaaga cattgcccc 4380
caggattgaa acaaaaagca acacggtgac catcacctt gtcacagatg aatcaggaga 4440
ccacacaggc tggaaatcc actacacgag cacagtgagc aagtgggctc agatccttg 4500
tggaagcgca gagctgcctc tctctggagt gcaaggagct gtagagtgtg gggctcttct 4560
gggcaggact aggaagggac accaggttta gtggtgtga ggtctgaggc agcagcttct 4620
aaggggaagc acccgtgcc tctcagcag caccagcat ctccaccact cattcttcaa 4680
ccaccattc acccatcact catcttttac ccacccacc tttgccactc atccttctgt 4740
ccctcatcct tccaaccatt catcaatcac ccacccatcc atcctttgcc acacaaccat 4800
ccaccattc ttctacctac ccacatcct catccatcct tctatcagca tccttctacc 4860
accatcctt cgttcggtca tccatcatca tccatccatc 4900

```

<210> 8

<211> 136

5 <212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 8

ES 2 601 497 T3

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
130 135

<210> 9

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapien

<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

5

10

ES 2 601 497 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
180

<210> 10

<211> 293

5 <212> PRT

<213> Homo sapien

<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

10

ES 2 601 497 T3

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

<210> 11

<211> 41

5 <212> PRT

<213> Homo sapien

<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 sapien

15

<400> 12

ES 2 601 497 T3

Ile Tyr Gly Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val
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
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 10 <400> 14
 Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu
 1 5 10 15

 <210> 15
 <211> 43
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 20 <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

 25 <210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> Péptido sintético

 <400> 16
 Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn
 1 5

 35 <210> 17
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <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

 Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe
 20 25

 45 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 18
 Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly
 1 5

5 <210> 19
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<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

15 <210> 20
 <211> 960
 <212> ADN
 <213> Homo sapien

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (51)..(797)

25 <400> 20
 attaaactgag attaaccttc cctgagtttt ctcacaccaa ggtgaggacc atg tcc 56
 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 Leu Ser Met Val Ala Ala Ser

ES 2 601 497 T3

5	10	15	
tac tca gaa act gtg acc tgt gag gat gcc caa aag acc tgc cct gca Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys Pro Ala 20 25 30			152
gtg att gcc tgt agc tct cca ggc atc aac ggc ttc cca ggc aaa gat Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly Lys Asp 35 40 45 50			200
ggg cgt gat ggc acc aag gga gaa aag ggg gaa cca ggc caa ggg ctg Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln Gly Leu 55 60 65			248
aga ggc tta cag ggc ccc cct gga aag ttg ggg cct cca gga aat cca Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly Asn Pro 70 75 80			296
ggg cct tct ggg tca cca gga cca aag ggc caa aaa gga gac cct gga Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp Pro Gly 85 90 95			344
aaa agt ccg gat ggt gat agt agc ctg gct gcc tca gaa aga aaa gct Lys Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg Lys Ala 100 105 110			392
ctg caa aca gaa atg gca cgt atc aaa aag tgg ctg acc ttc tct ctg Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe Ser Leu 115 120 125 130			440
ggc aaa caa gtt ggg aac aag ttc ttc ctg acc aat ggt gaa ata atg Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu Ile Met 135 140 145			488
acc ttt gaa aaa gtg aag gcc ttg tgt gtc aag ttc cag gcc tct gtg Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala Ser Val 150 155 160			536
gcc acc ccc agg aat gct gca gag aat gga gcc att cag aat ctg atc Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Asn Gly Ala Ile Gln Asn Leu Ile 165 170 175			584
aag gag gaa gcc ttc ctg ggc atc act gat gag aag aca gaa ggg cag Lys Glu Glu Ala Phe Leu Gly Ile Thr Asp Glu Lys Thr Glu Gly Gln 180 185 190			632
ttt gtg gat ctg aca gga aat aga ctg acc tac aca aac tgg aac gag Phe Val Asp Leu Thr Gly Asn Arg Leu Thr Tyr Thr Asn Trp Asn Glu 195 200 205 210			680
ggt gaa ccc aac aat gct ggt tct gat gaa gat tgt gta ttg cta ctg Gly Glu Pro Asn Asn Ala Gly Ser Asp Glu Asp Cys Val Leu Leu Leu 215 220 225			728
aaa aat ggc cag tgg aat gac gtc ccc tgc tcc acc tcc cat ctg gcc Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro Cys Ser Thr Ser His Leu Ala 230 235 240			776
gtc tgt gag ttc cct atc tga agggatcatat cactcaggccc ctccctgtct Val Cys Glu Phe Pro Ile 245			827
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 sapien

10 <400> 21

ES 2 601 497 T3

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
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
<223> Secuencia consenso de péptido sintético
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- 15 <222> (1)..(1)

<223> Donde X en la posición 1 representa hidroxiprolina

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 5 <222> (4)..(4)
 <223> Donde X en la posición 4 representa un residuo hidrofóbico

<400> 22
 Xaa Gly Lys Xaa Gly Pro
 1 5

10 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Péptido sintético

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> Donde X representa hidroxiprolina

<400> 23
 Xaa Gly Lys Leu Gly
 1 5

25 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (9)..(15)
 <223> Donde X en las posiciones 9 y 15 representa hidroxiprolina

<400> 24

40 Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly Lys Leu Gly Pro Xaa Gly
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 27
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(27)
 <223> Donde X en las posiciones 3, 6, 15, 21, 24, 27 representa hidroxiprolina

55 <400> 25
 Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly
 1 5 10 15

Lys Leu Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa
 20 25

<210> 26
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <220>
 10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 <220>
 15 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 <220>
 20 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 <220>
 25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (41)..(41)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 <220>
 30 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (50)..(50)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 <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
 35 Asp Xaa Gly Lys Ser
 50
 <210> 27
 <211> 33
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <220>
 45 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(33)
 <223> Donde X en las posiciones 3, 6, 12, 18, 21, 30, 33 representa hidroxiprolina
 50 <400> 27

ES 2 601 497 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

<210> 28

<211> 45

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

10

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (3)..(45)

<223> Donde X en las posiciones 3, 6, 9, 27, 30, 36, 42, 45 representa hidroxiprolina

15

<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> ADN

<213> Homo sapien

35

<400> 30

ES 2 601 497 T3

```

atgagcctgc tgaccctcct gggccttctg tgtggctcgg tggccacccc cttggggccg      60
aagtggcctg aacctgtgtt cggggcctg gcacccccg gctttccagg ggagtatgcc      120
aatgaccagg agcgggcctg gaccctgact gcacccccg gctaccgctt gcgcctctac      180
ttcaccactc tcgacctgga gctctccac cctcgcgagt acgacttcgt caagctgagc      240
tcggggggcca aggtgctggc cagcctgtgc gggcaggaga gcacagacac ggagcggggc      300
cctggcaagg acactttcta ctcgctgggc tccagcctgg acattacott ccgctccgac      360
tactccaacg agaagcgtt cagggggttc gaggccttct atgcagccga ggacattgac      420
gagtgcacag tggcccggg agaggcgccc acctgcgacc accactgcca caaccacctg      480
ggcggtttct actgctcctg ccgcgcaggc tacgtcctgc accgtaacaa gcgcacctgc      540
tcagcctgtg gctccggcc                                     559

```

```

5  <210> 31
   <211> 34
   <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

10 <220>
   <223> Oligo sintético

   <400> 31
   cgggcacacc atgaggctgc tgaccctcct gggc 34

15 <210> 32
   <211> 33
   <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

20 <220>
   <223> Oligo sintético

   <400> 32
   gacattacct tccgtccga ctccaacgag aag      33

25 <210> 33
   <211> 33
   <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

30 <220>
   <223> Oligo sintético

   <400> 33
   agcagccctg aataccacg gccgtatccc aaa      33

35 <210> 34
   <211> 26
   <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

40 <220>
   <223> Oligo sintético

   <400> 34
45 cgggatccat gaggctgctg accctc      26

   <210> 35
   <211> 19
   <212> ADN

```

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo sintético
 5
 <400> 35
 ggaattccta ggctgcata 19
 <210> 36
 10 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligo sintético
 <400> 36
 ggaattccta caggcgct 19
 20 <210> 37
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Oligo sintético
 <400> 37
 30 ggaattccta gtagtgat 19
 <210> 38
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligo sintético
 <400> 38
 40 tgcggccgct gtagtgctg tctt 25
 <210> 39
 <211> 23
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo sintético
 50 <400> 39
 ggaattcact cggtattctc gga 23
 <210> 40
 <211> 17
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo sintético
 60 <400> 40
 tccgagaata acgagtg 17
 <210> 41
 65 <211> 29
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo sintético
 5
 <400> 41
 cattgaaagc ttggggtag aagttgtc 29
 <210> 42
 10 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligo sintético
 <400> 42
 cgcggccgca gctgctcaga gtgtaga 27
 20 <210> 43
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Oligo sintético
 <400> 43
 cggtaaagctt cactggctca gggaaata 28
 30 <210> 44
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligo sintético
 <400> 44
 40 aagaagcttg cgcaccat ggattggctg tggaaact 37
 <210> 45
 <211> 31
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo sintético
 50 <400> 45
 cgggatcctc aaactttctt gtccaccttg g 31
 <210> 46
 <211> 36
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo sintético
 60 <400> 46
 aagaaagctt gccgccacca tgttctcact agctct 36
 <210> 47
 65 <211> 26
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo sintético
 5 <400> 47
 cgggacccct ctcctctaa cactct 26
 <210> 48
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Péptido sintético
 <400> 48
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 1 5
 20 <210> 49
 <211> 4960
 <212> ADN
 <213> Homo Sapien
 25 <400> 49

ES 2 601 497 T3

ccggacgtgg tggcgcatgc ctgtaatccc agctactcgg gaggtgagg caggagaatt	60
gctcgaaccc cggaggcaga ggtttggtgg ctcacacctg taatcccagc actttgcgag	120
gctgaggcag gtgcacgct ttggctcagg agttcaagac cagcctgggc aacacaggga	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 tgtcgtccag gctggagtgc agtgggtcga	420
tctcggatca ctgcaacctc cgcctcccag gctcaagcaa ttctctgcc tcagcctccc	480
gagtagctgg gattataagt gcgcgctgcc acacctggat gatttttgta tttttagtag	540
agatgggatt tcaccatggt ggtcaggctg gtctcaact cccaacctcg tgatccacc	600
accttggcct cccaaagtgc tgggattaca ggtataagcc accgagccca gccaaaagcg	660
acttctaagc ctgcaaggga atcgggaatt ggtggcacca ggctctctg acagggttta	720
agaaattagc cagcctgagg ctgggcaagg tggctcacac ctgtaatccc agcactttgg	780
gaggctaagg caggtggatc acctgagggc aggagttaa gaccagcctg accaactgg	840
agaaacccca tccctaccaa aaataaaaaa ttagccaggt gtggtggtgc tcgcctgtaa	900
tcccgctac ttgggaggct gaggtgggag gattgcttga acacaggaag tagaggctgc	960
agtgagctat gattgcagca ctgcactgaa gccggggcaa cagaacaaga tccaaaaaaa	1020
agggaggggt gaggggcaga gccaggattt gtttccaggc tgttgttacc taggtccgac	1080
tcctggctcc cagagcagcc tgtcctgcct gcctggaact ctgagcaggc tggagtcag	1140
gagtcgattc ccagaatccc agagtcaggg aggtcggggg caggggcagg tcaactggaca	1200
aacagatcaa aggtgagacc agcgtagggc tgcagaccag gccaggccag ctggacgggc	1260
acaccatgag gtaggtgggc gccacagcc tccctgcagg gtgtggggtg ggagcacagg	1320
cctgggccct caccgccct gccctgccca taggtgctg accctcctgg gccttctgtg	1380
tggctcggtg gccacccct tgggcccgaa gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc	1440
atcccccggc tttccagggt agtatgcaa tgaccaggag cggcgctgga ccctgactgc	1500
accccccggc taccgcctgc gcctctactt caccacttc gacctggagc tctcccact	1560

ES 2 601 497 T3

ctgcgagtac gacttcgtca aggtgccgtc aggacgggag ggctgggggt tctcagggtc 1620
 ggggggtccc caaggagtag ccagggttca gggacacctg ggagcagggg ccaggcttgg 1680
 ccaggaggga gatcaggcct gggtcttgc ttcactccct gtgacacctg accccacagc 1740
 tgagctcggg ggccaaggtg ctggccacgc tgtgcgggca ggagagcaca gacacggagc 1800
 gggccctcgg caaggacact ttctactcgc tgggctccag cctggacatt accttcctgc 1860
 ccgactactc caacgagaag ccgttcacgg ggttcgaggc cttctatgca gccgagggtg 1920
 agccaagagg ggtcctgcaa catctcagtc tgcgcagctg gctgtggggg taactctgtc 1980
 ttaggccagg cagccctgcc ttcagtttcc ccacctttcc cagggcaggg gagaggcctc 2040
 tggcctgaca tcatccacaa tgcaaagacc aaaacagccg tgacctccat tcacatgggc 2100
 tgagtgccaa ctctgagcca gggatctgag gacagcatcg cctcaagtga cgcagggact 2160
 ggccggggcg agcagctcac gcctgtaatt ccagcacttt gggaggccga ggctggctga 2220
 tcatttgagg tcaggagtcc aaggccagcc agggcaacac ggtgaaactc tatctccact 2280
 aaaactacaa aaattagctg ggcggtgtgg tgcgcacctg gaatccagc tactagggag 2340
 gctgaggcag gagaattgct tgaacctgcg aggtggaggc tgcaagtgaac agagattgca 2400
 ccactacact ccagcctggg cgacagagct agactccgtc tcaaaaaaca aaaaacaaaa 2460
 acgacgcagg ggccgagggc ccattttaca gctgacaaag tggggccctg ccagcgggag 2520
 cgctgccagg atgtttgatt tcagatccca gtccctgcag agaccaactg tgtgacctct 2580
 ggcaagtggc tcaatttctc tgctccttag gaagctgtg caagggttca gcgctglagc 2640
 cccgccccct gggtttgatt gactccctc attagctggg tgacctggg ccggacactg 2700
 aaactccac tggtttaaca gaggtgatgt ttgcatctt ccccagcgc tgcaggagc 2760
 ttgcagcgac cctaggcctg taagggtgatt ggcccgccac cagtcccgca cctagacag 2820
 gacgaggcct cctctgaggt ccactctgag gtcattggatc tcctgggagg agtccaggct 2880
 ggatcccgcc tctttccctc ctgacggcct gcctggccct gcctctccc cagacattga 2940
 cgagtgccag gtggccccgg gagaggcgcc cacctgcgac caccactgcc acaaccacct 3000
 gggcggtttc tactgtcct gccgcgagg ctacgtcctg caccgtaaca agcgcacctg 3060
 ctcagccctg tgctccggcc aggtcttcac ccagaggtct ggggagctca gcagccctga 3120
 atacccacgg ccgtatocca aactctccag ttgcacttac agcatcagcc tggaggaggg 3180
 gttcagtgtc attctggact ttgtggagtc cttcgatgtg gagacacacc ctgaaaccct 3240
 gtgtccctac gaatttctca 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 tggctatgag cttctgcaag gtcacttgcc 3540

ES 2 601 497 T3

```

cctgaaatcc tttactgcag tttgtcagaa agatggatct tgggaccggc caatgccgc 3600
gtgcagcatt gttgactgtg gccctcctga tgatctaccc agtggccgag tggagtacat 3660
cacaggtcct ggagtgaacca cctacaaagc tgtgattcag tacagctgtg aagagacott 3720
ctacacaatg aaagtgaatg atggtaaata tgtgtgtgag gctgatggat tctggacgag 3780
ctccaaagga gaaaaatcac tcccagctcg tgagcctgtt tgtggactat cagcccgcac 3840
aacaggaggg cgtatatatg gagggcaaaa ggcaaacct ggtgattttc cttggcaagt 3900
cctgatatta ggtggaacca cagcagcagg tgcactttta tatgacaact gggtcctaac 3960
agctgctcat gccgtctatg agcaaaaaca tgatgcatcc gccctggaca ttcgaatggg 4020
caccctgaaa agactatcac ctcatatac acaagcctgg tctgaagctg tttttataca 4080
tgaaggttat actcatgatg ctggctttga caatgacata gcatgatta aattgaataa 4140
caaagttgta atcaatagca acatcacgcc tatttgtctg ccaagaaaag aagctgaatc 4200
ctttatgagg acagatgaca ttggaactgc atctggatgg ggattaacct aaaggggttt 4260
tcttgctaga aatctaattg atgtcgacat accgattgtt gaccatcaaa aatgtactgc 4320
tgcatatgaa aagccaccct atccaagggg aagtgttaact gctaacatgc tttgtgctgg 4380
cttagaaagt gggggcaagg acagctgcag aggtgacagc ggaggggcac tgggtgtttct 4440
agatagttaa acagagaggt ggtttgtggg aggaatagtg tcctgggggtt ccatgaattg 4500
tggggaagca ggtcagtatg gagtctacac aaaagttatt aactatattc cctggatcga 4560
gaacataatt agtgattttt aacttgctg tctgcagtca aggattcttc atttttagaa 4620
atgcctgtga agaccttggc agcgacgtgg ctcgagaagc attcatcatt actgtggaca 4680
tggcagttgt tgcctcacc ccaaaaaacag actccaggtg aggctgctgt catttctcca 4740
cttgccagtt taattccagc cttaccatt gactcaaggg gacataaaacc acgagagtga 4800
cagtcattct tgcacacca gtgtaatgtc actgctcaaa ttacatttca ttaccttaaa 4860
aagccagtct cttttcatac tggctgttgg catttctgta aactgcctgt ccatgctctt 4920
tgtttttaaa cttgttctta ttgaaaaaaa aaaaaaaaaa 4960

```

<210> 50

<211> 2090

5 <212> ADN

<213> MASP-2 CDS 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

```

```

ggg ctg ctg tgg agt ttg gtg gcc aca ctt ctg ggt tca aag tgg cct 101

```

ES 2 601 497 T3

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	glg	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					
gac	acc	ttc	tac	tca	ctg	ggt	ccc	agc	cta	aag	gtc	acc	ttc	cac	tcc		389
Asp	Thr	Phe	Tyr	Ser	Leu	Gly	Pro	Ser	Leu	Lys	Val	Thr	Phe	His	Ser		
	105					110					115						
gac	tac	tcc	aat	gag	aag	ccg	ttc	aca	ggg	ttt	gag	gcc	ttc	tat	gca		437
Asp	Tyr	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	Phe	Thr	Gly	Phe	Glu	Ala	Phe	Tyr	Ala		
	120				125					130					135		
gcg	gag	gat	gtg	gat	gaa	tgc	aga	gtg	tct	ctg	gga	gac	tca	gtc	cct		485
Ala	Glu	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Arg	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Ser	Val	Pro		
			140						145					150			
tgt	gac	cat	tat	tgc	cac	aac	tac	ttg	ggc	ggc	tac	tat	tgc	tcc	tgc		533
Cys	Asp	His	Tyr	Cys	His	Asn	Tyr	Leu	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Cys		
			155					160						165			
aga	gcg	ggc	tac	att	ctc	cac	cag	aac	aag	cac	acg	tgc	tca	gcc	ott		581
Arg	Ala	Gly	Tyr	Ile	Leu	His	Gln	Asn	Lys	His	Thr	Cys	Ser	Ala	Leu		
			170				175						180				
tgt	tca	ggc	cag	gtg	ttc	aca	gga	aga	tct	ggg	tat	ctc	agt	agc	cct		629
Cys	Ser	Gly	Gln	Val	Phe	Thr	Gly	Arg	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ser	Pro		
	185					190						195					
gag	tac	ccg	cag	cca	tac	ccc	aag	ctc	tcc	agc	tgc	acc	tac	agc	atc		677
Glu	Tyr	Pro	Gln	Pro	Tyr	Pro	Lys	Leu	Ser	Ser	Cys	Thr	Tyr	Ser	Ile		
	200				205					210					215		
cgc	ctg	gag	gac	ggc	ttc	agt	gtc	atc	ctg	gac	ttc	gtg	gag	tcc	ttc		725
Arg	Leu	Glu	Asp	Gly	Phe	Ser	Val	Ile	Leu	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Phe		
			220						225					230			
gat	gtg	gag	acg	cac	cct	gaa	gcc	cag	tgc	ccc	tat	gac	tcc	ctc	aag		773
Asp	Val	Glu	Thr	His	Pro	Glu	Ala	Gln	Cys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys		
			235					240						245			
att	caa	aca	gac	aag	ggg	gaa	cac	ggc	cca	ttt	tgt	ggg	aag	acg	ctg		821
Ile	Gln	Thr	Asp	Lys	Gly	Glu	His	Gly	Pro	Phe	Cys	Gly	Lys	Thr	Leu		
			250					255					260				
cct	ccc	agg	att	gaa	act	gac	agc	cac	aag	gtg	acc	atc	acc	ttt	gcc		869
Pro	Pro	Arg	Ile	Glu	Thr	Asp	Ser	His	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Phe	Ala		
	265					270						275					

ES 2 601 497 T3

act gac gag tcg ggg aac cac aca ggc tgg aag ata cac tac aca agc Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser 280 285 290 295	917
aca gca cgg ccc tgc cct gal cca acg gcg cca cct aal ggc agc att Thr Ala Arg Pro Cys Pro Asp Pro Thr Ala Pro Pro Asn Gly Ser Ile 300 305 310	965
tca cct gtg caa gcc acg tat gtc ctg aag gac agg ttt tct gtc ttc Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe 315 320 325	1013
tgc aag aca ggc ttc gag ctt ctg caa ggt tct gtc ccc ctg aaa tca Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Lys Asp Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser 330 335 340	1061
ttc act gct gtc tgt cag aaa gat gga tct tgg gac cgg ccg atg cca Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro 345 350 355	1109
gag tgc agc att att gat tgt ggc cct ccc gat gac cta ccc aat ggc Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly 360 365 370 375	1157
cat gtg gac tat atc aca ggc cct caa gtg act acc tac aaa gct gtg His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Gln Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val 380 385 390	1205
att cag tac agc tgt gaa gag act ttc tac aca atg agc agc aat ggt Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly 395 400 405	1253
aaa tat gtg tgt gag gct gat gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu 410 415 420	1301
aaa ctc ccc ccg gtt tgt gag cct gtt tgt ggg ctg tcc aca cac act Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr 425 430 435	1349
ata gga gga cgc ata gtt gga ggg cag cct gca aag cct ggt gac ttt Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe 440 445 450 455	1397
cct tgg caa gtc ttg ttg ctg ggt caa act aca gca gca gca ggt gca Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Gln Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala 460 465 470	1445
ctt ata cat gac aat tgg gtc cta aca gcc gct cat gct gta tat gag Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu 475 480 485	1493
aaa aga atg gca gcg tcc tcc ctg aac atc cga atg ggc atc ctc aaa Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu Asn Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys 490 495 500	1541
agg ctc tca cct cat tac act caa gcc tgg ccc gag gaa atc ttt ata Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile 505 510 515	1589
cat gaa ggc tac act cac ggt gct ggt ttt gac aat gat ata gca ttg His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu 520 525 530 535	1637
att aaa ctc aag aac aaa gtc aca atc aac gga agc atc atg cct gtt	1685

ES 2 601 497 T3

Ile	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Val	Thr	Ile	Asn	Gly	Ser	Ile	Met	Pro	Val		
				540					545					550			
tgc	cta	ccg	cga	aaa	gaa	gct	gca	tcc	tta	atg	aga	aca	gac	ttc	act		1733
Cys	Leu	Pro	Arg	Lys	Glu	Ala	Ala	Ser	Leu	Met	Arg	Thr	Asp	Phe	Thr		
			555					560					565				
gga	act	gtg	gct	ggc	tgg	ggg	tta	acc	cag	aag	ggg	ctt	ctt	gct	aga		1781
Gly	Thr	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Leu	Thr	Gln	Lys	Gly	Leu	Leu	Ala	Arg		
		570				575						580					
aac	cta	atg	ttt	gtg	gac	ata	cca	att	gct	gac	cac	caa	aaa	tgt	acc		1829
Asn	Leu	Met	Phe	Val	Asp	Ile	Pro	Ile	Ala	Asp	His	Gln	Lys	Cys	Thr		
	585					590					595						
acc	gtg	tat	gaa	aag	ctc	tat	cca	gga	gta	aga	gta	agc	gct	aac	atg		1877
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												

<210> 51

<211> 685

<212> PRT

<213> MASP-2 CDS 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

10

ES 2 601 497 T3

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
 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

ES 2 601 497 T3

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																			
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						510																
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																		

ES 2 601 497 T3

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

<210> 52

<211> 670

5 <212> PRT

<213> Proteína MASP-2 madura murina

<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

10

ES 2 601 497 T3

Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly
 165 170 175
 Arg Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys
 180 185 190
 Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Arg Leu Glu Asp Gly Phe Ser Val
 195 200 205
 Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Ala
 210 215 220
 Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Gly Glu His
 225 230 235 240
 Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser
 245 250 255
 His Lys Val Thr Ile Thr Phe Ala Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr
 260 265 270
 Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Arg Pro Cys Pro Asp Pro
 275 280 285
 Thr Ala Pro Pro Asn Gly Ser Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val
 290 295 300
 Leu Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu
 305 310 315 320
 Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp
 325 330 335
 Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly
 340 345 350
 Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro
 355 360 365
 Gln Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr
 370 375 380
 Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly
 385 390 395 400
 Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro
 405 410 415

ES 2 601 497 T3

Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly
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> ADN
<213> MASP-2 CDS de rata

<220>
<221> CDS
10 <222> (10)..(2067)

<400> 53

ES 2 601 497 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	
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

ES 2 601 497 T3

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 gac 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	
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	

ES 2 601 497 T3

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

tttgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaa , 2091

<210> 54

<211> 685

5 <212> PRT

<213> MASP-2 CDS de rata

<400> 54

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

10

ES 2 601 497 T3

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
 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

ES 2 601 497 T3

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		
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		

ES 2 601 497 T3

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

<212> PRT

<213> Proteína MASP-2 madura 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

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

5

10

ES 2 601 497 T3

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
 275 280 285
 Thr Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val
 290 295 300
 Leu Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu
 305 310 315 320
 Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp
 325 330 335
 Gly Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly
 340 345 350
 Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro
 355 360 365

ES 2 601 497 T3

Glu Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr
 370 375 380
 Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly
 385 390 395 400
 Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Lys Pro
 405 410 415
 Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly Gly
 420 425 430
 Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly
 435 440 445
 Glu Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu Thr
 450 455 460
 Ala Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu Asp
 465 470 475 480
 Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln Ala
 485 490 495
 Trp Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly
 500 505 510
 Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile
 515 520 525
 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
 545 550 555 560
 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> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador PCR de MASP-2 de Homo Sapien

5 <400> 56
 atgaggctgc tgaccctcct ggccttc 28

 <210> 57
 <211> 23
10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador PCR de MASP-2 de Homo Sapien

15 <400> 57
 gtgcccctcc tgcgtcacct ctg 23

 <210> 58
 <211> 23
20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
25 <223> Cebador PCR de MASP-2 de Homo Sapien

 <400> 58
 cagagggtgac gcaggagggg cac 23

30 <210> 59
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Cebador PCR de MASP-2 de Homo Sapien

 <400> 59
 ttaaaatcac taattatggt ctcgatc 27

40 <210> 60
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Cebador PCR de MASP-2 murino

 <400> 60
50 atgaggctac tcattctcct gg 22

 <210> 61
 <211> 23
 <212> ADN
55 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador PCR de MASP-2 murino

60 <400> 61
 ctgcagaggt gacgcagggg ggg 23

 <210> 62
 <211> 23
65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador PCR de MASP-2 murino

5 <400> 62
 ccccccctgc gtcacctctg cag 23

10 <210> 63
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Cebador PCR de MASP-2 murino

20 <400> 63
 ttagaaatta cttattatgt tctcaatcc 29

25 <210> 64
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido de MASP-2 de rata

35 <400> 64
 gaggtgacgc aggaggggca ttagtggtt 29

40 <210> 65
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido de MASP-2 de rata

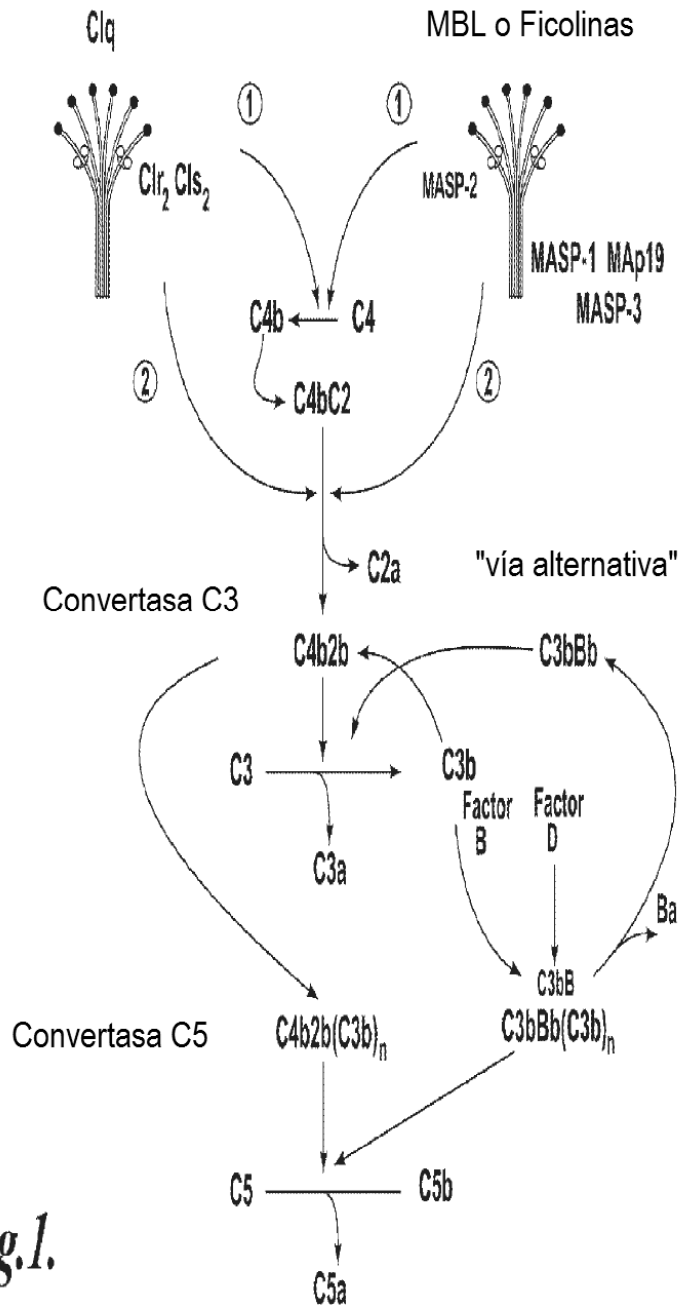
50 <400> 65
 ctgaaacac taatgccct cctgcgtcac ctctgca 37

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que inhibe MASP-2 por union específica a SEC ID NO:6 para usar en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad, o la prevención o el tratamiento de una reacción inflamatoria resultante del trasplante de un órgano o tejido.
- 5 2. Un anticuerpo o fragmento del mismo para usar según la reivindicación 1, en el que el agente inhibidor de MASP-2 inhibe selectivamente la activación del complemento dependiente de MASP-2 sin inhibir sustancialmente la activación del complemento dependiente de C1q.
- 10 3. Un anticuerpo o fragmento del mismo para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el anticuerpo de MASP-2 o el fragmento del mismo se une específicamente a un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 6 con una afinidad al menos 10 veces mayor que con la que se une a un antígeno diferente en el sistema complementario.
- 15 4. Un anticuerpo o fragmento del mismo para usar según cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo de MASP-2 o el fragmento del mismo se une específicamente a un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 6.
- 15 5. Un anticuerpo o fragmento del mismo para usar según cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo de MASP-2 o el fragmento del mismo se une al polipéptido en una posición entre los residuos de aminoácidos 1-176 de la SEC ID NO: 6.
- 20 6. Un anticuerpo o fragmento del mismo para usar según cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo anti-MASP-2 o el fragmento del mismo es un anticuerpo recombinante.
- 20 7. Un anticuerpo o fragmento del mismo para usar según cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo anti-MASP-2 tiene una función efectora reducida.
- 25 8. Un anticuerpo o fragmento del mismo para usar según cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo anti-MASP-2 es un anticuerpo quimérico humanizado o humano.
- 25 9. Un anticuerpo o fragmento del mismo para usar según cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo anti-MASP-2 se produce en un animal transgénico deficiente en MASP-2.
- 25 10. Un anticuerpo o fragmento del mismo para usar según la reivindicación 1, en el que el trasplante de órgano o tejido se selecciona del grupo que consiste en alotrasplante de órgano, xenotrasplante de órgano, injerto de órgano e injerto de tejido.
- 30 11. Una composición farmacéutica que comprende una catidad terapéuticamete eficaz de un anticuerpo anti-MASP-2 o un fragmento del mismo como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para usar como se describe en las reivindicaciones 1 a 10.
- 30 12. Una composición farmacéutica para usar según la reivindicación 11, en la que la composición se formula para suministro sistémico.
- 35 13. Una composición farmacéutica para usar según la reivindicación 11, en la que la composición se formula para suministro subcutáneo.

Vía clásica

Vía de lectinas



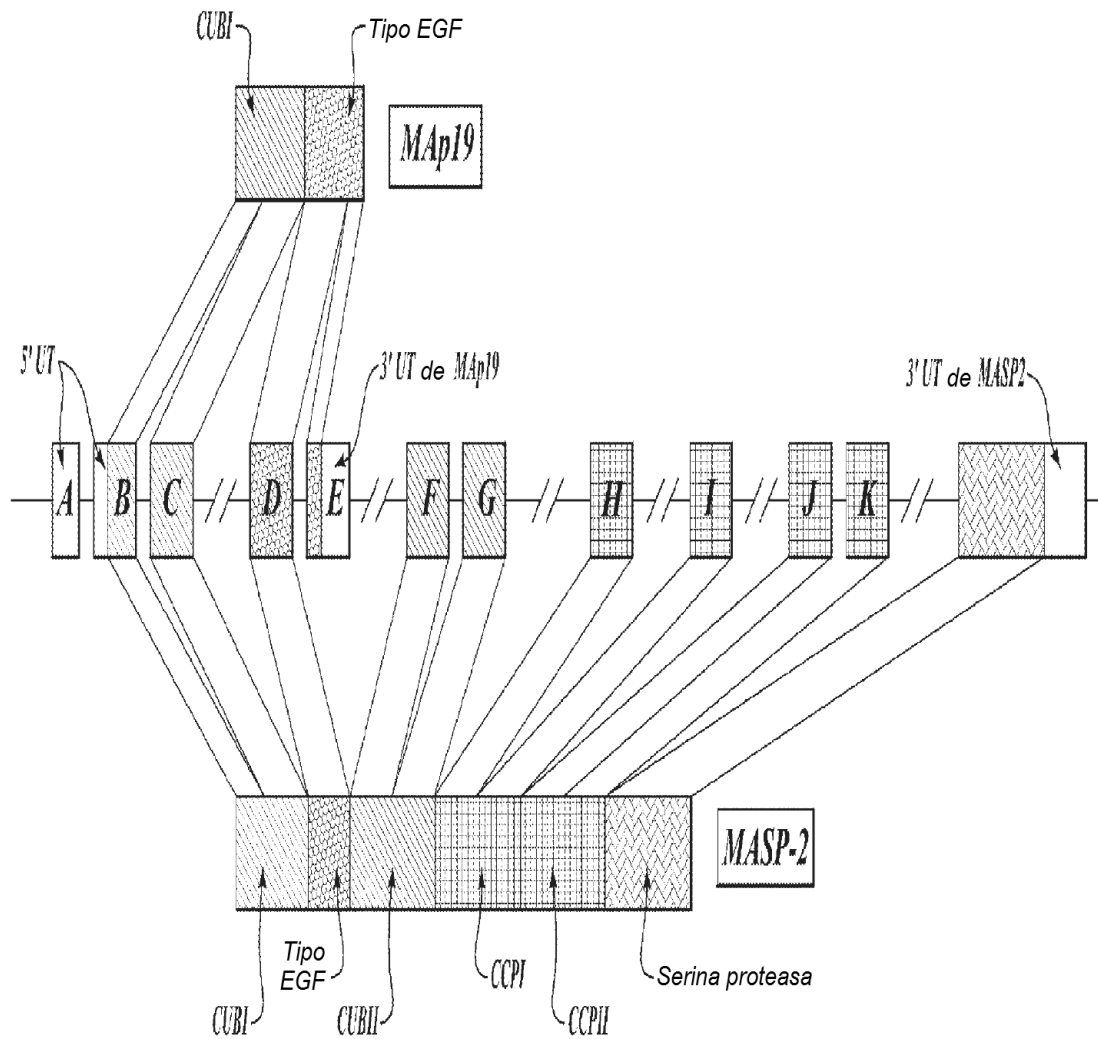
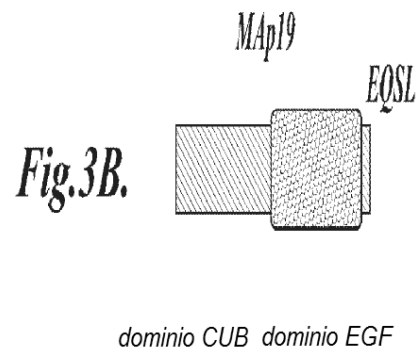
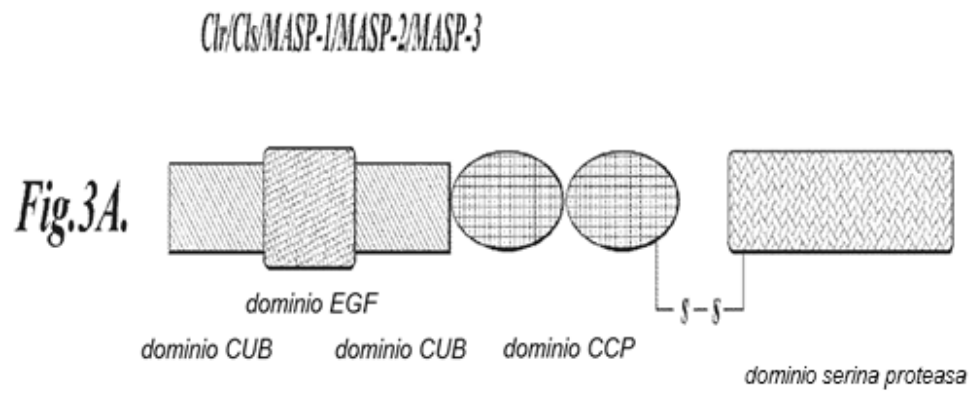


Fig.2.



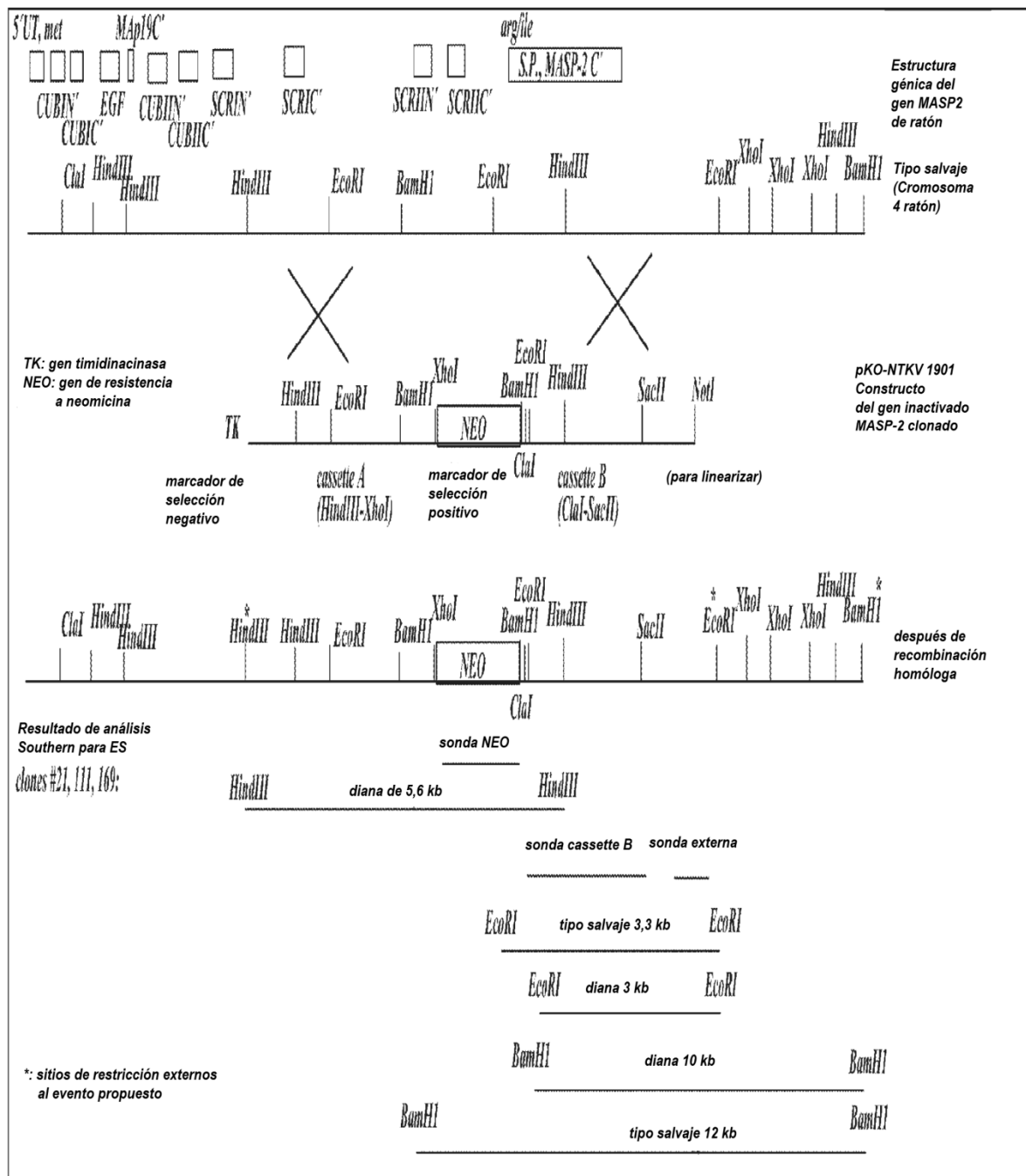


Fig.4.

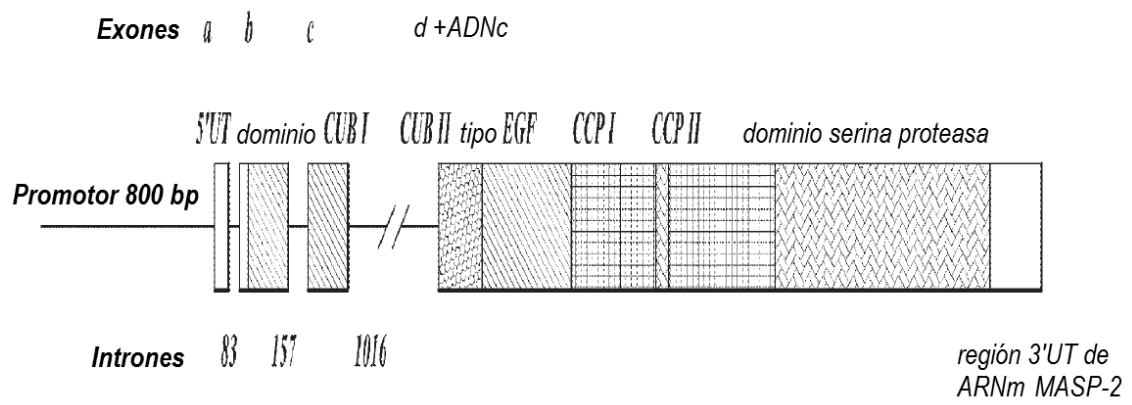


Fig.5.

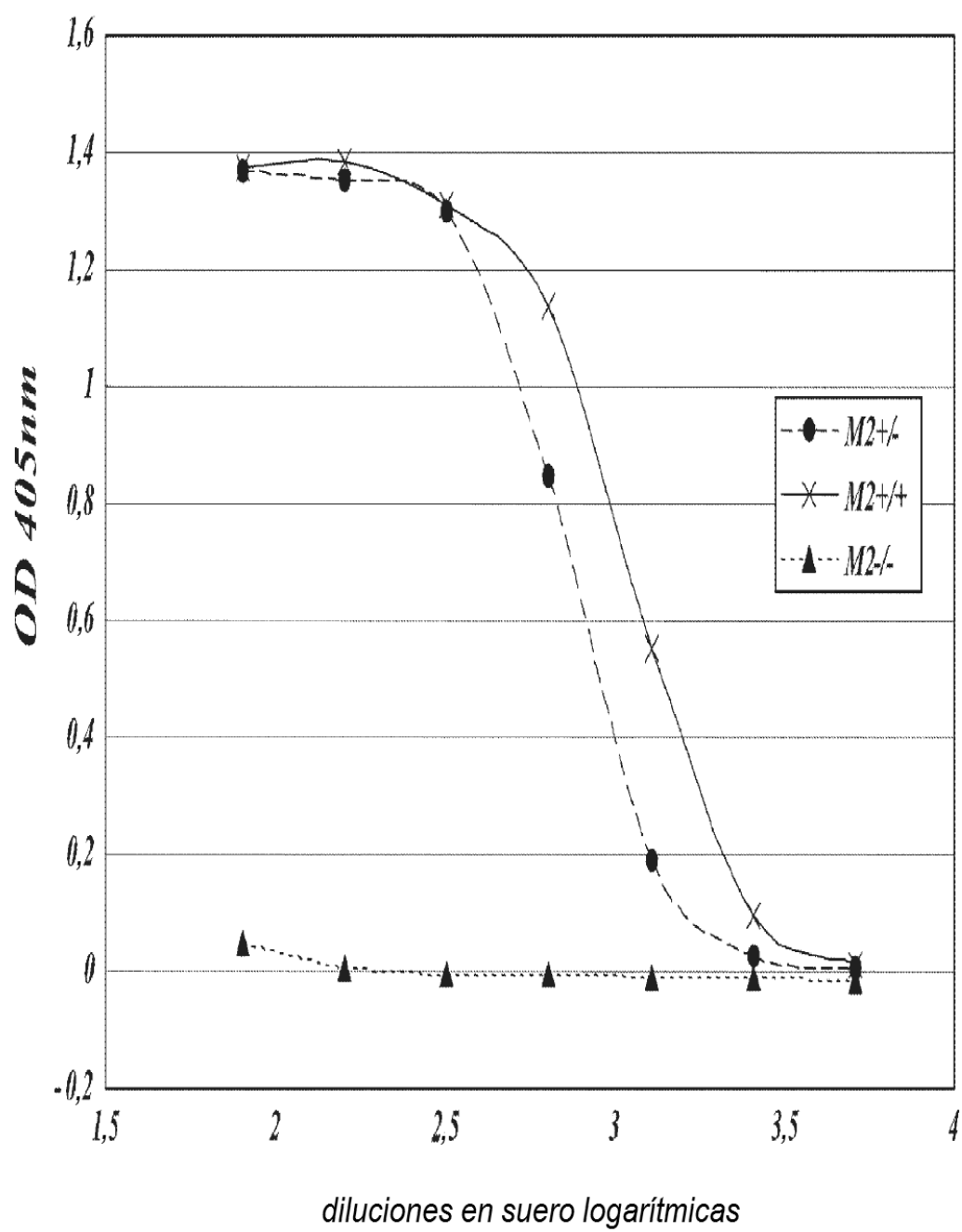
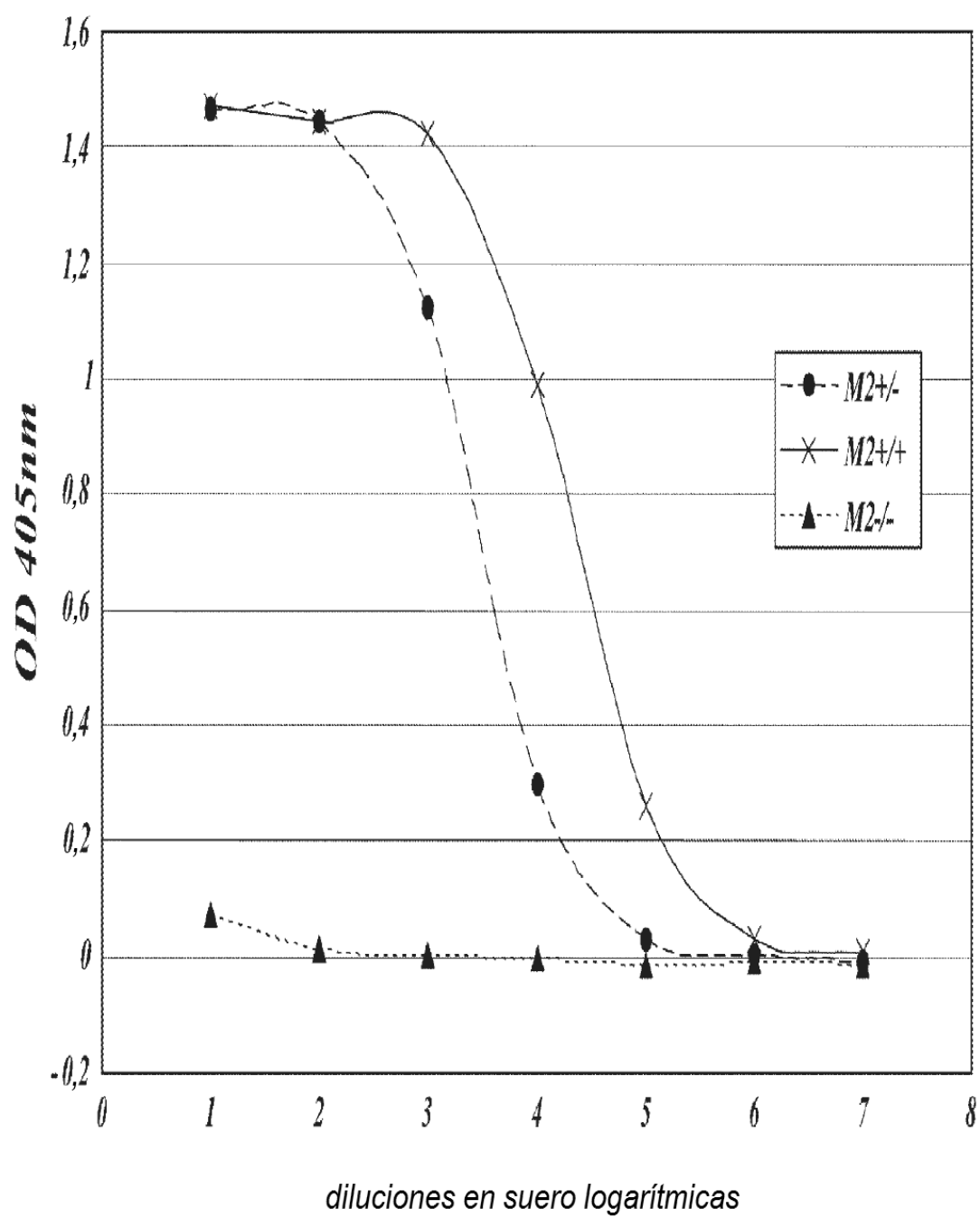
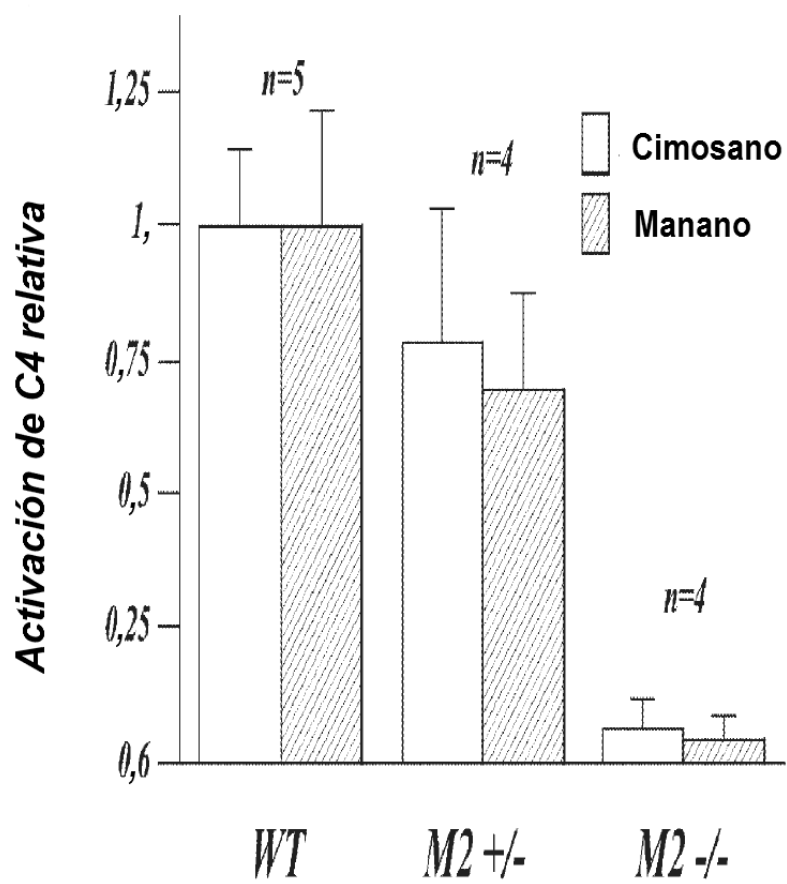


Fig.6A.

*Fig.6B.*

*Fig.6C.*

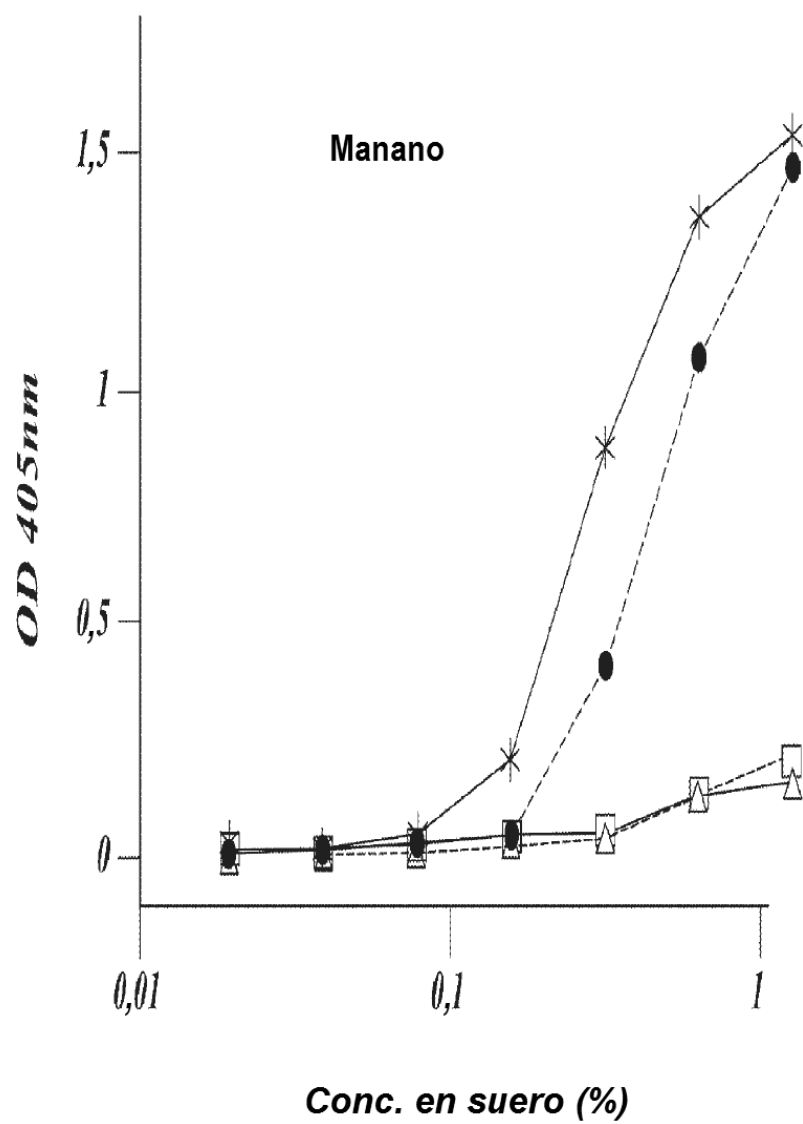


Fig.7A.

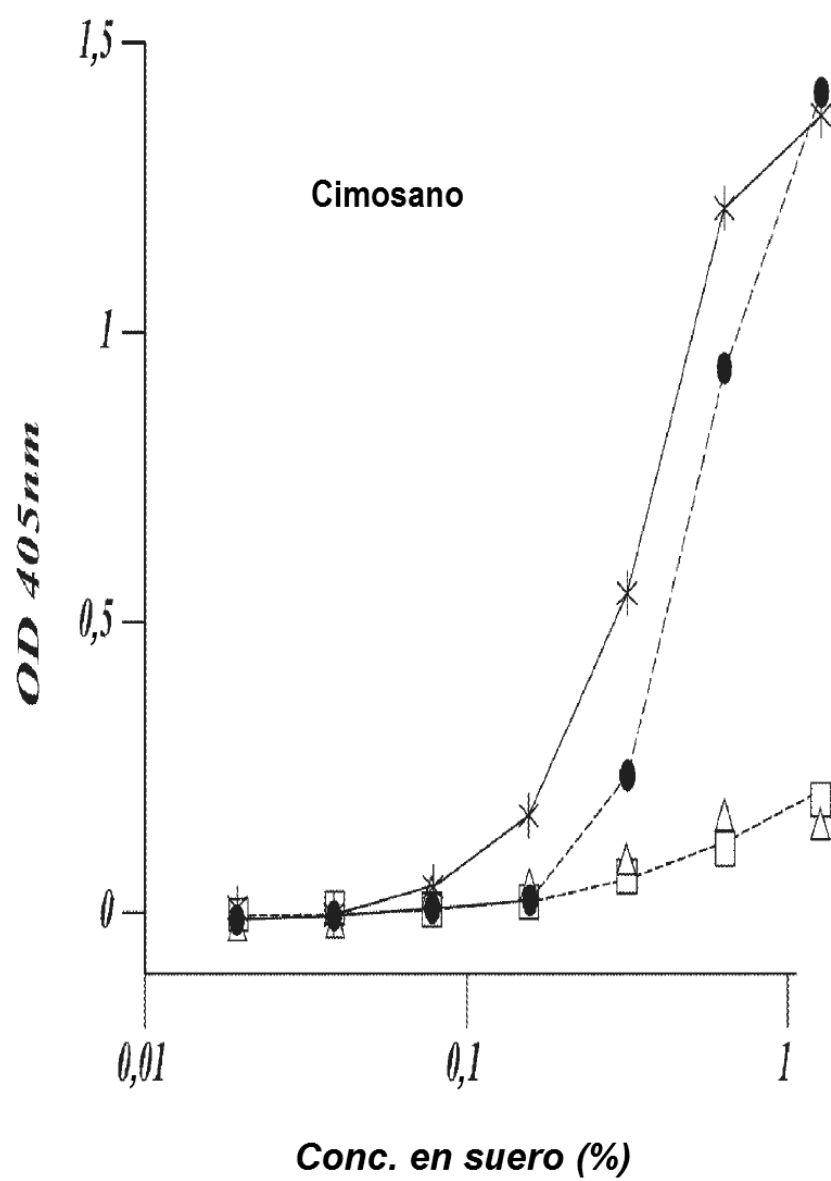
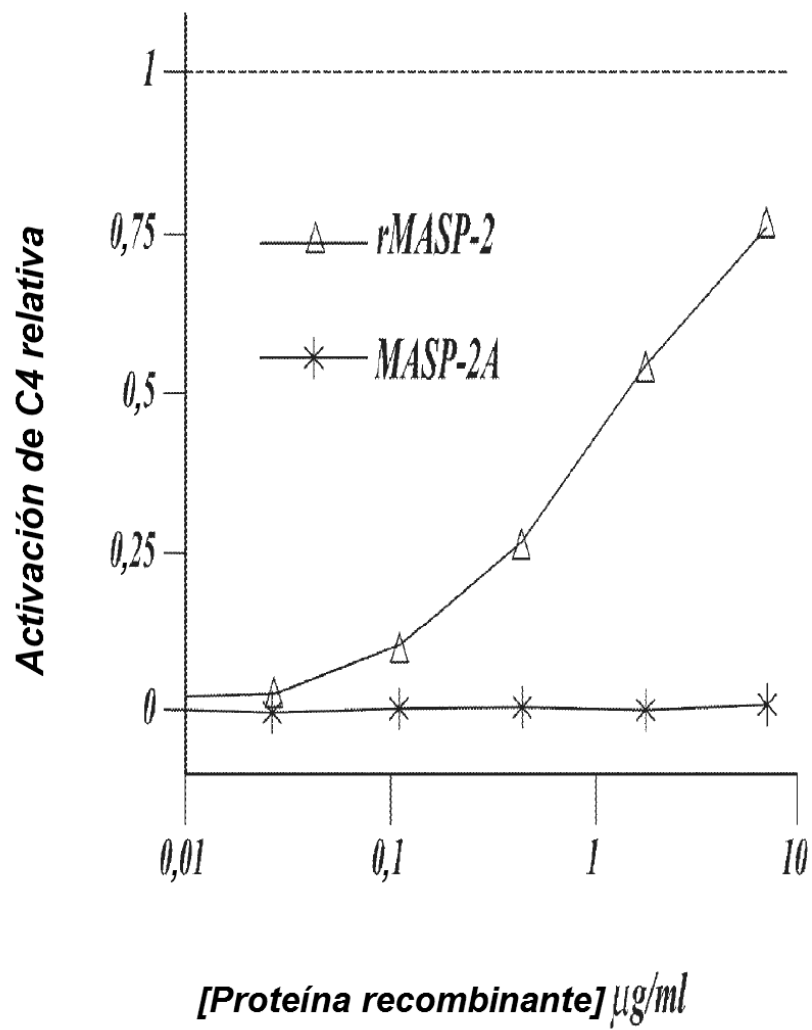


Fig.7B.

*Fig.8.*

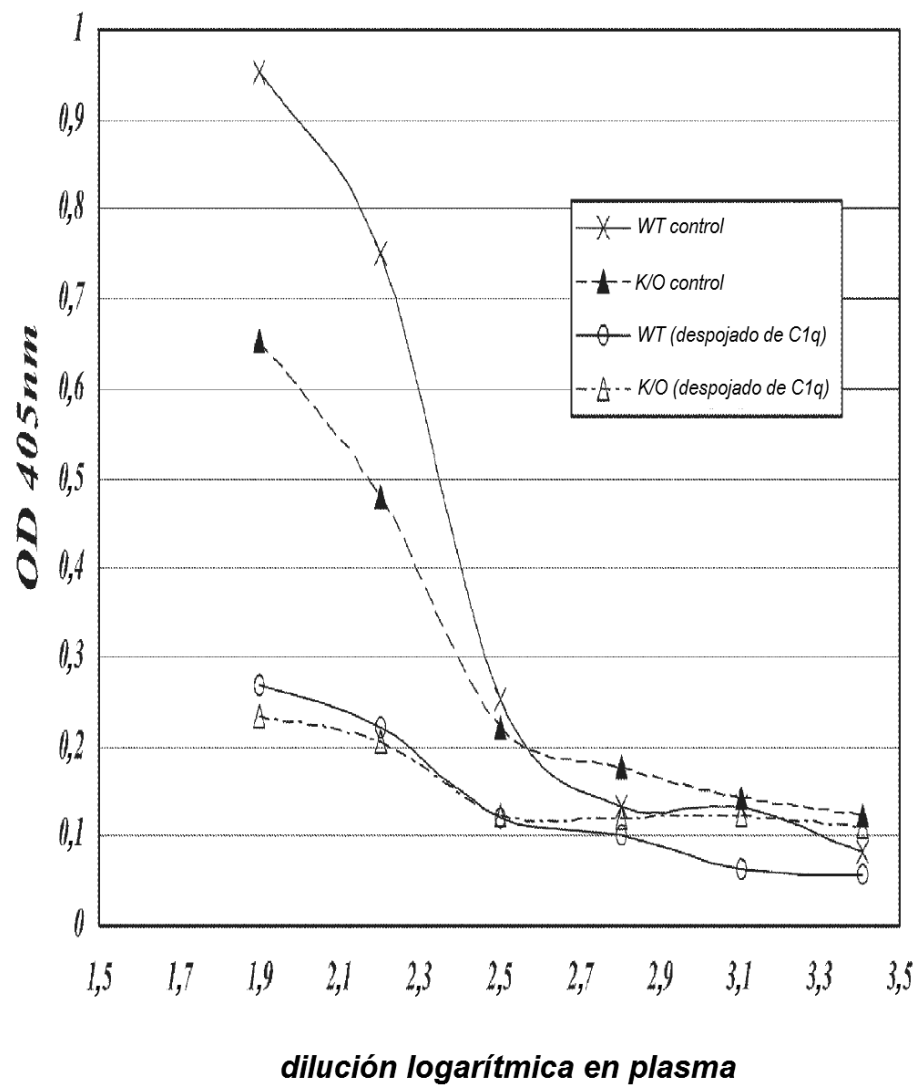


Fig.9.

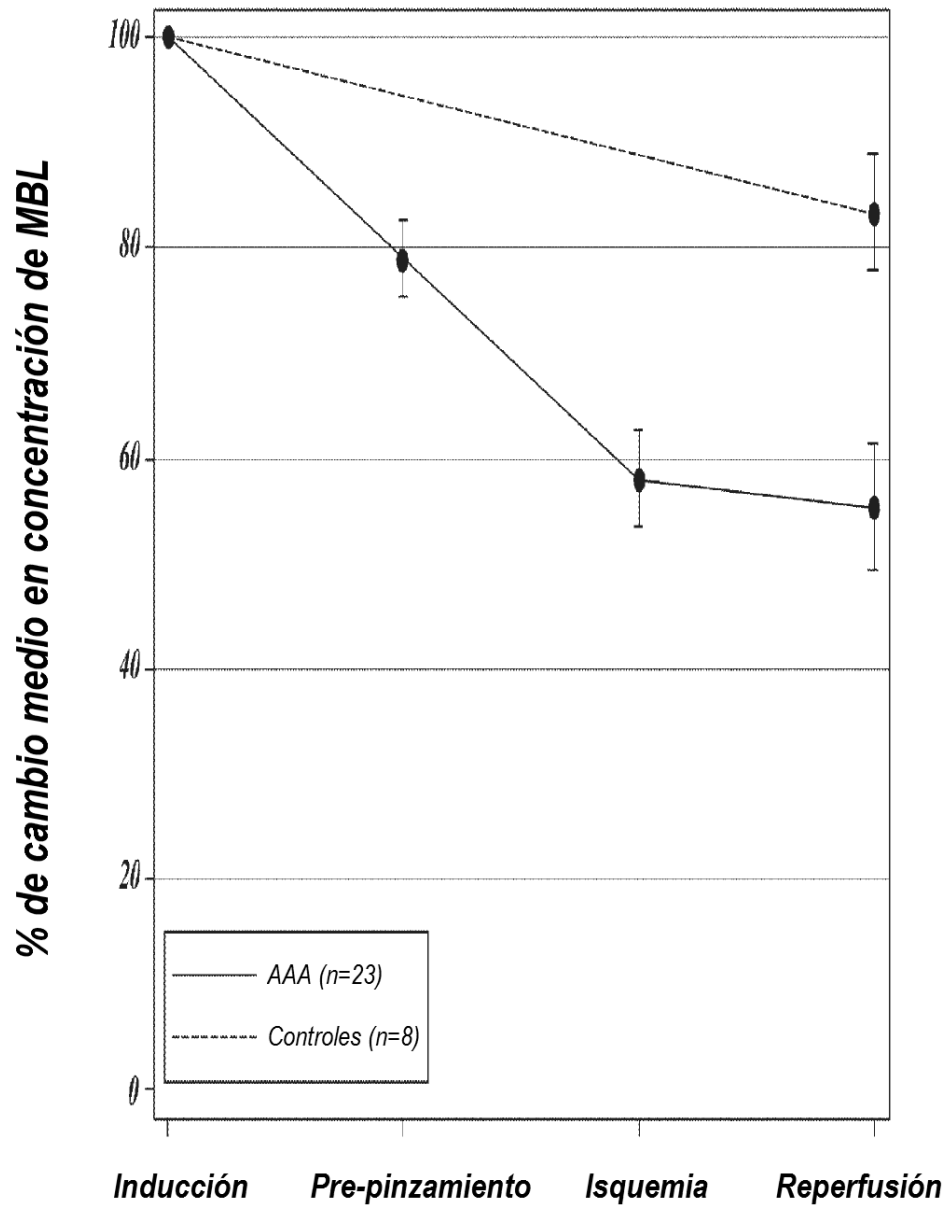


Fig.10.