

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 920**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2010 PCT/US2010/052954**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2011 WO2011047346**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2010 E 10824223 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2488203**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de la coagulación intravascular diseminada mediante la inhibición de la activación del complemento dependiente de MASP-2**

30 Prioridad:

16.10.2009 US 279279 P
09.04.2010 US 322722 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.06.2017

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;
DUDLER, THOMAS, A.;
TEDFORD, CLARK, E.;
PARENT, JAMES, B. y
DEMOPULOS, GREGORY, A.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 617 920 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 el tratamiento de la coagulación intravascular diseminada mediante la inhibición de la activación del complemento dependiente de MASP-2

Área de descripción

- 5 Se describen en la presente memoria anticuerpos o fragmentos de los mismos para el tratamiento de la coagulación intravascular diseminada.

Antecedentes

10 El sistema del complemento proporciona un mecanismo de actuación temprana para iniciar y amplificar la respuesta inflamatoria a la infección microbiana y otras lesiones agudas (M.K. Liszewski y J.P. Atkinson, 1993, *Fundamental Immunology*, tercera edición, editado por W.E. Paul, Raven Press, Ltd., Nueva York). Mientras que la activación del complemento proporciona una valiosa primera línea de defensa contra los patógenos potenciales, las actividades del complemento que promueven una respuesta inflamatoria protectora también pueden representar una amenaza potencial para el anfitrión (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 reclutan y activan los neutrófilos. Estas células activadas son indiscriminadas en su liberación de enzimas destructivas y pueden causar daño en los órganos. Además, la activación del complemento puede causar el depósito de componentes lífticos del complemento sobre células anfitrionas cercanas así como sobre dianas microbianas, dando lugar a la lisis de la célula anfitriona.

20 El sistema del complemento se ha considerado como una contribución a la patogénesis de numerosos estados agudos y crónicos de enfermedad, incluyendo: infarto de miocardio, revascularización después de accidente cerebrovascular, SDEA, lesión por reperfusión, choque séptico, fuga capilar después de quemaduras térmicas, inflamación por derivación postcardiopulmonar, rechazo de trasplantes, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia grave, y enfermedad de Alzheimer. En casi todas estas afecciones, el complemento no es la causa sino que es uno de los diversos factores que intervienen en la patogénesis. Sin embargo, la activación del complemento puede ser un mecanismo patológico importante y representa un punto eficaz para el control clínico en muchos de estos estados de enfermedad. El creciente reconocimiento de la importancia de la lesión tisular mediada por el complemento en una variedad de estados de enfermedad recalca la necesidad de fármacos inhibidores del complemento eficaces. No se han aprobado medicamentos para uso en seres humanos que se dirijan a, e inhiban específicamente la activación del complemento.

30 Actualmente, es ampliamente aceptado que el sistema del complemento se puede activar a través de tres vías diferentes: la vía clásica, la vía de las lectinas, y la vía alternativa. La vía clásica se desencadena generalmente por un anticuerpo unido a una partícula foránea (es decir, un antígeno) y por lo tanto requiere una exposición previa a ese antígeno para la generación de anticuerpos específicos. Puesto que la activación de la vía clásica se asocia con el desarrollo de una respuesta inmunitaria, la vía clásica es parte del sistema inmunitario adquirido. Por el contrario, las vías tanto de las lectinas como alternativa son independientes de la inmunidad clonal y son parte del sistema inmunitario innato.

40 La primera etapa en la activación de la vía clásica es la unión de una molécula de reconocimiento específico, C1q, a IgG e IgM unidas al antígeno. La activación del sistema del complemento da como resultado la activación sucesiva de zimógenos de serina proteasa. C1q está asociada con las proenzimas serina proteasa C1r y C1s en forma de un complejo llamado C1 y, tras la unión de C1q a un complejo inmunitario, la escisión autoproteolítica del sitio Arg-Ile de C1r está seguida por la activación por C1r de C1s, que de ese modo adquiere la capacidad para 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 posterior generación de convertasa de C3 (C4b2b) a través de una interacción no covalente con el fragmento C2b de C2 activado. La convertasa de C3 (C4b2b) activa C3 conduciendo a la generación de la convertasa de C5 (C4b2b3b) y a la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b-9) que pueden causar la lisis microbiana. Las formas activadas de C3 y C4 (C3b y C4b) se depositan de forma covalente sobre las superficies diana foráneas, que son reconocidas por los receptores del complemento sobre múltiples fagocitos.

50 Independientemente, la primera etapa en la activación del sistema del complemento por la vía de las lectinas es también la unión de las moléculas de reconocimiento específico, que está seguida por la activación de las serina proteasas asociadas. Sin embargo, en lugar de la unión de complejos inmunitarios por C1q, las moléculas de reconocimiento en la vía de las lectinas son proteínas de unión 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. demostraron primero que, al igual que C1q, MBL podría activar el sistema del complemento tras la unión a eritrocitos recubiertos de manano de levadura de una manera dependiente de C4 (K. Ikeda et al., *J. Biol. Chem.* 262:7451-7454, 1987). La MBL, un miembro de la familia de proteínas colectinas, es una lectina dependiente de calcio que se une a los

carbohidratos con 3 y 4 grupos hidroxilo orientados en el plano ecuatorial del anillo de piranosa. Los ligandos prominentes de MBL por lo tanto son D-manosa y N-acetil-D-glucosamina, mientras que los carbohidratos que no se ajustan a este requerimiento estérico tienen una afinidad indetectable por MBL (Weis, W.I., et al., *Nature* 360:127-134, 1992). La interacción entre MBL y los azúcares monovalentes es extremadamente débil, con constantes de disociación típicamente en el intervalo 2 mM. La MBL logra una unión específica, estrecha a ligandos de glicano por interacción con múltiples residuos de monosacárido simultáneamente (Lee, R.T., et al., *Archiv. Biochem. Biophys.* 299:129-136, 1992). La MBL reconoce los patrones de carbohidratos que comúnmente decoran microorganismos tales como bacterias, levaduras, parásitos y ciertos virus. Por el contrario, la MBL no reconoce la D-galactosa ni el ácido siálico, penúltimo y último azúcares que normalmente decoran los productos glicoconjugados complejos "maduros" presentes en el plasma de los mamíferos y las glicoproteínas de la superficie celular. Se cree que esta especificidad de unión ayuda a proteger de la auto-activación. Sin embargo, la MBL no se une con alta afinidad a agrupaciones de glicanos "precursores" de alto contenido de manosa sobre glicoproteínas y glicolípidos unidos a N secuestrados en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi de células de mamífero (Maynard, Y., et al., *J. Biol. Chem.* 257:3788-3794, 1982). Por lo tanto, las células dañadas son dianas potenciales para la activación de la vía de las lectinas a través de la unión de MBL.

Las ficolinas poseen un tipo diferente de dominio de lectina que MBL, llamado dominio de tipo fibrinógeno. Las ficolinas se unen a residuos de azúcar de una manera independiente de Ca^{++} . En los seres humanos, se han identificado tres tipos de ficolinas, L-ficolina, M-ficolina y H-ficolina. Ambas ficolinas del suero, L-ficolina y H-ficolina, tienen en una especificidad común para N-acetil-D-glucosamina; sin embargo, la H-ficolina también se une 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 dirigirse a diferentes, aunque solapantes, productos glicoconjugados. Este concepto está apoyado por el reciente informe de que, de las lectinas conocidas en la vía de las lectinas, sólo la L-ficolina se une específicamente al ácido lipoteicoico, un producto glicoconjugado de la pared celular encontrado en todas las bacterias Gram-positivas (Lynch, N.J., et al., *J. Immunol.* 172:1198-1202, 2004). Las colectinas (es decir, MBL) y las ficolinas no tienen ninguna similitud significativa en la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, los dos grupos de proteínas tienen organizaciones de dominios similares y, como C1q, se ensamblan en estructuras oligoméricas, que maximizan la posibilidad de unión a múltiples sitios. Las concentraciones en suero de MBL son muy variables en poblaciones sanas y esto es controlado genéticamente por los polimorfismos/mutaciones, en las regiones tanto promotoras como codificantes del gen de MBL. Como una proteína de fase aguda, la expresión de MBL es regulada al alza adicionalmente durante la inflamación. La L-ficolina está presente en el suero a concentraciones similares a las de MBL. Por lo tanto, la fuerza de la rama de L-ficolina de la vía de las lectinas es potencialmente comparable a la de la rama de MBL. La MBL y las ficolinas también pueden funcionar como opsoninas, que requieren la interacción de estas proteínas con los receptores de los fagocitos (Kuhlman, M., et al., *J. Exp. Med.* 169:1733, 1989; Matsushita, M., et al., *J. Biol. Chem.* 271:2448-54, 1996). Sin embargo, no se han establecido las identidades del receptor o los receptores sobre las células fagocíticas.

La MBL humana forma una interacción específica y de alta afinidad a través de su dominio de tipo colágeno con las serina proteasas de tipo C1r/C1s únicas, denominadas serina proteasas asociadas a MBL (MASP). Hasta la fecha, se han descrito tres MASP. En primer lugar, se identificó una sola enzima "MASP" y se caracterizó como la enzima responsable del inicio de la cascada del complemento (es decir, la escisión de C2 y C4) (Ji, Y.H., et al., *J. Immunol.* 150:571-578, 1993). Más tarde, resultó que MASP es de hecho una mezcla de dos proteasas: MASP-1 y MASP-2 (Thiel, S., et al., *Nature* 386:506-510, 1997). Sin embargo, se demostró que el complejo MBL-MASP-2 por sí solo es suficiente para la activación del complemento (Vorup-Jensen, T., et al., *J. Immunol.* 165:2093-2100, 2000). Además, sólo MASP-2 escinde C2 y C4 a tasas elevadas (Ambrus, G., et al., *J. Immunol.* 170:1374-1382, 2003). Por lo tanto, MASP-2 es la proteasa responsable de la activación de C4 y C2 para generar la convertasa de C3, C4b2b. Esta es una diferencia significativa con el complejo C1, donde la acción coordinada de dos serina proteasas específicas (C1r y C1s) conduce a la activación del sistema del complemento. Recientemente, se ha aislado una tercera proteasa novedosa, MASP-3 (Dahl, M.R., et al., *Immunity* 15:127-35, 2001). MASP-1 y MASP-3 son productos empalmados alternativamente del mismo gen. Las funciones biológicas de MASP-1 y MASP-3 aún no se han resuelto.

Las MASP comparten organizaciones de dominios idénticas con las de C1r y C1s, los componentes enzimáticos del complejo C1 (Sim, R.B., et al., *Biochem. Soc. Trans.* 28:545, 2000). Estos dominios incluyen un dominio N-terminal C1r/C1s/Vegf de erizo de mar/proteína morfogénica ósea (CUB), un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico, un segundo dominio CUB, un tándem de dominios de la proteína de control del complemento, y un dominio de serina proteasa. Al igual que en las convertasa de C1, la activación de MASP-2 se produce a través de la escisión de un enlace Arg-Ile adyacente al dominio serina proteasa, que divide la enzima en las cadenas A y B unidas por puentes disulfuro, consistiendo la última en el dominio serina proteasa. Recientemente, se ha descrito una deficiencia determinada genéticamente de MASP-2 (Stengaard-Pedersen, K., et al., *New Eng. J. Med.* 349:554-560, 2003). La mutación de un solo nucleótido conduce a un intercambio Asp-Gly en el dominio CUB1 y hace que MASP-2 sea incapaz de unirse a MBL.

La MBL también se asocia con una proteína no enzimática conocida como proteína asociada a MBL de 19 kDa (MAp19) (Stover, C.M., *J. Immunol.* 162:3481-90, 1999) proteína asociada a MBL pequeña (SMAP) (Takahashi, M., et al., *Int. Immunol.* 11:859-863, 1999). MAp19 se forma por corte y empalme alternativo del producto del gen *MASP 2* y comprende los dos primeros dominios de MASP-2, seguidos por una secuencia adicional de cuatro aminoácidos únicos. Los genes *MASP 1* y *MASP 2* están localizados sobre 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 suero no forman complejo con MBL (Thiel, S., et al., *J. Immunol.* 165: 878-887, 2000). Tanto la H- como L-ficolina están asociadas con MASP y activan la vía de las lectinas del complemento, como lo hace MBL (Dahl, M.R., et al., *Immunity* 15:127-35, 2001; Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 168:3502-3506, 2002). Las vías tanto de las lectinas como clásica forman una convertasa de C3 común (C4b2b) y las dos vías convergen en esta etapa.

Se cree ampliamente que la vía de las lectinas tiene un papel importante en la defensa del anfitrión contra la infección. La fuerte evidencia de la implicación de MBL en la defensa del anfitrión procede del análisis de los pacientes con disminución de los niveles séricos de MBL funcional (Kilpatrick, D.C., *Biochim. Biophys. Acta* 1572:401-413, 2002). Tales pacientes presentan susceptibilidad a las infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes. Estos síntomas suelen ser evidentes temprano en la vida, durante una ventana aparente de vulnerabilidad a medida que el título de anticuerpos maternos se desvanece, pero antes de que se desarrolle un repertorio completo de las respuestas de anticuerpos. Este síndrome a menudo es el resultado de mutaciones en varios sitios en la parte colagenosa de MBL, que interfieren en la formación adecuada de los oligómeros de MBL. Sin embargo, puesto que MBL puede funcionar como una opsonina independiente del complemento, no se sabe en qué medida el aumento de la susceptibilidad a la infección se debe a la alteración de la activación del complemento.

Aunque existe una amplia evidencia que involucra a las vías del complemento tanto clásica como alternativa en la patogénesis de las enfermedades humanas no infecciosas, la función de la vía de las lectinas está empezando a ser evaluada. Estudios recientes proporcionan pruebas de que la activación de la vía de las lectinas puede ser responsable de la activación del complemento y la inflamación relacionada en la lesión por isquemia/reperfusión. Collard et al. (2000) informaron de que las células endoteliales cultivadas sometidas a estrés oxidativo se unen a MBL y muestran un depósito de C3 tras la exposición a suero humano (Collard, C.D., et al., *Am. J. Pathol.* 156:1549-1556, 2000). Además, el tratamiento de sueros humanos con anticuerpos monoclonales anti-MBL de bloqueo inhibe la unión de MBL y la activación del complemento. Estos resultados se extendieron a un modelo de rata de isquemia-reperfusión del miocardio en el que las ratas tratadas con un anticuerpo de bloqueo dirigido contra MBL de rata mostraron significativamente menos daño del miocardio tras la oclusión de una arteria coronaria que las ratas tratadas con un anticuerpo de control (Jordan, J.E., et al., *Circulation* 104:1413-1418, 2001). El mecanismo molecular de la MBL que se une al endotelio vascular después del estrés oxidativo no está claro; un estudio reciente sugiere que la activación de la vía de las lectinas después del estrés oxidativo puede estar mediada por la unión de MBL a citoqueratinas endoteliales vasculares, y no a productos glicoconjugados (Collard, C.D., et al., *Am. J. Pathol.* 159:1045-1054, 2001). Otros estudios han involucrado las vías clásica y alternativa en la patogénesis de la lesión por isquemia/reperfusión y el papel de la vía de las lectinas en esta enfermedad sigue siendo controvertido (Riedermann, N.C., et al., *Am. J. Pathol.* 162:363-367, 2003).

En contraste con la vía clásica y de las lectinas, no se han encontrado iniciadores de la vía alternativa que satisfagan las funciones de reconocimiento que realizan C1q y las lectinas en las otras dos vías. Actualmente está ampliamente aceptado que la vía alternativa se activa espontáneamente por superficies extrañas u otras superficies anormales (bacterias, levadura, células infectadas por virus, o tejido dañado). Hay cuatro proteínas plasmáticas implicadas directamente en la vía alternativa: C3, factores B y D, y properdina. Se requiere la generación proteolítica de C3b a partir de C3 nativo para que la vía alternativa funcione. Dado que la convertasa de C3 de la vía alternativa (C3bBb) contiene C3b como una subunidad esencial, la pregunta sobre el origen del primer C3b a través de la alternativa ha presentado un problema desconcertante y ha estimulado una investigación considerable.

C3 pertenece a una familia de proteínas (junto con C4 y α -2 macroglobulina) que contienen una modificación postraduccional rara conocida como un enlace tioéster. El grupo tioéster está compuesto por una glutamina cuyo grupo carbonilo terminal está unido al grupo sulfhidrilo de una cisteína a tres aminoácidos de distancia. Este enlace es inestable y el grupo carbonilo electrófilo de la glutamina puede formar un enlace covalente con otras moléculas a través de grupos hidroxilo o amino. El enlace tioéster es razonablemente estable cuando se secuestra dentro de un bolsillo hidrófobo de C3 intacto. Sin embargo, la escisión proteolítica de C3 a C3a y C3b da como resultado la exposición del enlace tioéster altamente reactivo en C3b y por este mecanismo C3b se une covalentemente a una diana. Además de su papel bien documentado en la unión covalente de C3b a dianas del complemento, también se cree que el tioéster de C3 tiene un papel fundamental en la activación de la vía alternativa. De acuerdo con la "teoría de activación al ralentí", ampliamente aceptada, la vía alternativa se inicia mediante la generación de una convertasa de fase fluida, iC3Bb, que se forma a partir de C3 con el tioéster hidrolizado (iC3; C3(H₂O)) y el factor B (Lachmann, P.J., et al., *Springer Semin. Immunopathol.* 7:143-162, 1984). El iC3 de tipo C3b se genera a partir de C3 nativa por una 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 de iC3Bb, las moléculas de C3b se depositan sobre la superficie de la diana iniciando de este modo la vía alternativa.

Muy poco se sabe acerca de los iniciadores de la activación de la vía alternativa. Se cree que los activadores incluyen paredes celulares de levadura (zimosano), muchos polisacáridos puros, eritrocitos de conejo, ciertas inmunoglobulinas, virus, hongos, bacterias, células de tumores animales, parásitos y células dañadas. La única característica común a estos activadores es la presencia de carbohidratos, pero la complejidad y variedad de las estructuras de carbohidratos ha hecho que sea difícil establecer los determinantes moleculares compartidos, que

son reconocidos.

La vía alternativa también puede proporcionar un poderoso bucle de amplificación para la vía de las lectinas/clásica de la convertasa de C3 (C4b2b) ya que cualquier C3b generada puede participar con el factor B en la formación de la convertasa de C3 de la vía alternativa adicional (C3bBb). La convertasa de C3 de la vía alternativa se estabiliza mediante la unión de properdina. La properdina amplía la semivida de la convertasa de C3 de la vía alternativa de seis a diez veces. La adición de C3b a la convertasa de C3 conduce a la formación de la convertasa de C5 de la vía alternativa.

Se ha pensado que las tres vías (es decir, la clásica, la de las lectinas y la alternativa) convergen en C5, que se escinde para formar productos con múltiples efectos proinflamatorios. La vía convergente se ha referido como la vía del complemento terminal. C5a es la anafilatoxina más potente, lo que induce alteraciones en el músculo liso y el tono vascular, así como en la permeabilidad vascular. Es también una potente quimiotaxina y activadora de neutrófilos y monocitos. La activación celular mediada por C5a puede amplificar significativamente respuestas inflamatorias induciendo la liberación de múltiples mediadores inflamatorios adicionales, incluyendo citoquinas, enzimas hidrolíticas, metabolitos de ácido araquidónico y especies reactivas del oxígeno. La escisión de C5 conduce a la formación de C5b-9, también conocido como complejo de ataque a la membrana (MAC). En la actualidad existe una fuerte evidencia de que el depósito de MAC sublítico puede desempeñar un papel importante en la inflamación además de su papel como complejo formador de poros lítico.

Compendio

La presente invención proporciona un agente inhibidor de MASP-2 que es un anticuerpo contra MASP-2 o un fragmento del mismo que se une a una porción del SEQ ID NO: 6 para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece, o está en riesgo de desarrollar, coagulación intravascular diseminada.

Se describe un método de inhibición de 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 necesite, una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2. En este contexto, la expresión "activación del complemento dependiente de MASP-2" se refiere a la activación del complemento de la vía alternativa que se produce a través del sistema de MASP-2 dependiente de lectina. El agente inhibidor de MASP-2 puede inhibir la activación del complemento a través del sistema de MASP-2 dependiente de lectina sin inhibir sustancialmente la activación del complemento a través del sistema clásico o dependiente de C1q, de manera que el sistema dependiente de C1q sigue siendo funcional.

El agente inhibidor de MASP-2 es un anticuerpo contra MASP-2 o fragmento del mismo. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-MASP-2 tiene una función efectora reducida. También se describe en la presente memoria un péptido inhibidor de MASP-2 o un inhibidor de MASP-2 no peptídico.

Se han descrito composiciones para la inhibición de 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 portador farmacéuticamente aceptable. También se proporcionan métodos para la fabricación de un medicamento para su uso en la inhibición de los efectos adversos de la activación del complemento dependiente de MASP-2 en sujetos vivos que lo necesitan, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un portador farmacéutico. También se proporcionan métodos para fabricación de medicamentos para su uso en la inhibición de la activación del complemento dependiente de MASP-2 para el tratamiento de cada una de las afecciones, enfermedades y trastornos descritos en la presente memoria a continuación.

Los métodos, composiciones y medicamentos descritos en la presente memoria son útiles para inhibir los efectos adversos de la activación del complemento dependiente de MASP-2 *in vivo* en sujetos mamíferos, incluyendo seres humanos que padecen una afección patológica aguda o crónica o una lesión tal como se describe adicionalmente en la presente memoria. Tales afecciones y lesiones incluyen, sin limitación la activación del complemento mediada por MASP-2 en los trastornos autoinmunitarios y/o las afecciones inflamatorias asociados.

Se describen métodos para la inhibición de la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece, o está en riesgo de desarrollar, un trastorno de la coagulación, tal como un trastorno de coagulación mediado por el complemento, o una coagulopatía, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un portador farmacéutico a semejante sujeto. Las afecciones sujetas a tratamiento de acuerdo con la presente invención incluyen, a modo de ejemplo no limitante, coagulación intravascular diseminada (CID), también conocida como coagulopatía consuntiva.

Se describen métodos para la inhibición de la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece, o está en riesgo de desarrollar, un trastorno de la coagulación, que comprende administrar al sujeto una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2.

Se describen métodos para la inhibición de la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que

padece, o está en riesgo de desarrollar, un trastorno de la coagulación, que comprende administrar al sujeto una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir selectivamente la activación del complemento dependiente de MASP-2 sin inhibir sustancialmente la activación del complemento dependiente de C1q.

5 Se describen métodos para la fabricación de un medicamento para su uso en la inhibición de los efectos de la activación del complemento dependiente de MASP-2 en sujetos vivos que padecen un trastorno de la coagulación mediado por el complemento, que comprenden combinar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un portador farmacéutico.

10 Se describen métodos para tratar, prevenir, o reducir la gravedad de la coagulación intravascular diseminada en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2.

Descripción de los dibujos

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

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

15 La FIGURA 3A es un diagrama esquemático que ilustra la estructura de dominios de la proteína MASP-2 humana;

La FIGURA 3B es un diagrama esquemático que ilustra la estructura de dominios de la proteína MASP-19 humana;

La FIGURA 4 es un diagrama que ilustra la estrategia de modificación genética para inactivar ("knockout") la MASP-2 murina;

La FIGURA 5 es un diagrama que ilustra el constructo de minigenes de MASP-2 humana;

20 La FIGURA 6A presenta los resultados que demuestran que la deficiencia de MASP-2 conduce a la pérdida de la activación de C4 mediada por la vía de las lectinas tal como se mide por la falta de depósito de C4b sobre manano;

La FIGURA 6B presenta los resultados que demuestran que la deficiencia de MASP-2 conduce a la pérdida de la activación de C4 mediada por la vía de las lectinas tal como se mide por la falta de depósito de C4b sobre zimosano;

25 La FIGURA 6C presenta resultados que demuestran los niveles relativos de activación de C4 de muestras de suero obtenidas de cepas MASP-2+/-; MASP-2-/- y de tipo salvaje medida mediante el depósito de C4b sobre manano y zimosano;

La FIGURA 7A presenta resultados que demuestran que la deficiencia de MASP-2 conduce a la pérdida de la activación de C3 tanto mediada por la vía de las lectinas como mediada por la vía alternativa medida por la falta de depósito de C3b sobre manano;

30 La FIGURA 7B presenta resultados que demuestran que la deficiencia de MASP-2 conduce a la pérdida de la activación de C3 tanto mediada por la vía de las lectinas como mediada por la vía alternativa medida por la falta de depósito de C3b sobre zimosano;

35 La FIGURA 8 presenta los resultados que demuestran que la adición de MASP-2 recombinante murina a muestras de suero MASP-2 -/- recupera la activación de C4 mediada por la vía de las lectinas de una manera dependiente de la concentración de proteína, medida por el depósito de C4b sobre manano;

La FIGURA 9 presenta los resultados que demuestran que la vía clásica es funcional en la cepa MASP-2 -/-;

La FIGURA 10 presenta los resultados que demuestran que el sistema de activación del complemento dependiente de MASP-2 se activa en la fase de isquemia/reperfusión después de la reparación del aneurisma aórtico abdominal;

40 La FIGURA 11A presenta los resultados que demuestran que el anticuerpo Fab2 anti-MASP-2 núm.11 inhibe la formación de la convertasa de C3, como se describe en el Ejemplo 24;

La FIGURA 11B presenta los resultados que demuestran que el anticuerpo Fab2 anti-MASP-2 núm. 11 se une a MASP-2 de rata nativa, como se describe en el Ejemplo 24;

45 La FIGURA 11C presenta los resultados que demuestran que el anticuerpo Fab2 anti-MASP-2 núm. 41 inhibe la escisión de C4, como se describe en el Ejemplo 24;

La FIGURA 12 presenta los resultados que demuestran que también se encontró que todos los anticuerpos Fab2 anti-MASP-2 sometidos a ensayo que inhibían la formación de convertasa de C3 inhibían la escisión de C4, como se describe en el Ejemplo 24;

- La FIGURA 13 es un diagrama que ilustra los polipéptidos recombinantes derivados de MASP-2 de rata que se utilizaron para el mapeo de epítomos de los anticuerpos Fab2 de bloqueo anti-MASP-2, como se describe en el Ejemplo 25;
- 5 La FIGURA 14 presenta los resultados que demuestran la unión de Fab2 anti-MASP-2 núm. 40 y núm. 60 a polipéptidos MASP-2 de rata, como se describe en el Ejemplo 25;
- La FIGURA 15 presenta los resultados que demuestran el aclaramiento de nitrógeno de la urea en sangre para ratones de tipo salvaje (+/+) y MASP-2 (-/-) a las 24 y 48 horas de la reperusión en un modelo de lesión por isquemia/reperusión renal, como se describe en el Ejemplo 26;
- 10 La FIGURA 16A se presenta los resultados que demuestran el tamaño del infarto de ratones de tipo salvaje (+/+) y el tamaño reducido en ratones MASP-2 (-/-) después de la lesión en un modelo de oclusión y reperusión de la arteria coronaria, como se describe en el Ejemplo 27;
- La FIGURA 16B presenta los resultados que muestran la distribución de los animales individuales sometidos a ensayo en el modelo de oclusión y reperusión de la arteria coronaria, como se describe en el Ejemplo 27;
- 15 La FIGURA 17A presenta los resultados que muestran los niveles de proteína VEGF de referencia en complejo RPE-coroides aislado de ratones de tipo salvaje (+/+) y MASP-2 (-/-), como se describe en el Ejemplo 28;
- FIGURA 17B presenta los resultados que muestran los niveles de proteína VEGF en el complejo RPE-coroides el día 3 en ratones de tipo salvaje (+/+) y MASP-2 (-/-) después de la lesión inducida por láser en un modelo de degeneración macular, como se describe en el Ejemplo 28;
- 20 La FIGURA 18 presenta los resultados que muestran el volumen de neovascularización coroidea media (NVC) el día siete después de la lesión inducida por láser en ratones de tipo salvaje (+/+) y MASP-2 (-/-), como se describe en el Ejemplo 28;
- La FIGURA 19 presenta los resultados que muestran la puntuación media de la artritis clínica de ratones de tipo salvaje (+/+) y MASP-2 (-/-) con el tiempo después la artritis reumatoide inducida por mAb Col2, como se describe en el Ejemplo 29;
- 25 La FIGURA 20A es un diagrama que muestra la interrupción dirigida del gen de sMAP (Map 19), como se describe en el Ejemplo 30;
- La FIGURA 20B presenta el análisis de transferencia Southern de ADN genómico aislado de la descendencia derivada del apareamiento de ratones quiméricos sMAP (-/-) macho con ratones C57BL/6 hembra, como se describe en el Ejemplo 30;
- 30 La FIGURA 20C presenta el análisis de genotipificación por PCR de ratones de tipo salvaje (+/+) y sMAP (-/-), como se describe en el Ejemplo 30;
- La FIGURA 21A presenta el análisis de transferencia Northern de ARNm de sMAP y MASP-2 en ratones sMAP (-/-), como se describe en el Ejemplo 30;
- 35 La FIGURA 21B presenta el análisis mediante RT-PCR cuantitativa de ADNc que codifica la cadena H de MASP-2, la cadena L de MASP-2 y sMAP, en ratones de tipo salvaje (+/+) y sMAP (-/-), como se describe en el Ejemplo 30;
- La FIGURA 22A presenta una inmunotransferencia de sMAP (-/-), es decir, MAp19 (-/-), que demuestra la deficiencia de MASP-2 y sMAP en suero de ratón, como se describe en el Ejemplo 30;
- La FIGURA 22B presenta los resultados que demuestran que MASP-2 y sMAP se detectaban en el complejo de MBL-MASP-sMAP, como se describe en el Ejemplo 30;
- 40 La FIGURA 23A presenta resultados que muestran el depósito de C4 sobre pocillos recubiertos de manano en suero de ratón de tipo salvaje (+/+) y sMAP (-/-), como se describe en el Ejemplo 30;
- La FIGURA 23B presenta los resultados que muestran el depósito de C3 sobre pocillos recubiertos de manano en suero de ratón de tipo salvaje (+/+) y sMAP (-/-), como se describe en el Ejemplo 30;
- 45 La FIGURA 24A presenta los resultados que muestran la reconstitución del complejo de MBL-MASP-sMAP en suero sMAP (-/-), como se describe en el Ejemplo 30;
- Las FIGURAS 24B-D presentan los resultados que muestran la unión competitiva de rsMAP y MASP-2i a MBL, como se describe en el Ejemplo 30;
- Las FIGURAS 25A-B presentan los resultados que muestran la restauración de la actividad de depósito de C4 mediante la adición de rMASP-2, pero no de rsMAP, como se describe en el Ejemplo 30;

Las FIGURAS 26A-B presentan los resultados que muestran la reducción de la actividad de depósito de C4 mediante la adición de rsMAP, como se describe en el Ejemplo 30;

Las FIGURAS 27A-C presentan los resultados que muestran que MASP-2 es responsable de la activación mediante derivación de C4 de C3, como se describe en el Ejemplo 31;

- 5 Las FIGURAS 28A y 28B presentan las curvas de respuesta a la dosis para la inhibición del depósito de C4b (FIG. 28A) y la inhibición de la activación de trombina después de la administración de un anticuerpo Fab2 contra MASP-2 en suero de rata normal, como se describe en el Ejemplo 32;

- 10 Las FIGURAS 29A y 29B presentan la agregación de plaquetas medida (expresada como área de agregación) en MASP-2 (-/-) (Fig. 29B) en comparación con la agregación de plaquetas en ratones de tipo salvaje no tratados y ratones de tipo salvaje en los que se inhibe la vía del complemento por medio de un agente de empobrecimiento de factor de veneno de cobra (CVF) y un inhibidor de la vía terminal (antagonista de C5aR) (FIGURA 29A) en un modelo de reacción de Schwartzman localizado de coagulación intravascular diseminada, como se describe en el Ejemplo 33;

- 15 Las FIGURAS 30A-30C ilustran los resultados de una investigación de recambio de C3 en plasma C4 -/- en análisis específicos, ya sea por la vía de activación clásica o de las lectinas;

La FIGURA 31A ilustra gráficamente el área en riesgo media (AAR) y los volúmenes de infarto (INF) como porcentaje de los volúmenes miocárdicos totales en ratones WT (+/+) y MASP-2 (-/-) después de someterse a oclusión y reperusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda, como se describe en el Ejemplo 34;

- 20 La FIGURA 31B ilustra gráficamente la relación entre el volumen de infarto (INF) representado frente al área en riesgo media (AAR) como un porcentaje del volumen miocárdico del ventrículo izquierdo en ratones WT (+/+) y MASP-2 (-/-) después de someterlos a oclusión y reperusión de la arteria, como se describe en el Ejemplo 34;

- 25 La FIGURA 31C ilustra gráficamente el volumen de infarto (INF) en corazones perfundidos con tampón de ratones WT (+/+) y MASP-2 (-/-) preparados de acuerdo con el modelo de corazón de ratón aislado-perfundido de Langendorff, en el que la isquemia global y la reperusión se realizaron en ausencia de suero, como se describe en el Ejemplo 34;

La FIGURA 31D ilustra gráficamente la relación entre el volumen de infarto (INF) y el área en riesgo en corazones perfundidos con tampón de ratones WT (+/+) y MASP-2 (-/-) preparados de acuerdo con el modelo de corazón de ratón aislado-perfundido de Langendorff, como se describe en el Ejemplo 34;

- 30 La FIGURA 32 ilustra gráficamente los niveles de nitrógeno ureico en sangre (NUS) medidos en ratones receptores de trasplante WT (+/+) (B6) o MASP-2 (-/-) de riñones de donantes WT (+/+), como se describe en el Ejemplo 35;

La FIGURA 33 ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones WT (+/+) y MASP-2 (-/-) como una función del número de días después de la infección microbiana en el modelo de ligadura y punción cecal (CLP), como se describe en el Ejemplo 36;

- 35 La FIGURA 34 ilustra gráficamente el número de bacterias medido en WT (+/+) y MASP-2 (-/-) después de la infección microbiana en el modelo de ligadura y punción cecal (CLP), como se describe en el Ejemplo 36;

La FIGURA 35 es un gráfico de Kaplan-Mayer que ilustra el porcentaje de supervivencia de ratones WT (+/+), MASP-2 (-/-) y C3 (-/-) seis días después de la sensibilización con administración intranasal de *Pseudomonas aeruginosa*, como se describe en Ejemplo 37;

- 40 La FIGURA 36 ilustra gráficamente el nivel de depósito de C4b, medido como % de control, en las muestras tomadas en varios puntos temporales después de la administración subcutánea de 0,3 mg/kg o 1,0 mg/kg de anticuerpo monoclonal anti-MASP-2 de ratón en ratones WT, como se describe en el Ejemplo 38;

La FIGURA 37 ilustra gráficamente el nivel de depósito de C4b, medido como % de control, en las muestras tomadas en varios puntos temporales después de la administración ip de 0,6 mg/kg de anticuerpo monoclonal anti-MASP-2 de ratón en ratones WT, como se describe en el Ejemplo 38;

- 45 La FIGURA 38 ilustra gráficamente el volumen medio de neovascularización coroidea (NVC) el día siete después de la lesión inducida por láser en ratones WT (+/+) pre-tratados con una sola inyección ip de 0,3 mg/kg o 1,0 mg/kg de anticuerpo monoclonal anti-MASP-2 de ratón; como se describe en el Ejemplo 39;

La FIGURA 39A ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones MASP-2 (-/-) y WT (+/+) después de la infección con 5×10^8 ufc/100 μ l de *N. meningitidis*, como se describe en el Ejemplo 40;

- 50 La FIGURA 39B ilustra gráficamente el log ufc/ml de *N. meningitidis* recuperado en diferentes puntos temporales en muestras de sangre tomadas de ratones MASP-2 KO (-/-) y WT (+/+) infectados con 5×10^8 ufc/100 μ l de *N. meningitidis*, como se describe en el Ejemplo 40;

La FIGURA 40A ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones MASP-2 KO (-/-) y WT (+/+) después de la infección con 2×10^8 ufc/100 μ l de *N. meningitidis*, como se describe en el Ejemplo 40;

5 La FIGURA 40B ilustra gráficamente el log ufc/ml de *N. meningitidis* recuperado en diferentes puntos temporales en muestras de sangre tomadas de ratones WT (+/+) infectados con 2×10^8 ufc/100 μ l de *N. meningitidis*, como se describe en el Ejemplo 40; y

La FIGURA 40C ilustra gráficamente el log ufc/ml de *N. meningitidis* recuperado en diferentes puntos temporales en muestras de sangre tomadas de ratones MASP-2 (-/-) infectados con 2×10^8 ufc/100 μ l de *N. meningitidis*, como se describe en el Ejemplo 40.

DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 SEQ ID NO: 1 ADNc de MAp19 humana
- SEQ ID NO: 2 proteína MAp19 humana (con líder)
- SEQ ID NO: 3 proteína MAp19 humana (madura)
- SEQ ID NO: 4 ADNc de MASP-2 humana
- SEQ ID NO: 5 proteína MASP-2 humana (con líder)
- 15 SEQ ID NO: 6 proteína MASP-2 humana (madura)
- SEQ ID NO: 7 ADNg de MASP-2 humana (exones 1-6)
- ANTÍGENOS: (EN REFERENCIA A LA PROTEÍNA MASP-2 MADURA)
- SEQ ID NO: 8 secuencia de CUBI (aa 1-121)
- SEQ ID NO: 9 secuencia de CUBEGF (aa 1-166)
- 20 SEQ ID NO: 10 CUBEGFCUBII (aa 1-293)
- SEQ ID NO: 11 región EGF (aa 122-166)
- SEQ ID NO: 12 dominio de serina proteasa (aa 429-671)
- SEQ ID NO: 13 dominio inactivo de serina proteasa (aa 610-625 con mutación Ser618 a Ala)
- SEQ ID NO: 14 TPLGPKWPEPVFGRL (péptido CUBI)
- 25 SEQ ID NO: 15 TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ (péptido CUBI)
- SEQ ID NO: 16 TFRSDYSN (núcleo de la región de unión a MBL)
- SEQ ID NO: 17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (región de unión a MBL)
- SEQ ID NO: 18 IDECQVAPG (PÉPTIDO EGF)
- SEQ ID NO: 19 ANMLCAGLESGGKDSRCRGGSGALV (núcleo de unión a serina proteasa) Descripción detallada
- 30 PÉPTIDOS INHIBIDORES:
- SEQ ID NO: 20 ADNc completo de MBL
- SEQ ID NO: 21 proteína MBL completa
- SEQ ID NO: 22 OGK-X-GP (unión consenso)
- SEQ ID NO: 23 OGKLG
- 35 SEQ ID NO: 24 GLR GLQ GPO GKL GPO G
- SEQ ID NO: 25 GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GPO GPO
- SEQ ID NO: 26 GKDGRDGTKGEKGEPEGQGLRGLQGPOGKLGPOG
- SEQ ID NO: 27 GAOGSOGEEKGAOGPQGPOGPOGKMGPKGEOGDO (h-ficolina humana)
- SEQ ID NO: 28

GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOGPNGAOGEO (ficolina p35 humana)

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

INHIBIDORES DE LA EXPRESIÓN:

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

5 SEQ ID NO: 31 5' CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC 3'

Nucleótidos 12-45 del SEQ ID NO: 4, que incluye el sitio de inicio de la traducción de MASP-2 (efector)

SEQ ID NO: 32 5' GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG 3'

Nucleótidos 361-396 del SEQ ID NO: 4 que codifica una región que comprende el sitio de unión a MBL de MASP-2 (efector)

10 SEQ ID NO: 33 5' AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAAA 3'

Nucleótidos 610-642 del SEQ ID NO: 4 que codifica una región que comprende el dominio CUBII

CEBADORES DE CLONACIÓN:

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

SEQ ID NO: 35 GGAATTCCTAGGCTGCATA (3' PCR para CUB)

15 SEQ ID NO: 36 GGAATTCCTACAGGGCGCT (3' PCR para CUBIEGF)

SEQ ID NO: 37 GGAATTCCTAGTAGTGGAT (3' PCR para CUBIEGFCUBII)

SEQ ID NO: 38-47 son cebadores para la clonación del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 48 es un enlace peptídico de 9 aa

VECTOR DE EXPRESIÓN:

20 SEQ ID NO: 49 es el inserto del minigen de MASP-2

SEQ ID NO: 50 es el ADNc de MASP-2 murino

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

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

SEQ ID NO: 53 es el ADNc de MASP-2 de rata

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

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

SEQ ID NO: 56-59 son los oligonucleótidos para la mutagénesis dirigida al sitio de MASP-2 humana utilizados para generar MASP-2A humana

30 SEQ ID NO: 60-63 son los oligonucleótidos para la mutagénesis dirigida al sitio de MASP-2 murina utilizados para generar MASP-2A murina

SEQ ID NO: 64-65 son los oligonucleótidos para la mutagénesis dirigida al sitio de MASP-2 de rata utilizados para generar MASP-2A de rata

Descripción detallada

35 La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento por parte de los autores de la presente invención de que se necesita MASP-2 para iniciar la activación de la vía alternativa del complemento. Mediante el uso de un modelo de ratón con un gen desactivado MASP-2 $-/-$, los autores de la presente invención han demostrado que es posible inhibir la activación de la vía alternativa del complemento a través de la vía de MASP-2 mediada por las lectinas, dejando la vía clásica intacta, estableciendo así la activación de MASP-2 dependiente de lectinas como un requisito para la activación alternativa del complemento en ausencia de la vía clásica. La presente invención también describe el uso de MASP-2 como una diana terapéutica para la inhibición de la lesión celular asociada con la activación de la vía alternativa del complemento mediada por lectinas, dejando intacto el componente de la vía clásica (dependiente de C1q) del sistema inmunitario.

40

I. DEFINICIONES

A menos que se defina específicamente en la presente memoria, todos los términos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que comprenderían los expertos normales en la técnica de la presente invención. Las siguientes definiciones se proporcionan con el fin de proporcionar claridad con respecto a los términos que se utilizan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones para describir la presente invención.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "activación del complemento dependiente de MASP-2" se refiere a la activación del complemento por la vía alternativa que se produce a través de la activación de MASP-2 dependiente de las lectinas.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "vía alternativa" se refiere a la activación del complemento que es desencadenada, por ejemplo, por el zimosano de las paredes celulares de hongos y levaduras, lipopolisacáridos (LPS) de membranas externas Gram negativas y eritrocitos de conejo, así como de muchos polisacáridos puros, eritrocitos de conejo, virus, bacterias, células de tumores animales, parásitos y células dañadas y que tradicionalmente se ha pensado que surgen de la generación espontánea proteolítica de C3b del factor del complemento C3.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "vía de las lectinas" se refiere a la activación del complemento que se produce a través de la unión específica de proteínas de que se unen a carbohidratos del suero y que no están contenidas en el suero que incluyen la lectina de unión a manano (MBL) y las ficolinas.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "vía clásica" se refiere a la activación del complemento que se desencadena por anticuerpo unido a una partícula foránea y requiere la unión de la molécula de reconocimiento C1q.

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

Según se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de los mismos, derivados de cualquier mamífero productor de anticuerpos (p. ej., ratón, rata, conejo, y primate incluyendo seres humanos), que se unen específicamente a polipéptidos MASP-2 o porciones de los mismos. Los anticuerpos ilustrativos incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales y recombinantes; anticuerpos multispecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos); anticuerpos humanizados; anticuerpos murinos; anticuerpos monoclonales quiméricos, ratón-humano, ratón-primate, primate-humano; y anticuerpos anti-idiotipo, y pueden ser cualquier molécula intacta o fragmento de la misma.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción derivada de o relacionada con un anticuerpo completo anti-MASP-2, incluyendo generalmente la región de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos ilustrativos de los fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ y Fv, fragmentos scFv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Según se utiliza en la presente memoria, un fragmento de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprende los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L, lo que permite que se forme la estructura scFv deseada para la unión al antígeno.

Según se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo quimérico" es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y las regiones determinantes de la complementariedad derivados de un anticuerpo de una especie no humana (p. ej., roedor), mientras que el resto de la molécula de anticuerpo deriva de un anticuerpo humano.

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

Según se utiliza en la presente memoria, el término "lectina de unión a manano" ("MBL") es equivalente a proteína de unión a manano ("MBP").

5 Según se utiliza en la presente memoria, el "complejo de ataque a la membrana" ("MAC") se refiere a un complejo de los cinco componentes terminales del complemento (C5-C9) que se inserta en e interrumpe las membranas. También se conoce como C5b-9.

Según se utiliza en la presente memoria, "un sujeto" incluye todos los mamíferos, incluyendo sin limitación seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, caballos, ovejas, cabras, vacas, conejos, cerdos y roedores.

10 Según se utiliza en la presente memoria, los residuos de aminoácidos se abrevian como sigue: alanina (Ala; A), asparragina (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).

15 En el sentido más amplio, los aminoácidos de origen natural se pueden dividir en grupos basándose en la característica química de la cadena lateral de los respectivos aminoácidos. Por aminoácido "hidrófobo" se quiere significar cualquiera de Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys o Pro. Por aminoácido "hidrófilo" se quiere significar cualquiera de Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg o His. Esta agrupación de aminoácidos puede ser subclasificada adicionalmente como sigue. Por aminoácidos "hidrófilos no cargados" se quiere significar cualquiera de Ser, Thr, Asn o Gln. Por aminoácido "ácido" se quiere significar cualquiera de Glu o Asp. Por aminoácido "alcalino" se quiere significar cualquiera de Lys, Arg o His.

20 Según se utiliza en la presente memoria, el término "sustitución de aminoácidos conservativa" es ilustrado por 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 asparragina, y (6) lisina, arginina e histidina.

25 El término "oligonucleótido" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término también abarca las oligonucleobases compuestas por nucleótidos de origen natural, azúcares y conexiones internucleosídicas covalentes (cadena principal), así como oligonucleótidos que tienen modificaciones de origen no natural.

II. LA VÍA ALTERNATIVA: UNA NUEVA COMPRENSIÓN

30 La vía alternativa del complemento fue descrita por primera vez por Louis Pillemer y sus colegas a principios de la década de 1950 basándose en estudios en los que se utilizó zimosano elaborado de 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 zimosano se considera el ejemplo canónico de un activador específico de la vía alternativa en el suero humano y de roedor (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 análisis conveniente y ampliamente utilizado para la activación de la vía alternativa es la incubación de suero con zimosano aplicado como recubrimiento sobre pocillos de plástico y la determinación de la cantidad de depósito de C3b sobre la fase sólida después de la incubación. Como era de esperar, hay un depósito de C3b sustancial sobre pocillos recubiertos con zimosano después de la incubación con suero normal de ratón (FIGURA 7B). Sin embargo, la incubación de suero de ratones con deficiencia de MASP-2 homocigotos con pocillos recubiertos con zimosano da como resultado una reducción sustancial del depósito de C3b en comparación con la de suero normal. Además, el uso de suero de ratones heterocigotos para la deficiencia de gen *MASP 2* en este análisis da como resultado niveles de depósito de C3b que son intermedios entre los obtenidos con el suero de ratones con deficiencia de MASP-2 homocigotos y suero de ratón normal. También se obtienen resultados paralelos utilizando pocillos recubiertos con manano, otro polisacárido que se sabe que activa la vía alternativa (FIGURA 7A). Dado que los ratones normales y con deficiencia de MASP-2 comparten el mismo fondo genético, a excepción del gen *MASP 2*, estos resultados inesperados demuestran que MASP-2 juega un papel esencial en la activación de la vía alternativa.

50 Estos resultados proporcionan 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 actuales y los últimos artículos de revisión sobre el complemento. La opinión científica actual y muy extendida es que la vía alternativa se activa sobre la superficie de ciertas dianas particuladas (microbios, zimosano, eritrocitos de conejo) a través de la amplificación de la activación de C3 "al ralenti" espontánea. Sin embargo, la ausencia de activación de la vía alternativa significativa en el suero de ratones con el gen MASP-2 desactivado por dos "activadores" bien conocidos de la vía alternativa hace que sea poco probable que la "teoría del ralenti" describa un mecanismo fisiológico importante para la activación del complemento.

Puesto que se sabe que la proteasa MASP-2 tiene un papel específico y bien definido como enzima responsable del inicio de la cascada del complemento de las lectinas, estos resultados implican la activación de la vía de las lectinas por zimosano y manano como una primera etapa crítica para la activación subsiguiente de la vía alternativa. C4b es

un producto de activación generado por la vía de las lectinas, pero no por la vía alternativa. De acuerdo con este concepto, la incubación de suero de ratón normal con pocillos recubiertos con zimosano o manano da como resultado el depósito de C4b sobre los pocillos y este depósito de C4b se reduce sustancialmente cuando los pocillos recubiertos se incuban con suero de ratones con deficiencia de MASP-2 (FIGURAS 6A, 6B y 6C).

5 La vía alternativa, además de su papel ampliamente aceptado como vía independiente para la activación del complemento, también puede proporcionar un bucle de amplificación para la activación del complemento inicialmente desencadenada a través de la vía clásica y de las lectinas (Liszewski, M.K. y J.P. Atkinson, 1993, en *Fundamental Immunology*, tercera edición, editado por W.E. Paul, Raven Press, Ltd., Nueva York; Schweinie, J.E., et al., *J. Clin. Invest.* 84:1821-1829, 1989). En este mecanismo de amplificación mediada por la vía alternativa, la convertasa de C3 (C4b2b) generada por la activación de cualquiera de las cascadas del complemento clásica o de lectinas escinde C3 a C3a y C3b, y por lo tanto proporciona C3b que puede participar en la formación de C3bBb, la convertasa de C3 de la vía alternativa. La explicación probable para la ausencia de activación de la vía alternativa en la suero con MASP-2 desactivado es que se requiere la vía de las lectinas para la activación inicial del complemento por zimosano, manano, y otros "activadores" supuestos de la vía alternativa, mientras que la vía alternativa juega un importante papel para la amplificación de la activación del complemento. En otras palabras, la vía alternativa es un bucle de amplificación por realimentación dependiente de las vías del complemento de las lectinas y clásica para la activación, en lugar de una cascada lineal independiente.

En lugar de que la cascada del complemento sea activada a través de tres vías diferentes (vías clásica, alternativa y de lectinas) según lo previsto anteriormente, los resultados de los autores de la presente invención indican que es más preciso contemplar que el complemento está compuesto por dos sistemas principales, que corresponden, en una primera aproximación, a las alas innata (lectinas) y adquirida (clásica) del sistema de defensa inmunitaria del complemento. Las lectinas (MBP, M-ficolina, H-ficolina, y L-ficolina) son las moléculas de reconocimiento específico que desencadenan el sistema del complemento innato y el sistema incluye la vía de las lectinas y el bucle de amplificación de la vía alternativa asociada. C1q es la molécula de reconocimiento específico que desencadena el sistema del complemento adquirido y el sistema incluye la vía clásica y el bucle de amplificación de la vía alternativa asociada. Los autores de la presente invención se refieren a estos dos sistemas principales de activación del complemento como el sistema del complemento dependiente de las lectinas y el sistema del complemento dependiente de C1q, respectivamente.

Además de su papel esencial en la defensa inmunitaria, el sistema del complemento contribuye al daño tisular en muchas afecciones clínicas. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar inhibidores del complemento terapéuticamente eficaces para prevenir estos efectos adversos. Con el reconocimiento de que el complemento se compone de dos sistemas principales de activación del complemento se ha evidenciado que sería muy deseable inhibir específicamente sólo el sistema de activación del complemento que causa una patología particular sin suprimir por completo las capacidades de defensa inmunitaria del complemento. Por ejemplo, en estados de enfermedad en los que la activación del complemento está mediada principalmente por el sistema del complemento dependiente de las lectinas, sería ventajoso inhibir específicamente solamente este sistema. Esto dejaría el sistema de activación del complemento dependiente de C1q intacto para manejar el procesamiento del complejo inmunitario y para ayudar en la defensa del anfitrión contra la infección.

El componente proteico preferido a elegir como diana en el desarrollo de agentes terapéuticos para inhibir específicamente el sistema del complemento dependiente de las lectinas es MASP-2. De todos los componentes proteicos del sistema del complemento dependiente de las lectinas (MBL, H-ficolina, M-Ficolina, L-ficolina, MASP-2, C2-C9, Factor B, Factor D y properdina), solo MASP-2 es único para el sistema del complemento dependiente de las lectinas y necesario 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 las lectinas. Sin embargo, la pérdida de cualquiera de los componentes de lectina no necesariamente inhibiría la activación del sistema debida a la redundancia de lectina. Sería necesario inhibir las cuatro lectinas con el fin de garantizar la inhibición del sistema de activación del complemento dependiente de las lectinas. Además, puesto que también se sabe que la MBL y las ficolinas tienen actividad de opsonización independiente del complemento, la inhibición de la función de las lectinas daría lugar a la pérdida de este mecanismo de defensa beneficioso del anfitrión contra la infección. Por el contrario, esta actividad de opsonización de lectina independiente del complemento quedaría intacta si MASP-2 fuera la diana inhibidora. Un beneficio adicional de MASP-2 como diana terapéutica para inhibir el sistema de activación del complemento dependiente de las lectinas es que la concentración plasmática de MASP-2 es de las más bajas de cualquier proteína del complemento (≈ 500 ng/ml); por lo tanto, se pueden requerir concentraciones correspondientemente bajas de inhibidores de alta afinidad de MASP-2 para obtener una inhibición completa (Moller-Kristensen, M., et al., *J. Immunol Methods* 282:159-167, 2003).

III. PAPEL DE MASP-2 EN DIVERSAS ENFERMEDADES Y AFECCIONES Y METODOS TERAPÉUTICOS QUE UTILIZAN AGENTES INHIBIDORES DE MASP-2 COAGULOPATÍAS

Han surgido indicios para el papel del sistema del complemento en la coagulación intravascular diseminada ("CID"), tal como CID secundaria a trauma corporal significativo.

Los estudios anteriores han demostrado que los ratones C4 -/- no están protegidos de la lesión por reperfusión renal. (Zhou, W., et al., "Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury", *J Clin Invest* 105:1363-1371 (2000)) Con el fin de investigar si los ratones C4 -/- todavía pueden ser capaces de activar el complemento a través de cualquiera de las vías clásica o de las lectinas, se midió el recambio de C3 en plasma C4

5 -/- en análisis específicos, para la ruta de activación por la vía clásica, o de las lectinas. Si bien no se pudo observar la escisión de C3 cuando se desencadenaba la activación a través de la clásica, se observó una activación de C3 dependiente de la vía de las lectinas muy eficiente en suero con deficiencia de C4 (FIGURA 30). Se puede observar que el depósito de C3b sobre manano y zimosano se ve gravemente comprometido en ratones MASP-2 -/-, incluso en condiciones experimentales, que de acuerdo con muchos trabajos publicados previamente sobre la activación de la vía alternativa, deben ser permisivas para las tres vías. Al utilizar los mismos sueros en pocillos recubiertos con complejos de inmunoglobulina en lugar de manano o zimosano, se observan depósitos de C3b y escisión de Factor B en sueros de ratón MASP-2 +/- y sueros MASP-2 -/-, pero no en sueros empobrecidos en C1q. Esto indica que la activación de la vía alternativa se facilita en sueros MASP-2 -/- cuando el C3b inicial se proporciona a través de la actividad clásica. La FIGURA 30C muestra el hallazgo sorprendente de que C3 puede ser activado de manera eficiente de una manera dependiente de la vía de las lectinas en plasma con deficiencia de C4.

Esta "derivación de C4" es abolida por la inhibición de la activación por la vía de las lectinas a través de la preincubación de plasma con manano o manosa solubles.

La activación no inmunitaria, aberrante del sistema del complemento es potencialmente peligrosa para el ser humano y también puede desempeñar un papel importante en la activación de la vía hematológica, particularmente en situaciones de trauma severo en donde se activan las vías tanto inflamatoria como hematológica. En un estado de salud normal, la conversión de C3 es <5% de la proteína C3 total en plasma. En un estado de infección galopante, incluyendo septicemia y enfermedad por complejo inmunitario, la conversión de C3 se restablece por sí misma en aproximadamente 30% con niveles del complemento con frecuencia más bajos de lo normal, debido a una mayor utilización y cambios en la distribución de la reserva. La activación inmediata de la vía de C3 de más de 30% generalmente produce una evidencia clínica obvia de vasodilatación y de pérdida de fluidos en los tejidos. Por encima de 30% de conversión de C3, los mecanismos iniciadores son predominantemente no inmunitarios y las manifestaciones clínicas resultantes son perjudiciales para el paciente. Los niveles de C5 del complemento en un estado de salud y de enfermedad controlada parecen mucho más estables que los de C3. Las disminuciones significativas y/o la conversión de los niveles de C5 están asociados con la respuesta del paciente a politraumatismos anómalos (*p. ej.*, accidentes de tráfico) y la probable aparición de síndromes pulmonares de choque. Por lo tanto, se puede considerar que es probable que cualquier evidencia de activación de C3 del complemento más allá del 30% de la reserva vascular o de cualquier implicación de C5, o ambos, sea un presagio de un cambio patológico dañino en el paciente.

Tanto C3 como C5 liberan anafilotoxinas (C3a y C5a) que actúan sobre los mastocitos y basófilos que liberan productos químicos vasodilatadores. Establecen gradientes quimiotácticos para guiar las células polimorfonucleares (PMN) al centro de las alteraciones inmunológicas (una respuesta beneficiosa), pero aquí se diferencia porque C5a tiene un efecto de aglutinación específica (agregación) sobre estas células fagocíticas, impidiendo su movimiento aleatorio lejos del sitio de reacción. En el control normal de la infección, C3 activa C5. Sin embargo, en los politraumatismos, C5 parece ser ampliamente activado, generando anafilotoxinas C5a sistémicamente. Esta actividad incontrolada hace que las formas polimórficas se agrupen dentro del sistema vascular, y estas masas son barridas a continuación a los capilares de los pulmones, que se ocluyen y generan efectos dañinos locales como resultado de la liberación de superóxido. Si bien no se desea estar limitado por la teoría, el mecanismo es probablemente importante en la patogénesis del síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), aunque este punto de vista recientemente ha sido cuestionado. Se puede demostrar que las anafilotoxinas C3a *in vitro* son agregadores plaquetarios potentes, pero su participación *in vivo* es menos definida y la liberación de sustancias plaquetarias y plasmína en la reparación de heridas pueden implicar sólo secundariamente C3 del complemento. Es posible que la elevación prolongada de la activación de C3 sea necesaria para generar CID.

Además de los efectos celulares y vasculares del componente del complemento activado descrito anteriormente que podría explicar el vínculo entre el trauma y CID, emergentes descubrimientos científicos han identificado enlaces moleculares directos y diafonía funcional entre los sistemas del complemento y de coagulación. Se han obtenido datos de apoyo a partir de estudios en ratones con deficiencia de C3. Debido a que C3 es el componente compartido para cada una de las vías del complemento, se prevé que los ratones con deficiencia de C3 carezcan de toda la función del complemento. Sorprendentemente, sin embargo, los ratones con deficiencia de C3 son perfectamente capaces de activar los componentes del complemento terminal. (Huber-Lang, M., et al., "Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway", *Nat. Med* 12:682-687 (2006)). Estudios en profundidad revelaron que la activación independiente de C3 de los componentes terminales del complemento está mediada por la trombina, la enzima limitante de la velocidad de la cascada de coagulación. (Huber et al., 2006). Los componentes moleculares que median la activación de la trombina después de la activación inicial del complemento siguen siendo difíciles de concretar.

Los autores de la presente invención han dilucidado lo que se cree que es la base molecular de la diafonía entre las cascadas del complemento y la coagulación y han identificado MASP-2 como un punto de control central que une los dos sistemas. Los estudios bioquímicos en la especificidad de sustrato de MASP-2 han identificado la protrombina

como un posible sustrato, además de las proteínas del complemento C2 y C4 bien conocidas. MASP-2 escinde específicamente la protrombina en los sitios funcionalmente relevantes, generando trombina, la enzima limitante de la velocidad de la cascada de coagulación. (Krarup, A., et al., "Simultaneous Activation of Complement and Coagulation by MBL-Associated Serine Protease 2", *PLoS. ONE.* 2:e623 (2007)). La trombina generada por MASP-2 es capaz de promover el depósito de fibrina en un sistema reconstituido *in vitro* definido, lo que demuestra la relevancia funcional de la escisión de MASP-2. (Krarup et al., 2007). Como se discute en los ejemplos siguientes en la presente memoria, los autores de la presente invención han corroborado adicionalmente la importancia fisiológica de este descubrimiento mediante la documentación de la activación de trombina en el suero de roedores normales después de la activación de la vía de las lectinas, y han demostrado que este procedimiento es bloqueado por la neutralización de anticuerpos monoclonales contra MASP-2.

MASP-2 puede representar un punto de ramificación central en la vía de las lectinas, capaz de promover la activación de los sistemas tanto del complemento como de la coagulación. Debido a que la activación de la vía de las lectinas es una respuesta fisiológica a muchos tipos de lesiones traumáticas, los autores de la presente invención creen que la inflamación sistémica concurrente (mediada por los componentes del complemento) y la coagulación diseminada (mediada a través de la vía de coagulación) pueden explicarse por la capacidad de MASP-2 para activar ambas vías. Estos resultados sugieren claramente un papel para MASP-2 en la generación de CID y el beneficio terapéutico de la inhibición de MASP-2 en el tratamiento o la prevención de la CID. MASP-2 puede proporcionar el enlace molecular entre el sistema del complemento y el de coagulación, y la activación de la vía de las lectinas que se produce en el entorno del trauma puede iniciar directamente la activación del sistema de coagulación a través del eje de MASP-2-trombina, proporcionando un enlace mecánico entre el trauma y la CID. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la inhibición de MASP-2 inhibiría la activación de la vía de las lectinas y reduciría la generación de ambas anafilotoxinas C3a y C5a. Se cree que la elevación prolongada de la activación de C3 es necesaria para generar CID.

Por lo tanto, se describe un método para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 para el tratamiento de la coagulación intravascular diseminada u otro trastorno de coagulación mediado por el complemento mediante la administración de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 (p. ej., anticuerpo anti-MASP-2 o fragmento del mismo, inhibidores peptídicos o inhibidores de moléculas pequeñas) en un portador farmacéutico a un sujeto que padece o está en riesgo de desarrollar tal afección. En algunos aspectos, los agentes inhibidores de MASP-2 pueden bloquear MASP-2 que ya ha sido activada. La composición inhibidora de MASP-2 se administra adecuadamente al sujeto sistémicamente, por ejemplo mediante administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, por inhalación, nasal, subcutánea o cualquier otra administración parenteral, o potencialmente mediante la administración oral de agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse de acuerdo con lo determinado por un médico hasta que la afección haya sido resuelta o esté controlada. Los métodos de este aspecto de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento de la CID secundaria a sepsis, trauma grave, incluyendo trauma neurológico (p. ej., lesión en la cabeza aguda, véase Kumura, E., et al., *Acta Neurochirurgica* 85:23-28. (1987), infección (bacteriana, viral, fúngica, parasitaria), cáncer, complicaciones obstétricas, enfermedad hepática, reacción tóxica grave (p. ej., mordedura de serpiente, picadura de insectos, reacciones transfusionales), choque, golpe de calor, rechazo de trasplantes, aneurisma vascular, insuficiencia hepática, tratamiento del cáncer mediante quimioterapia o radioterapia, quemadura, exposición accidental a radiación, y otras causas. Véase, p. ej., Becker J.U. Wira y C.R. "Disseminated Intravascular Coagulation" emedicine.medscape.com/9/10/2009. Para la CID secundaria a trauma u otro evento agudo, la composición inhibidora de MASP-2 se puede administrar inmediatamente después de la lesión traumática o profilácticamente antes de, durante, inmediatamente después, o en el plazo de uno a siete días o más, tal como en el plazo de 24 horas a 72 horas, después de una lesión inducida por trauma o situaciones como la cirugía en los pacientes considerados en riesgo de CID. En algunos aspectos, la composición inhibidora de MASP-2 puede administrarse adecuadamente en una forma de dosificación de acción rápida, por ejemplo mediante administración intravenosa o intra-arterial de un bolo de una solución que contiene la composición de agente inhibidor de MASP-2.

IV. AGENTES INHIBIDORES DE MASP-2

Se han descrito métodos para inhibir los efectos adversos 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. En la práctica de este aspecto de la invención, los agentes inhibidores de MASP-2 representativos incluyen: moléculas que inhiben la actividad biológica de MASP-2 (tales como inhibidores de molécula pequeña, anticuerpos anti-MASP-2 o péptidos de bloqueo que interactúan con MASP-2 o interfieren en la interacción proteína-proteína), y moléculas que disminuyen la expresión de MASP-2 (tales como moléculas de ácido nucleico antisentido para MASP-2, moléculas de ARNi específicas para MASP-2 y ribozimas para MASP-2), evitando de este modo que MASP-2 active las vías del complemento alternativas. Los agentes inhibidores de MASP-2 se pueden utilizar solos como una terapia primaria o combinados con otros agentes terapéuticos como terapia coadyuvante para mejorar 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 componente del sistema del complemento que se produce 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 dependiente de MASP-2 C4b,

C3a, C5a y/o C5b-9 (MAC) (medidos, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2), la reducción de la activación del complemento alternativa evaluada en un análisis hemolítico utilizando glóbulos rojos de conejo o cobaya no sensibilizados, la reducción de la escisión de C4 y el depósito de C4b (medido, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 2), o la reducción de la escisión de C3 y el depósito de C3b (medido, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2).

De acuerdo con la presente invención, se utilizan agentes inhibidores de MASP-2 que son eficaces en la inhibición del sistema de activación del complemento dependiente de MASP-2. Los agentes inhibidores de MASP-2 útiles en la práctica de este aspecto de la invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-MASP-2 y fragmentos de los mismos, 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 mediante el bloqueo de la función biológica de MASP-2. Por ejemplo, un agente inhibidor puede bloquear eficazmente las interacciones proteína-proteína de MASP-2, interferir en la dimerización o el montaje de MASP-2, bloquear la unión de Ca^{2+} , interferir en el sitio activo de la serina proteasa MASP-2, o puede reducir la expresión de la proteína MASP-2.

En algunos aspectos, los agentes inhibidores de MASP-2 inhiben selectivamente la activación del complemento por MASP-2, dejando el sistema de activación del complemento dependiente de C1q funcionalmente intacto.

En un aspecto, 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 el SEQ ID NO: 6 con una afinidad al menos diez veces mayor que a otros antígenos en el sistema del complemento. En otro aspecto, un agente inhibidor de MASP-2 se une específicamente a un polipéptido que comprende el SEQ ID NO: 6 con una afinidad de unión al menos 100 veces mayor que a otros antígenos en el sistema del complemento. La afinidad de unión del agente inhibidor de MASP-2 se puede determinar utilizando un análisis de unión adecuado.

El polipéptido 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 el SEQ ID NO: 4 codifica un ejemplo representativo de MASP-2 (que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 5) y proporciona el polipéptido MASP-2 humano con una secuencia líder (aa 1-15) que se escinde después de la secreción, dando como resultado la forma madura de MASP-2 humana (SEQ ID NO: 6). Como se muestra en la FIGURA 2, el gen *MASP 2* humano abarca doce exones. El ADNc de MASP-2 humana está codificado por los exones B, C, D, F, G, H, I, J, K y L. Un empalme alternativo da como resultado una proteína de 20 kDa denominada proteína asociada a MBL 19 ("MAP19", también referida como "sMAP") (SEQ ID NO: 2), codificada por el (SEQ 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 el SEQ ID NO: 50 codifica la MASP-2 murina (que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 51) y proporciona el polipéptido MASP-2 murino con una secuencia líder que se escinde después de la secreción, dando lugar a la forma madura de MASP-2 murina (SEQ ID NO: 52). La molécula de ADNc expuesta en el SEQ ID NO: 53 codifica la MASP-2 de rata (que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 54) y proporciona el polipéptido MASP-2 de rata con una secuencia líder que se escinde después de la secreción, dando lugar a la forma madura de MASP-2 de rata (SEQ ID NO: 55).

Los expertos en la técnica reconocerán que las secuencias descritas en los SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 53 representan alelos individuales de MASP-2 de origen humano, murino y de rata, respectivamente, y que se espera que se produzcan la variación alélica y el empalme alternativo. Las variantes alélicas de las secuencias de nucleótidos mostradas en los SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 53, incluyendo aquellas que contienen mutaciones silenciosas y aquellas en las que las mutaciones dan como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos, se describen en la presente memoria. Las variantes alélicas de la secuencia de MASP-2 se pueden clonar sondeando bibliotecas de ADNc o genómicas de diferentes individuos de acuerdo con procedimientos convencionales.

Los dominios de la proteína MASP-2 humana (SEQ ID NO: 6) se muestran en la FIGURA 3A, e incluyen un dominio C1r/C1s/Vegf de erizo de mar/proteína morfogénica ósea N-terminal (CUBI) (aa 1-121 del SEQ ID NO: 6), un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico (aa 122-166), un segundo dominio CUBI (aa 167-293), así como un tándem de dominios de la proteína de control del complemento y un dominio de serina proteasa. El empalme alternativo del gen *MASP 2* da como resultado MAP19 mostrado 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 proteína-proteína. Por ejemplo, se sabe que MASP-2 se une a, y forma complejos que dependen de Ca^{2+} con las proteínas lectinas MBL, H-ficolina y L-ficolina. Se ha demostrado que cada complejo de 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.* 176:1497-2284, 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). También se ha demostrado que los dominios CUBIEGFCUBII median la dimerización de MASP-2, que se requiere para la formación de un

complejo de MBL activa (Wallis, R., et al., *J. Biol. Chem.* 275:30962-30969, 2000). Por lo tanto, se pueden identificar agentes inhibidores de MASP-2 que se unen a o interfieren con las regiones diana de MASP-2 que se sabe que son importantes para la activación del complemento dependiente de MASP-2.

ANTICUERPOS ANTI-MASP-2

5 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 productor de anticuerpos y pueden ser multiespecíficos, quiméricos, humanizados, anti-idiotipo, y fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, Fv, fragmentos scFv y anticuerpos de cadena sencilla como se describe adicionalmente en la presente memoria.

10 Se han descrito en la bibliografía varios anticuerpos anti-MASP-2, algunos de los cuales se enumeran a continuación en la TABLA 1. Estos anticuerpos anti-MASP-2 descritos anteriormente pueden ser escrutados para determinar la capacidad para inhibir el sistema de activación del complemento dependiente de MASP-2 utilizando los análisis descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se ha identificado que los anticuerpos Fab2 anti-MASP-2 de rata que bloquean la activación del complemento dependiente de MASP-2, como se describe con más detalle en los Ejemplos 24 y 25 en la presente memoria. Una vez que se identifica un anticuerpo anti-MASP-2 que funciona como un agente inhibidor de MASP-2, éste se puede utilizar para producir anticuerpos anti-idiotipo y se puede utilizar para identificar otras moléculas de unión a MASP-2 como se describe adicionalmente a continuación.

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

ANTÍGENO	TIPO DE ANTICUERPO	REFERENCIA
MASP-2 Recombinante	Policlonal de rata	Peterson, S.V., et al., <i>Mol. Immunol.</i> 37: 803-811, 2000
Fragmento CCP1/2-SP humano recombinante (MoAb 8B5)	MoAb de rata (subclase IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., <i>J. of Immunol. Methods</i> 282: 159-167, 2003
Mp19 humano recombinante (MoAb 6G12) (reacción cruzada con MASP-2)	MoAb de rata (subclase IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., <i>J. of Immunol. Methods</i> 282: 159-167, 2003
hMASP-2	MoAb de ratón (S/P) MoAb de ratón (N-terminal)	Peterson, S.V., et al., <i>Mol. Immunol.</i> 35: 409, Abril de 1998
hMASP-2 (dominio CCP1-CCP2-SP)	MoAb de rata: Nimoab101, producido por la línea celular de hibridoma 03050904 (ECACC)	Documento WO 2004/106384
hMASP-2 (etiquetado con his completo)	MoAb murinos: NimoAb104, producido por la línea celular de hibridoma M0545YM035 (DSMZ) NimoAb108, producido por la línea celular de hibridoma M0545YM029 (DSMZ) NimoAb109 producido por la línea celular de hibridoma M0545YM046 (DSMZ) NimoAb110 producido por la línea celular de hibridoma M0545YM048 (DSMZ)	Documento WO 2004/106384

Anticuerpos anti-MASP-2 con la función efectora reducida

Los anticuerpos anti-MASP-2 pueden tener una función efectora reducida con el fin de reducir la inflamación que puede derivarse de la activación de la vía clásica del complemento. Se ha demostrado que la capacidad de las moléculas de IgG para desencadenar la vía clásica del complemento reside dentro de la porción Fc de la molécula (Duncan, A.R., et al., *Nature* 332:738-740 1988). Las moléculas de IgG en las que la porción Fc de la molécula se ha eliminado por escisión enzimática están desprovistas de esta función efectora (véase Harlow, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988). De acuerdo con ello, los anticuerpos con la función efectora reducida pueden ser generados como resultado de que carecen de la porción Fc de la molécula por que tiene una secuencia de Fc modificada por ingeniería genética que minimiza la función efectora, o pueden ser de cualquiera de los isotipos IgG₂ o IgG₄ humanos.

Los anticuerpos con una función efectora reducida pueden ser producidos por manipulación biológica molecular convencional de la porción Fc de las cadenas pesadas de IgG como se describe en el Ejemplo 9 en la presente memoria y también como describen Jolliffe et al., *Int'l Rev. Immunol.* 10:241-250, 1993 y Rodrigues et al., *J. Immunol.* 151:6954-6961, 1998. Los anticuerpos con una función efectora reducida también incluyen los isotipos IgG₂ e IgG₄ humanos que tienen una capacidad reducida para 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 para MASP-2 humana que constan de los isotipos IgG₂ o IgG₄ pueden ser producidos por uno de los diversos métodos conocidos por un experto normal en la técnica, como describen Vaughan, T.J., et al., *Nature Biotechnical* 16: 535-539, 1998.

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-MASP-2

Los anticuerpos anti-MASP-2 pueden ser producidos utilizando polipéptidos de MASP-2 (p. ej., MASP-2 completa) o utilizando péptidos que portan epítomos de MASP-2 antigénicos (p. ej., una porción del polipéptido MASP-2). Los péptidos inmunogénicos pueden ser tan pequeños como cinco residuos de aminoácidos. Por ejemplo, el polipéptido de MASP-2 que incluye toda la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 6 puede ser utilizado para inducir anticuerpos anti-MASP-2 útiles en el método de la invención. Los dominios para MASP-2 particulares que se sabe que están implicados en las interacciones proteína-proteína, tales como los dominios CUBI, y CUBIEGF, así como la región que comprende el sitio activo de la serina-proteasa, se pueden expresar en forma de polipéptidos recombinantes como se describe en el Ejemplo 5 y utilizar como antígenos. Además, los péptidos que comprenden una porción de al menos 6 aminoácidos del polipéptido de MASP-2 (SEQ ID NO: 6) son también útiles para inducir anticuerpos para MASP-2. Otros ejemplos de antígenos derivados de MASP-2 útiles para inducir anticuerpos contra MASP-2 se proporcionan a continuación en la TABLA 2. Los péptidos y polipéptidos MASP-2 utilizados para generar anticuerpos se pueden aislar en forma de polipéptidos naturales, o péptidos recombinantes o sintéticos y polipéptidos recombinantes catalíticamente inactivos, tales como MASP-2A, como se describe adicionalmente en los Ejemplos 5-7. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, los anticuerpos anti-MASP-2 se obtienen utilizando una cepa de ratón transgénico como se describe en los Ejemplos 8 y 9 y se describe más adelante.

Los antígenos útiles para producir anticuerpos anti-MASP-2 también incluyen polipéptidos de fusión, tales como fusiones de MASP-2 o una porción de la misma con un polipéptido de inmunoglobulina o con una proteína de unión a maltosa. El inmunógeno polipeptídico puede ser una molécula completa o una porción de la misma. Si la porción de polipéptido es de tipo hapteno, semejante porción se puede unir o ligar ventajosamente a un portador macromolecular (tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o toxoide del tétanos) para la inmunización.

TABLA 2: Antígenos derivados de MASP-2

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
SEQ ID NO: 6	Proteína MASP-2 humana
SEQ ID NO: 51	Proteína MASP-2 murina
SEQ ID NO: 8	Dominio CUBI de MASP-2 humana (aa 1 a 121 del SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 9	Dominios CUBIEGF de MASP-2 humana (aa 1-166 del SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 10	Dominios CUBIEGFCUBII de MASP-2 humana (aa 1-293 del SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 11	Dominio EGF de MASP-2 humana (aa 122 a 166 del SEQ ID NO: 6)

ES 2 617 920 T3

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
SEQ ID NO: 12	Dominio serina-proteasa de MASP-2 humana (aa 429 a 671 del SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 13	Forma mutante inactivada de serina-proteasa (aa 610-625 del SEQ ID NO: 6 con Ser 618 mutada)
GKDSCRGDAGGALVFL	
SEQ ID NO: 14 TPLGPKWPEPVFGRL	Péptido CUBI humano
SEQ ID NO: 15: TAPPGYRLRLYFTHFDLEL SHLCEYDFVKLSSGAKVL ATLCGQ	Péptido CUBI humano
SEQ ID NO: 16: TFRSDYSN	Región de unión a MBL en el dominio CUBI humano
SEQ ID NO: 17: FYSLGSSLDITFRSDYSNEK PFTGF	Región de unión a MBL en el dominio CUBI humano
SEQ ID NO: 18 IDECQVAPG	Péptido EGF
SEQ ID NO: 19 ANMLCAGLES GGK DSCR G DSGGALV	Péptido del sitio activo de serina-proteasa

ANTICUERPOS POLICLONALES

Los anticuerpos policlonaes contra la MASP-2 se pueden preparar mediante la inmunización de un animal con polipéptido MASP-2 o una porción inmunogénica del mismo utilizando métodos bien conocidos por los expertos normales en la técnica. Véase, por ejemplo, Green et al., "Production of Polyclonal Antisera", en *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.), página 105, y como se describe adicionalmente en el Ejemplo 6. La inmunogenicidad de un polipéptido MASP-2 se puede aumentar mediante el uso de un coadyuvante, incluyendo geles minerales, tales como hidróxido de aluminio o adyuvante de Freund (completo o incompleto), sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. Los anticuerpos policlonaes son generalmente originados 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 también puede derivar de un primate subhumano. Las técnicas generales para originar anticuerpos útiles desde el punto de vista diagnóstico y terapéutico 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 a continuación a partir de la sangre de tales animales inmunizados utilizando procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica.

ANTICUERPOS MONOCLONALES

El agente inhibidor de MASP-2 puede ser un anticuerpo monoclonal anti-MASP-2. Los anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 son altamente específicos, estando dirigidos contra un único epítipo de MASP-2. Según se utiliza en la presente memoria, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar que requiera la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo, tales 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 los Estados Unidos Núm. 4.816.567 de Cabilly). Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas por Clackson, T., et al., *Nature* 352:624-628, 1991 y Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991. Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante la inyección en un mamífero adecuado (p. ej., un ratón BALB/c) de una composición que comprende un polipéptido contra MASP-2 o parte del mismo. Después de un período de tiempo predeterminado, los esplenocitos se retiran del ratón y se suspenden en un medio de cultivo celular. Los esplenocitos se fusionan a continuación con una línea celular inmortal para formar un hibridoma. Los hibridomas formados se cultivan en cultivo celular y se escrutan para determinar su capacidad para producir un anticuerpo monoclonal contra MASP-2. Un ejemplo adicional que describe la producción de anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 se proporciona 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 estimulación antigénica. En esta técnica, los elementos del locus de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana se introducen en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen interrupciones de los loci elegidas como diana de loci de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina endógenos. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, tales como los antígenos MASP-2 descritos en la presente memoria, y los ratones pueden ser utilizados para producir hibridomas secretores de anticuerpos contra MASP-2 humana por fusión de células B de dichos animales a líneas celulares de mieloma adecuadas utilizando la tecnología de Kohler-Milstein convencional, como se describe con más detalle en el Ejemplo 7. Los ratones transgénicos con un genoma de inmunoglobulina humana están disponibles comercialmente (p. ej., de Abgenix, Inc., Fremont, CA, y Medarex, Inc., Annandale, N.J.). Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos son descritos, por ejemplo, por 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 pueden ser aislados y purificados a partir de cultivos de hibridoma mediante una variedad de técnicas bien establecidas. Tales técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con Proteína-A Sefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño, y cromatografía de intercambio iónico (véase, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y las páginas 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en *Methods in Molecular Biology*, The Humana Press, Inc., Vol. 10, páginas 79-104, 1992).

Una vez producidos, los anticuerpos monoclonales, policlonaes, o derivados de fagos se someten a ensayo primero para determinar la unión específica a MASP-2. Se puede utilizar una variedad de análisis conocidos por los expertos en la técnica para detectar anticuerpos que se unen específicamente a MASP-2. Los análisis ilustrativos incluyen transferencia Western o análisis de inmunoprecipitación por métodos convencionales (p. ej., como describen Ausubel et al.), inmunolectroforesis, análisis de inmuoabsorción con enzima ligada, transferencias puntuales, análisis de inhibición o competición y análisis de tipo sándwich (como describen Harlow y Land, en *Antibodies: A*

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Una vez que se identifica que los anticuerpos se unen específicamente a MASP-2, los anticuerpos anti-MASP-2 se someten a ensayo para determinar la capacidad de funcionar como agentes inhibidores de MASP-2 en uno de varios análisis tales como, por ejemplo, un análisis de escisión de C4 específica de lectina (descrito en el Ejemplo 2), un análisis de depósito de C3b (descrito en el Ejemplo 2) o un análisis de depósito de C4b (descrito en el Ejemplo 2).

La afinidad de anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 puede ser fácilmente determinada por un experto normal en la técnica (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.

10 ANTICUERPOS QUIMÉRICOS/HUMANIZADOS

Los anticuerpos monoclonales útiles en el método descrito en la presente memoria incluyen anticuerpos quiméricos en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.567, de Cabilly; y Morrison, S.L., et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 81:6851-6855, 1984).

Una forma de un 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 una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos monoclonales humanizados se producen transfiriendo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas (p. ej., de ratón), de las cadenas variables pesada y ligera de la inmunoglobulina de ratón a un dominio variable humano. Típicamente, los residuos de anticuerpos humanos son sustituidos después en las regiones marco de las contrapartes no humanas. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para afinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco de Fv son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones, P.T., y otros, *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 al menos una región CDR3 de unión a MASP-2. Además, las porciones Fc pueden ser reemplazadas con el fin de producir IgA o IgM, así como anticuerpos IgG humanos. Tales anticuerpos humanizados tendrán una utilidad clínica particular, ya que reconocerán específicamente MASP-2 humana, pero no evocarán una respuesta inmunitaria en seres humanos contra el propio anticuerpo. En consecuencia, son más adecuados para la administración *in vivo* en los seres humanos, sobre todo cuando es necesaria la administración repetida o a largo plazo.

Un ejemplo de la generación de un anticuerpo humanizado anti-MASP-2 a partir de un anticuerpo monoclonal anti-MASP-2 murino se proporciona en la presente memoria en el Ejemplo 10. También han sido descritas técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados, por ejemplo, por Jones, P.T., et al., *Nature* 321:522, 1986; Carter, P., et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 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 por la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.693.762, de Queen, 1997. Además, hay entidades comerciales que sintetizan anticuerpos humanizados a partir de las regiones de anticuerpos murinos específicos, tales como Protein Design Labs (Mountain View, CA).

ANTICUERPOS RECOMBINANTES

Los anticuerpos anti-MASP-2 también se pueden elaborar utilizando métodos recombinantes. Por ejemplo, se pueden elaborar anticuerpos humanos utilizando bibliotecas de expresión de inmunoglobulinas humanas (disponibles por ejemplo, de Stratagene, Corp., La Jolla, CA) para producir fragmentos de anticuerpos humanos (V_H, V_L, Fv, Fd, Fab o F(ab')₂). Estos fragmentos se utilizan a continuación para construir anticuerpos humanos completos utilizando técnicas similares a las de la producción de anticuerpos quiméricos.

ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO

Una vez que los anticuerpos anti-MASP-2 se identifican con la actividad inhibidora deseada, estos anticuerpos se pueden utilizar para generar anticuerpos anti-idiotipo que se asemejan a una parte de MASP-2 utilizando mecanismos que son bien conocidos en la técnica. 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 con la proteína MASP-2

necesaria para la activación del complemento, se pueden utilizar para generar anti-idiotipos que se asemejan al sitio de unión a MBL sobre la proteína MASP-2 y por lo tanto se unen y neutralizan un ligando de unión de MASP-2 tal como, por ejemplo, MBL.

FRAGMENTOS DE INMUNOGLOBULINA

5 Los agentes inhibidores de MASP-2 útiles en el método descrito en la presente memoria abarcan no sólo las moléculas de inmunoglobulina intactas, sino también los fragmentos bien conocidos que incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ y Fv, fragmentos scFv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

10 Es bien conocido en la técnica que sólo una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el paratopo, está implicada en la unión del anticuerpo a su epitopo (véase, p. ej., Clark, W.R., *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1986). Las regiones pFc' y Fc del anticuerpo son efectores de la vía clásica del complemento, pero no están implicadas en la unión al antígeno. Un anticuerpo del que se ha escindido enzimáticamente la región pFc', o que ha sido producido sin la región pFc', se denomina fragmento F(ab')₂ y conserva ambos sitios de unión a antígeno de un anticuerpo intacto. Un fragmento F(ab')₂ aislado se denomina un
15 fragmento monoclonal bivalente debido a sus dos sitios de unión a antígeno. De manera similar, un anticuerpo del que se ha escindido enzimáticamente la región Fc, o que ha sido producido sin la región Fc, se denomina fragmento Fab, y conserva uno de los sitios de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo intacta.

Los fragmentos de anticuerpos se pueden obtener por medio de hidrólisis proteolítica, tal como digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de
20 anticuerpos pueden ser producidos por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento se puede escindir adicionalmente utilizando un agente reductor de tiol para producir fragmentos monovalentes Fab' de 3,5S. Opcionalmente, la reacción de escisión se puede realizar utilizando un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de los enlaces disulfuro. Como una alternativa, una escisión enzimática utilizando pepsina produce dos fragmentos Fab
25 monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos son descritos, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.331.647 de 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 por Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4.

En algunas realizaciones, se prefiere el uso de fragmentos de anticuerpos que carecen de la región Fc para evitar la
30 activación de la vía clásica del complemento que se inicia tras la unión de Fc al receptor Fcγ. Existen varios métodos por los cuales se puede producir un MoAb que evita la interacción del receptor Fcγ. Por ejemplo, la región Fc de un anticuerpo monoclonal se puede eliminar químicamente utilizando la digestión parcial por enzimas proteolíticas (tales como la digestión con ficina), generando de ese modo, por ejemplo, fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno tales como fragmentos Fab o F(ab)₂ (Mariani, M., et al., *Mol. Immunol.* 28:69-71, 1991). Alternativamente, el isotipo
35 IgG γ4 humano, que no se une a receptores Fcγ, se puede utilizar durante la construcción de un anticuerpo humanizado como se describe en la presente memoria. Los anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla y los dominios de unión a antígeno que carecen del dominio Fc también se pueden modificar por ingeniería genética utilizando técnicas recombinantes descritas en la presente memoria.

FRAGMENTOS DE ANTICUERPO DE CADENA SENCILLA

40 Alternativamente, se pueden crear moléculas de unión a cadenas de péptidos individuales específicas para MASP-2 en las que se conectan las regiones Fv de cadena pesada y ligera. Los fragmentos Fv pueden estar conectados por un conector peptídico para formar una proteína de unión a antígeno de cadena sencilla (scFv). Estas proteínas de unión a antígeno de cadena sencilla 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
45 en un vector de expresión, que se introduce posteriormente en una célula anfitriona, tal como *E. coli*. Las células anfitrionas recombinantes sintetizan una cadena polipeptídica sencilla con un péptido conector que une los dos dominios V. Los métodos para producir scFv son descritos, por ejemplo, por Whitlow, et al., "Methods: A Companion to Methods in Enzymology" 2:97, 1991; Bird, et al., *Science* 242:423, 1988; Patente de los Estados Unidos Núm. 4.946.778, de Ladner; Pack, P., et al., *Bio/Technology* 11:1271, 1993.

50 Como un ejemplo ilustrativo, un scFv específico de MASP-2 se puede obtener mediante la exposición de linfocitos a un polipéptido MASP-2 *in vitro* y la selección de bibliotecas de presentación de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, mediante el uso de proteína o péptido MASP-2 inmovilizado o marcado). Los genes que codifican polipéptidos que tienen dominios de unión al polipéptido MASP-2 potenciales se pueden obtener mediante el escrutinio de bibliotecas de péptidos aleatorios sobre fagos o sobre bacterias tales como *E. coli*. Estas bibliotecas
55 de presentación de péptidos aleatorios pueden ser utilizadas para el escrutinio de péptidos que interactúan con MASP-2. Los mecanismos para crear y escrutar dichas bibliotecas de presentación de péptidos aleatorios son bien conocidos en la técnica (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.223.409, de Lardner; Patente de los Estados Unidos Núm. 4.946.778, de Ladner; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.403.484, de Lardner; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.571.698, de Lardner; y Kay et al., *Phage Display of Peptides and Proteins* Academic Press, Inc.,

1996) y las bibliotecas de presentación de péptidos aleatorios y los kits para el escrutinio de tales bibliotecas se encuentran disponibles comercialmente, 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.).

- 5 Otra forma de un fragmento de anticuerpo anti-MASP-2 útil en este aspecto de la invención es un péptido que codifica una única región determinante de complementariedad (CDR) que se une a un epítipo sobre un antígeno de MASP-2 e inhibe la activación del complemento dependiente de MASP-2. Los péptidos CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") se pueden obtener construyendo genes que codifiquen la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir del ARN de células productoras de anticuerpos (véanse, 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).
- 10
- 15 Los anticuerpos para MASP-2 descritos en la presente memoria 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-MASP2 monoclonal humano o humanizado de alta afinidad con una función efectora reducida.

INHIBIDORES PEPTÍDICOS

- 20 El agente inhibidor de MASP-2 puede comprender inhibidores peptídicos de MASP-2 aislados, incluyendo inhibidores peptídicos naturales aislados e inhibidores peptídicos sintéticos que inhiben el sistema de activación del complemento dependiente de MASP-2. Según se utiliza en la presente memoria, el término "inhibidores peptídicos de MASP-2 aislados" se refiere a péptidos que inhiben la activación del complemento dependiente de MASP-2 mediante la unión a, la competición con MASP-2 por la unión a otra molécula de reconocimiento (p. ej., MBL, H-ficolina, M-ficolina, o L-ficolina) en la vía de las lectinas, y/o la interacción directamente con MASP-2 para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 que son sustancialmente puras y están esencialmente libres de otras sustancias con las que se pueden encontrar en la naturaleza en un grado práctico y apropiado para el uso previsto.

- Los inhibidores peptídicos se han utilizado con éxito *in vivo* para interferir en las interacciones proteína-proteína y los sitios catalíticos. Por ejemplo, los inhibidores peptídicos para moléculas de adhesión estructuralmente relacionadas con LFA-1 han sido aprobados recientemente para uso clínico en coagulopatías (Ohman, E.M., et al., *European Heart J.* 16:50-55, 1995). Se han descrito péptidos cortos lineales (<30 aminoácidos) que evitan o interfieren en la adhesión dependiente de integrina (Murayama, O., et al., *J. Biochem.* 120:445-51, 1996). Los péptidos más largos, cuya longitud varía de 25 a 200 residuos de aminoácido, también se han utilizado con éxito para bloquear la adhesión dependiente de integrina (Zhang, L., et al., *J. Biol. Chem.* 271(47): 29953-57, 1996). En general, los inhibidores peptídicos más largos tienen afinidades más altas y/o velocidades de disociación más lentas que los péptidos cortos y por lo tanto pueden ser inhibidores más potentes. También se ha demostrado que los inhibidores peptídicos cíclicos son inhibidores eficaces de integrinas *in vivo* para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias humanas (Jackson, D.Y., et al., *J. Med. Chem.* 40:3359-68, 1997). Un método de producción de péptidos cíclicos implica la síntesis de péptidos en los que los aminoácidos terminales del péptido son cisteínas, permitiendo de ese modo que el péptido exista en una forma cíclica por medio de enlaces disulfuro entre los aminoácidos terminales, que se ha demostrado que mejoran la afinidad y la semivida *in vivo* para el tratamiento de neoplasmas hematopoyéticos (p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 6.649.592, de Larson).
- 30
- 35
- 40

INHIBIDORES PEPTÍDICOS SINTÉTICOS DE MASP-2

- 45 Los péptidos inhibidores de MASP-2 útiles en los métodos en la presente memoria se ilustran mediante las secuencias de aminoácidos que imitan las regiones diana importantes para la función de MASP-2. Los péptidos inhibidores útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria tienen un tamaño que varía de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 300 aminoácidos. La TABLA 3 proporciona una lista de péptidos inhibidores ilustrativos que pueden ser útiles en la práctica de este aspecto de la descripción. Un péptido inhibidor de MASP-2 candidato puede ser sometido a ensayo para determinar la capacidad para funcionar como un agente inhibidor de MASP-2 en uno de varios análisis que incluyen, por ejemplo, un análisis de escisión de C4 específico de lectinas (descrito en el Ejemplo 2), y un análisis de depósito de C3b (descrito en el Ejemplo 2).

- Los péptidos inhibidores de MASP-2 pueden derivar de polipéptidos de MASP-2 y se seleccionan entre la proteína MASP-2 madura completa (SEQ ID NO: 6), o entre un dominio concreto de la proteína MASP-2 tal como, por ejemplo, el dominio CUBI (SEQ ID NO: 8), el dominio CUBIEGF (SEQ ID NO: 9), el dominio EGF (SEQ ID NO: 11), y el dominio serina proteasa (SEQ ID NO: 12). Como se ha descrito anteriormente, se ha demostrado que las regiones CUBEGFCUBII son necesarias para la dimerización y unión con MBL (Thielens et al., *supra*). En particular, se ha demostrado que la secuencia peptídica TFRSDYN (SEQ ID NO: 16) en el dominio CUBI de MASP-2 está involucrada en la unión a MBL en un estudio que identificó un ser humano con una mutación homocigota en Asp105
- 55

a Gly105, dando como resultado la pérdida de MASP-2 del complejo con MBL (Stengaard-Pedersen, K., et al., *New England J. Med.* 349: 554-560, 2003).

Los péptidos inhibidores de MASP-2 también pueden derivar de MAp19 (SEQ ID NO: 3). Como se ha descrito en el Ejemplo 30, MAp19 (SEQ ID NO: 3) (también referido como sMAP), tiene la capacidad de regular a la baja la vía de las lectinas, que es activada por el complejo de MBL. Iwaki et al., *J. Immunol.* 177:8626-8632, 2006. Si bien no se desea estar limitado por la teoría, es probable que sMAP sea capaz de ocupar el sitio de unión MASP-2/sMAP en MBL y evitar que MASP-2 se una a MBL. También se ha informado de que sMAP compite con MASP-2 en asociación con ficolina A e inhibe la activación del complemento por el complejo de ficolina A/MASP-2. Endo, Y., et al., *Immunogenetics* 57:837-844 (2005).

Los péptidos inhibidores de MASP-2 pueden derivar de las proteínas lectinas que se unen a MASP-2 y están implicadas en la vía de las lectinas del complemento. Se han identificado varias lectinas diferentes que están implicadas en esta ruta, incluyendo lectina de unión a manano (MBL), L-ficolina, M-ficolina y H-ficolina. (Ikeda, K., et al., *J. Biol. Chem.* 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., et al., *J. Exp. Med.* 176:1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 168:3502-3506, 2002). Estas lectinas están presentes en el suero en forma de oligómeros de subunidades homotriméricas, teniendo cada una fibras N-terminales similares al colágeno con dominios de reconocimiento de carbohidratos. Se ha demostrado que estas diferentes lectinas se unen a MASP-2, y el complejo de lectina/MASP-2 activa el complemento a través de la escisión de las proteínas C4 y C2. La H-ficolina tiene una región amino-terminal de 24 aminoácidos, un dominio similar a colágeno con 11 repeticiones Gly-Xaa-Yaa, un dominio cuello de 12 aminoácidos, y un dominio similar a fibrinógeno de 207 aminoácidos (Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 168:3502-3506, 2002). La H-ficolina se une a GlcNAc y aglutina eritrocitos humanos recubiertos con LPS derivados de *S. typhimurium*, *S. minnesota* y *E. coli*. Se ha demostrado que la H-ficolina se asocia con MASP-2 y MAp19 y activa la vía de las lectinas. *Id.* La L-ficolina/P35 también se une a GlcNAc y se ha demostrado que se asocia con MASP-2 y MAp19 en el suero humano y se ha demostrado que este complejo activa la vía de las lectinas (Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 164:2281, 2000). Por consiguiente, los péptidos inhibidores de MASP-2 útiles en la presente invención pueden comprender una región de al menos 5 aminoácidos seleccionada entre la proteína MBL (SEQ ID NO: 21), la proteína H-ficolina (número de acceso GenBank NM_173452), la proteína M-ficolina (número de acceso GenBank 000602) y la proteína L-ficolina (número de acceso GenBank NM_015838).

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

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

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

TABLA 3: Péptidos inhibidores de MASP-2 ilustrativos

SEQ ID NO	Fuente
SEQ ID NO: 6	Proteína MASP-2 humana
SEQ ID NO: 8	Dominio CUBI de MASP-2 (aa 1 a 121 del SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 9	Dominios CUBIEGF de MASP-2 (aa 1-166 del SEQ ID NO: 6)

ES 2 617 920 T3

SEQ ID NO: 10	Dominios CUBIEGFCUBII de MASP-2 (aa 1-293 del SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 11	Dominio EGF de MASP-2 (aa 122-166)
SEQ ID NO: 12	Dominio serina proteasa de MASP-2 (aa 429-671)
SEQ ID NO: 16	Región de unión a MBL en MASP-2
SEQ ID NO: 3	MAp19 humana
SEQ ID NO: 21	Proteína MBL humana
SEQ ID NO: 22 OGK-X-GP, donde "O" = hidroxiprolina y "X" es un residuo de aminoácido hidrófobo	Sitio de unión consenso de péptido sintético de MBL humana y ficolinas humanas
SEQ ID NO: 23 OGKLG	Sitio de unión central de MBL humana
SEQ ID NO: 24 GLR GLQ GPO GKL GPO G	Tripletes 6-10 de MBP humana que se demuestra que se unen a MASP-2
SEQ ID NO: 25 GPOGPOGLRGLQGPO GKLGPOGGPOGPO	Tripletes de MBP humana con GPO añadido para mejorar la formación de triples hélices
SEQ ID NO: 26 GKDGRDGTKGEKGEP GQGLRGLQGPOGKLG POGNOGPSGSOGPKG QKGDGKGS	Tripletes 1-17 de MBP humana
SEQ ID NO: 27 GAOGSOGKEKGAOGPQ GPOGPOGKMGPKGEO GDO	H-ficolina humana (Hataka)
SEQ ID NO: 28 GCÔGLOGAOGDKGE AGTNGKRGERGPOGP OGKAGPOGPNGAOG O	L-ficolina humana P35
SEQ ID NO: 29 LQRALEILPNRVTIKA NRPFLVFI	Sitio de escisión de C4 humana

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

Los péptidos derivados del sitio de escisión de C4, así como otros péptidos que inhiben el sitio de serina proteasa MASP-2 se pueden modificar químicamente para que sean inhibidores de proteasa irreversibles. Por ejemplo, las

modificaciones adecuadas pueden incluir, pero no están necesariamente limitadas a, halometilcetonas (Br, Cl, I, F) en el extremo C-terminal, Asp o Glu, o anexas a las cadenas laterales funcionales; grupos haloacetilo (u otro α -haloacetilo) en grupos amino u otras cadenas laterales funcionales; grupos epoxi o que contienen imina en el extremo amino- o carboxi-terminal o en las cadenas laterales funcionales; o ésteres imidato en el extremo amino- o carboxi-terminal o en las cadenas laterales funcionales. Tales modificaciones permitirían la ventaja de inhibir de forma permanente la enzima por medio del anclaje covalente del péptido. Esto podría dar como resultado dosis eficaces más bajas y/o la necesidad de una administración menos frecuente del inhibidor peptídico.

Además de los péptidos inhibidores descritos anteriormente, los péptidos inhibidores de MASP-2 útiles en los métodos descritos en la presente memoria incluyen péptidos que contienen la región CDR3 de unión a MASP-2 de un MoAb anti-MASP-2 obtenido como se describe en la presente memoria. La secuencia de las regiones CDR para su uso en la síntesis de los péptidos se puede determinar mediante métodos conocidos en la técnica. La región variable de cadena pesada es un péptido que generalmente varía de 100 a 150 aminoácidos de longitud. La región variable de cadena ligera es un péptido que generalmente varía de 80 a 130 aminoácidos de longitud. Las secuencias de CDR dentro de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera incluyen sólo aproximadamente secuencias de 3-25 aminoácidos que pueden ser fácilmente secuenciadas por un experto normal en la técnica.

Los expertos en la técnica reconocerán que las variaciones sustancialmente homólogas de los péptidos inhibidores de MASP-2 descritos anteriormente también mostrarán actividad inhibidora de MASP-2. Las variaciones ilustrativas incluyen, pero no se limitan necesariamente a, péptidos que tienen inserciones, deleciones, sustituciones, y/o adiciones de aminoácidos en las porciones carboxi-terminal o amino-terminal de los péptidos en cuestión y mezclas de los mismos. Por consiguiente, se considera que aquellos péptidos homólogos que tienen actividad inhibidora de MASP-2 son útiles en los métodos descritos en la presente memoria. Los péptidos descritos también pueden incluir motivos de duplicación y otras modificaciones con sustituciones conservativas. Las variantes conservativas se describen en otra parte en la presente memoria, e incluyen el intercambio de un aminoácido por otro de igual carga, tamaño o carácter hidrófobo y similares.

Los péptidos inhibidores de MASP-2 pueden ser modificados para aumentar la solubilidad y/o para maximizar la carga positiva o negativa con el fin de que se parezcan más al segmento en la proteína intacta. El derivado puede tener o no la estructura primaria de aminoácidos exacta de un péptido descrito en la presente memoria, siempre que el derivado conserve funcionalmente la propiedad deseada de inhibición de MASP-2. Las modificaciones pueden incluir la sustitución de aminoácidos con uno de los veinte aminoácidos comúnmente conocidos o con otro aminoácido, con un aminoácido derivatizado o sustituido con características deseables auxiliares, tales como la resistencia a la degradación enzimática o con un D-aminoácido o la sustitución con otra molécula o compuesto, tal como un carbohidrato, que imite la conformación natural y la función del aminoácido, aminoácidos o péptidos; deleción de aminoácido; inserción de aminoácido con uno de los veinte aminoácidos comúnmente conocidos o con otro aminoácido, con un aminoácido derivatizado o sustituido con características deseables auxiliares, tales como la resistencia a la degradación enzimática o con un D-aminoácido o la sustitución con otra molécula o compuesto, tal como un carbohidrato, que imite la conformación natural y la función del aminoácido, aminoácidos o péptido; o la sustitución con otra molécula o compuesto, tal como un carbohidrato o un monómero de ácido nucleico, que imite la conformación natural, distribución de carga y la función del péptido parental. Los péptidos también se pueden modificar por acetilación o amidación.

La síntesis de péptidos inhibidores derivados puede basarse en técnicas conocidas de biosíntesis de péptidos, biosíntesis de carbohidratos y similares. Como punto de partida, el artesano puede contar con un programa informático adecuado para determinar la conformación de un péptido de interés. Una vez que se conoce la conformación del péptido descrito en la presente memoria, a continuación, el artesano puede determinar con un diseño racional qué tipo de sustituciones se pueden realizar en uno o más sitios para diseñar un derivado que conserve la conformación básica y la distribución de carga del péptido parental, pero que pueden poseer características que no están presentes o se han mejorado por encima de las que se encuentran en el péptido original. Una vez que se identifican las moléculas derivadas candidatas, los derivados se pueden someter a ensayo para determinar si funcionan como agentes inhibidores de MASP-2 utilizando los análisis descritos en la presente memoria.

50 ESCRUTINIO DE PÉPTIDOS INHIBIDORES DE MASP-2

También se puede utilizar el modelado molecular y el diseño molecular racional para generar y escrutar péptidos que imitan las estructuras moleculares de las regiones de unión clave de MASP-2 e inhiben las actividades del complemento de MASP-2. Las estructuras moleculares utilizadas para el modelado incluyen las regiones CDR de anticuerpos monoclonales anti-MASP-2, así como las regiones diana que se sabe que son importantes para la función de MASP-2 incluyendo la región requerida para la dimerización, la región implicada en la unión a MBL, y el sitio activo de la serina proteasa como se ha descrito anteriormente. Los métodos para la identificación de péptidos que se unen a una diana particular son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la impresión molecular para la construcción *de novo* de estructuras macromoleculares tales como péptidos que se unen a una molécula particular. Véase, por ejemplo, Shea, K.J., "Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymers: The De Novo Synthesis of Macromolecular Binding and Catalytic Sites", *TRIP* 2(5) 1994.

Como ejemplo ilustrativo, un método de preparación de miméticos de péptidos de unión a MASP-2 es el siguiente. Se polimerizan monómeros funcionales de un péptido de unión a MASP-2 conocido o la región de unión de un anticuerpo anti-MASP-2 que muestra la inhibición de MASP-2 (el molde). Se elimina el molde a continuación, seguido de la polimerización de una segunda clase de monómeros en el vacío dejado por el molde, para proporcionar una nueva molécula que muestra una o más propiedades deseadas que son similares a las del molde. Además de preparar los péptidos de esta manera, también se pueden preparar otras moléculas de unión a MASP-2 que son agentes inhibidores de MASP-2 tales como los polisacáridos, nucleósidos, fármacos, nucleoproteínas, lipoproteínas, carbohidratos, glicoproteínas, esteroides, lípidos y otros materiales biológicamente activos. Este método es útil para el diseño de una amplia variedad de miméticos biológicos que son más estables que sus contrapartes naturales, ya que se preparan típicamente mediante polimerización por radicales libres de monómeros de función, lo que da como resultado un compuesto con una cadena principal no biodegradable.

SINTESIS DE PÉPTIDOS

Los péptidos inhibidores de MASP-2 se pueden preparar utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica, tales como el mecanismo de síntesis en fase sólida inicialmente descrito por Merrifield, en *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-2154, 1963. La síntesis automatizada se puede conseguir, por ejemplo, utilizando el Sintetizador de Péptidos 431A Applied Biosystems (Foster City, Calif.) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se pueden encontrar otras técnicas, por ejemplo, *Peptide Synthesis* de Bodanszky, M., et al., segunda edición, John Wiley & Sons, 1976, así como en otros trabajos de referencia conocidos por los expertos en la técnica.

Los péptidos también se pueden preparar utilizando mecanismos de ingeniería genética convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el péptido puede ser producido enzimáticamente por medio de la inserción de ácido nucleico que codifica el péptido en un vector de expresión, la expresión del ADN, y la traducción del ADN al péptido en presencia de los aminoácidos requeridos. El péptido se purifica a continuación utilizando técnicas cromatográficas o electroforéticas, o por medio de una proteína portadora que se puede fusionar a, y posteriormente escindir del péptido mediante la inserción en el vector de expresión en fase con la secuencia codificante del péptido de una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína portadora. La fusión de proteína-péptido se puede aislar mediante técnicas de cromatografía, electroforesis o inmunológicas (tales como la unión a una resina a través de un anticuerpo para la proteína portadora). El péptido se puede escindir utilizando metodología química o enzimáticamente, como por ejemplo, hidrolasas.

Los péptidos inhibidores de MASP-2 que son útiles en el método descrito en la presente memoria también se pueden producir en células anfitrionas recombinantes siguiendo técnicas convencionales. Para expresar una secuencia codificante de un péptido inhibidor de MASP-2, una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido debe estar conectada operablemente a secuencias reguladoras que controlan la expresión transcripcional en un vector de expresión y después ser introducida en una célula anfitriona. Además de secuencias reguladoras de la transcripción, tales como promotores y potenciadores, los vectores de expresión pueden incluir secuencias reguladoras de la traducción y un gen marcador, que sean adecuados para la selección de las células que llevan el vector de expresión.

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

INHIBIDORES DE MOLÉCULA PEQUEÑA

Los agentes inhibidores de MASP-2 pueden ser inhibidores de molécula pequeña que incluyen sustancias naturales y sintéticas que tienen un peso molecular bajo, tales como por ejemplo, péptidos, peptidomiméticos e inhibidores no peptídicos (incluyendo oligonucleótidos y compuestos orgánicos). Los inhibidores de molécula pequeña de MASP-2 pueden ser generados basándose en la estructura molecular de las regiones variables de los anticuerpos anti-MASP-2.

Los inhibidores de molécula pequeña también pueden ser diseñados y generados basándose en la estructura cristalina de MASP-2 utilizando el diseño de fármacos computacional (Kuntz I.D., et al., *Science* 257:1078, 1992). Se ha descrito la estructura cristalina de MASP-2 de rata (Feinberg, H., et al., *EMBO J.* 22:2348-2359, 2003). Utilizando el método descrito por Kuntz et al., se utilizan las coordenadas de la estructura cristalina de MASP-2 como una entrada para un programa de ordenador tal como DOCK, que da salida a una lista de estructuras de molécula pequeña que se espera que se unan a MASP-2. El uso de tales programas de ordenador es bien conocido para un experto en la técnica. Por ejemplo, se utilizó la estructura cristalina del inhibidor de la proteasa del VIH-1 para

identificar ligandos no peptídicos únicos que son inhibidores de la proteasa del VIH-1 mediante la evaluación del ajuste de compuestos que se encuentran en la base de datos Cambridge Crystallographic al sitio de unión de la enzima utilizando el programa DOCK (Kuntz, I.D., et al., *J. Mol. Biol.* 161:269-288, 1982; Desjarlais, R.L., et al., *PNAS* 87:6644-6648, 1990).

- 5 La lista de estructuras de molécula pequeña que se identifican por medio de un método computacional como potenciales inhibidores de MASP-2 se examina utilizando un análisis de unión a MASP-2 tal como se describe en el Ejemplo 7. Las moléculas pequeñas que se encuentra que se unen a MASP-2 se analizan a continuación en un análisis funcional tal como el descrito en el Ejemplo 2 para determinar si inhiben la activación del complemento dependiente de MASP-2.

10 RECEPTORES SOLUBLES DE MASP-2

Se cree que otros agentes inhibidores de MASP-2 adecuados incluyen receptores solubles de MASP-2, que se pueden producir utilizando mecanismos conocidos por los expertos normales en la técnica.

INHIBIDORES DE LA EXPRESIÓN DE MASP-2

- 15 El agente inhibidor de MASP-2 puede ser un inhibidor de la expresión de MASP-2 capaz de inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2. En la práctica de este aspecto de la descripción los inhibidores de la expresión de MASP-2 representativos incluyen moléculas de ácido nucleico antisentido para MASP-2 (tales como ARNm antisentido, ADN antisentido u oligonucleótidos antisentido), ribozimas de MASP-2 y moléculas de ARNi para MASP-2.

- 20 Las moléculas de ARN y ADN antisentido actúan bloqueando directamente la traducción del ARNm de MASP-2 hibridando con el ARNm de MASP-2 y evitando la traducción de la proteína MASP-2. Una molécula de ácido nucleico antisentido se puede construir de numerosas maneras diferentes, siempre que sea capaz de interferir en la expresión de MASP-2. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico antisentido se puede construir mediante la inversión de la región codificante (o una porción de la misma) del ADNc de MASP-2 (SEQ ID NO: 4) con respecto a su orientación normal para la transcripción para permitir la transcripción de su complemento.

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

- No es necesario que la molécula de ácido nucleico antisentido tenga el mismo patrón de intrones o exones que el gen diana, y los segmentos no codificantes del gen diana pueden ser igualmente eficaces en la consecución de la supresión antisentido de la expresión del gen diana como segmentos codificantes. Se puede utilizar una secuencia de ADN de al menos aproximadamente 8 nucleótidos más o menos como molécula de ácido nucleico antisentido, a pesar de que es preferible una secuencia más larga. En la presente descripción, un ejemplo representativo de un agente inhibidor de MASP-2 útil es una molécula de ácido nucleico de MASP-2 antisentido que es idéntica en al menos noventa por ciento al complemento del ADNc de MASP-2 que consiste en la secuencia de ácido nucleico expuesta en el SEQ ID NO: 4. La secuencia de ácido nucleico expuesta en el SEQ ID NO: 4 codifica la proteína MASP-2 que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 5.
- 35
- 40

- El direccionamiento de los oligonucleótidos antisentido para que se unan al ARNm de MASP-2 es otro mecanismo que se puede utilizar para reducir el nivel de la síntesis de proteínas MASP-2. Por ejemplo, la síntesis de la poligalacturonasa y el receptor de acetilcolina muscarínico de tipo 2 es inhibida por los oligonucleótidos antisentido dirigidos a sus respectivas secuencias de ARNm (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.739.119, de Cheng, y Patente de los Estados Unidos Núm. 5.759.829, de Shewmaker). Además, los ejemplos de inhibición antisentido se han demostrado con la proteína nuclear ciclina, el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDG1), ICAM-1, E-selectina, STK-1, receptor de GABA_A estriatal y EGF humano (véase, p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.801.154, de Baracchini; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.789.573, de Baker; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.718.709, de Considine; y Patente de los Estados Unidos Núm. 5.610.288, de Reubenstein).
- 45

- 50 Se ha descrito un sistema que permite a un experto normal determinar qué oligonucleótidos son útiles en la presente memoria que implica el sondeo de sitios adecuados en el ARNm diana utilizando la escisión por ARNasa H como un indicador para la accesibilidad de las secuencias dentro de los transcritos. Scherr, M., et al., *Nucleic Acids Res.* 26:5079-5085, 1998; Lloyd, et al., *Nucleic Acids Res.* 29:3665-3673, 2001. Se añade una mezcla de oligonucleótidos antisentido que son complementarios a ciertas regiones del transcrito de MASP-2 a extractos celulares que expresan MASP-2, tales como hepatocitos, y se hibrida con el fin de crear un sitio vulnerable a la ARNasaH. Este método puede ser combinado con selección de secuencias asistida por ordenador que puede predecir la selección de la secuencia óptima para composiciones antisentido basándose en su capacidad relativa para formar dímeros, horquillas u otras estructuras secundarias que reducirían o prohibirían la unión específica al ARNm diana en una
- 55

5 célula anfitriona. Estas consideraciones de análisis de la estructura secundaria y de selección del sitio diana se pueden llevar a cabo utilizando el soporte lógico de análisis de cebadores OLIGO (Rychlik, I., 1997) y el soporte lógico del algoritmo BLASTN 2.0.5 (Altschul, S.F., et al., *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402, 1997). Los compuestos antisentido dirigidos hacia la secuencia diana comprenden preferiblemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. Son particularmente preferidos los oligonucleótidos antisentido que comprenden de aproximadamente 9 a aproximadamente 35 nucleótidos más o menos. Los autores de la presente invención contemplan que todas las composiciones de oligonucleótidos en el intervalo de 9 a 35 nucleótidos (es decir, las de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, o 35 bases de longitud más o menos) son altamente preferidas para la práctica de los métodos basados en oligonucleótidos antisentido descritos en la presente memoria. Las regiones diana altamente preferidas del ARNm de MASP-2 son aquellas que están en o cerca del codón de inicio de la traducción AUG, y aquellas secuencias que son sustancialmente complementarias a regiones 5' del ARNm, p. ej., entre las regiones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen *MASP-2* (SEQ ID NO: 4). Los inhibidores de la expresión de MASP-2 ilustrativas se proporcionan en la TABLA 4.

15 TABLA 4: Inhibidores de la expresión de MASP-2 ilustrativos

SEQ ID NO: 30 (nucleótidos 22-680 del SEQ ID NO: 4)	Secuencia de ácido nucleico de ADNc de MASP-2 (SEQ ID NO: 4) que codifica CUBIEGF
SEQ ID NO: 31 5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTG ACCCTCCTGGGC3	Nucleótidos 12-45 del SEQ ID NO: 4, que incluye el sitio de inicio de la traducción de MASP-2 (efector)
SEQ ID NO: 32 5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTC CAACGAGAAG3'	Nucleótidos 361-396 del SEQ ID NO: 4 que codifica una región que comprende el sitio de unión a MBL de MASP-2 (efector)
SEQ ID NO: 33 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCC GTATCCCAA3'	Nucleótidos 610-642 del SEQ ID NO: 4 que codifica una región que comprende el dominio CUBII

20 Como se señaló anteriormente, el término "oligonucleótido" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término también abarca las oligonucleobases compuestas por nucleótidos de origen natural, azúcares y enlaces covalentes internucleosídicos (cadena principal), así como oligonucleótidos que tienen modificaciones de origen no natural. Estas modificaciones permiten introducir ciertas propiedades deseables que no se ofrecen a través de oligonucleótidos de origen natural, tales como propiedades de toxicidad reducida, aumento de la estabilidad contra la degradación por nucleasas y mejora de la absorción celular. En aspectos ilustrativos los compuestos antisentido descritos en la presente memoria difieren del ADN nativo por la modificación de la cadena principal fosfodiéster para extender la vida del oligonucleótido antisentido en el que los sustituyentes de fosfato son reemplazados por fosforotioatos. Del mismo modo, uno o ambos extremos del oligonucleótido pueden estar sustituidos por uno o más derivados de acridina que se intercalan entre pares de bases adyacentes dentro de una hebra de ácido nucleico.

30 Otra alternativa al antisentido es el uso de "ARN de interferencia" (ARNi). Los ARN de doble hebra (ARNdh) pueden provocar el silenciamiento de genes en mamíferos *in vivo*. La función natural del ARNi y la co-supresión parecen ser una protección del genoma contra la invasión por elementos genéticos móviles tales como retrotransposones y virus que producen ARN o ARNdh aberrantes en la célula anfitriona cuando se vuelven activos (véase, p. ej., Jensen, J., et al., *Nat. Genet.* 21:209-12, 1999). La molécula de ARN de doble hebra se puede preparar mediante la síntesis de dos hebras de ARN capaces de formar una molécula de ARN de doble hebra, teniendo cada una una longitud de aproximadamente 19 a 25 (p. ej., 19-23 nucleótidos). Por ejemplo, una molécula de ARNdh útil en los métodos descritos en la presente memoria puede comprender el ARN correspondiente a una secuencia y su complemento enumerados en la TABLA 4. Preferiblemente, al menos una hebra de ARN tiene un saliente 3' de 1-5 nucleótidos. Las hebras de ARN sintetizadas se combinan en condiciones que forman una molécula de doble hebra. La secuencia de ARN puede comprender al menos una porción de 8 nucleótidos del SEQ ID NO: 4 con una longitud total de 25 nucleótidos o menos. El diseño de secuencias de ARNip para una diana determinada está dentro de la experiencia normal en la técnica. Se encuentran disponibles servicios comerciales que diseñan esa secuencia de ARNip y garantizan una inactivación de la expresión de al menos el 70% (Qiagen, Valencia, CA).

El ARNd_h se puede administrar como una composición farmacéutica y se puede elaborar por métodos conocidos, en los que un ácido nucleico se introduce en una célula diana deseada. Los métodos de transferencia de genes utilizados comúnmente incluyen fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, microinyección y métodos virales. Tales métodos los ilustran Ausubel et al., en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 1993.

También se pueden utilizar ribozimas para disminuir la cantidad y/o actividad biológica de MASP-2, tales como ribozimas dirigidas al ARNm de MASP-2. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas que pueden escindir moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia que es completamente o parcialmente homóloga a la secuencia de la ribozima. Es posible diseñar transgenes de ribozima que codifican ribozimas de ARN que se emparejan específicamente con un ARN diana y escinden la cadena principal de fosfodiéster en una ubicación específica, inactivando de ese modo funcionalmente el ARN diana. Al llevar a cabo esta escisión, la ribozima no es alterada como tal, y por lo tanto es capaz de reciclarse y escindir otras moléculas. La inclusión de secuencias de ribozima dentro de los ARN antisentido confiere actividad de escisión de ARN a los mismos, lo que aumenta la actividad de los constructos antisentido.

Las ribozimas útiles pueden comprender típicamente una región de hibridación de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, que es complementaria en secuencia de nucleótidos a al menos parte del ARNm de MASP-2 diana, y una región catalítica que está adaptada para escindir el ARNm de MASP-2 diana (véanse en general, EPA Núm. 0 321 201; WO88/04300; Haseloff, J., et al., *Nature* 334:585-591, 1988; Fedor, M.J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1668-1672, 1990; Cech, T.R., et al., *Ann. Rev. Biochem.* 55:599-629, 1986).

Las ribozimas se pueden dirigir directamente a las células en forma de oligonucleótidos de ARN que incorporan secuencias de ribozima, o se pueden introducir en la célula como un vector de expresión que codifica el ARN ribozimal deseado. Las ribozimas se pueden utilizar y aplicar de la misma manera que se describe para los polinucleótidos antisentido.

Los ARN y ADN antisentido, las ribozimas y las moléculas de ARNi útiles en los métodos descritos en la presente memoria se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de ADN y ARN. Estas incluyen mecanismos para sintetizar químicamente oligodesoxirribonucleótidos y oligorribonucleótidos bien conocidos en la técnica, tales como por ejemplo síntesis química de fosforamidita en fase sólida. Alternativamente, las moléculas de ARN se pueden generar por medio de transcripción de secuencias de ADN *in vitro* e *in vivo* que codifican la molécula de ARN antisentido. Tales secuencias de ADN se pueden incorporar a una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Alternativamente, los constructos de ADNc antisentido que sintetizan ARN antisentido constitutivamente o induciblemente, dependiendo del promotor utilizado, se pueden introducir de forma estable en líneas celulares.

Se pueden introducir diversas modificaciones bien conocidas de las moléculas de ADN como medio para aumentar la estabilidad y la semivida. Las modificaciones útiles incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula o al uso de 2'-O-metil-fosforotioato en lugar de enlaces fosfodiéster dentro de la cadena principal de oligodesoxirribonucleótido.

V. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y MÉTODOS DE SUMINISTRO

DOSIFICACIÓN

En la presente memoria se describen composiciones para la inhibición de 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 portador farmacéuticamente aceptable. Los agentes inhibidores de MASP-2 se pueden administrar a un sujeto que lo necesite, en dosis terapéuticamente eficaces para tratar o mejorar las afecciones asociadas con la activación del complemento dependiente de MASP-2. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad del agente inhibidor de MASP-2 suficiente para producir una mejora de los síntomas de la enfermedad.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los agentes inhibidores de MASP-2 se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales que emplean modelos animales experimentales, tales como el modelo de ratón MASP-2 *-/-* murino que expresa el transgén de MASP-2 humano descrito en el Ejemplo 3. Utilizando tales modelos animales, se pueden determinar el NOAEL (nivel sin efecto adverso observado) y la DME (dosis mínima eficaz) empleando métodos convencionales. La razón de dosis entre los efectos NOAEL y DME es la razón terapéutica, que se expresa como la razón NOAEL/DME. Los agentes inhibidores de MASP-2 que muestran razones o índices terapéuticos grandes son los más preferidos. Los datos obtenidos a partir de los análisis de cultivos celulares y estudios con animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificaciones para su uso en seres humanos. La dosificación del agente inhibidor de MASP-2 se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DME con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada.

Para cualquier formulación del compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar utilizando modelos

animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis en un modelo animal para conseguir un intervalo de concentración en plasma circulante que incluya la DME. Los niveles cuantitativos del agente inhibidor de MASP-2 en el plasma también se pueden medir, por ejemplo, por medio de cromatografía líquida de alto rendimiento.

5 Además de los estudios de toxicidad, la dosis eficaz también puede ser estimada basándose en la cantidad de proteína MASP-2 presente en un sujeto vivo y en 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 a niveles bajos en el intervalo de 500 ng/ml, y los niveles de MASP-2 en un sujeto en particular se pueden determinar utilizando un análisis cuantitativo para MASP-2 descrito por Moller-Kristensen M., et al., *J. Immunol. Methods* 282:159-167, 2003.

10 Generalmente, la dosificación de composiciones administradas que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 varía en función de factores tales como la edad, peso, altura, sexo, estado médico general e historia médica anterior del sujeto. Como una ilustración, los agentes inhibidores de MASP-2, tales como los anticuerpos anti MASP-2, se pueden administrar a intervalos de dosificación de aproximadamente 0,010 a 10,0 mg/kg, preferiblemente de 0,010 a 1,0 mg/kg más preferiblemente de 0,010 a 0,1 mg/kg de peso corporal del sujeto. En algunos aspectos, la composición comprende una combinación de anticuerpos anti-MASP-2 y péptidos inhibidores de MASP-2.

15 La eficacia terapéutica de las composiciones inhibidoras de MASP-2 y los métodos descritos en la presente memoria en un sujeto dado, y las dosis apropiadas, se puede determinar de acuerdo con los análisis del complemento bien conocidos por los expertos en la técnica. El complemento genera numerosos productos específicos. Durante la última década, se han desarrollado análisis sensibles y específicos y están disponibles comercialmente para la mayoría de estos productos de activación, incluyendo 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 análisis utilizan los anticuerpos monoclonales que reaccionan con los nuevos antígenos (neoantígenos) expuestos en el fragmento, pero no en las proteínas nativas a partir de las cuales se forman, haciendo estos análisis muy simples y específicos. La mayoría se basan en la tecnología ELISA, aunque todavía se utiliza a veces el radioinmunoanálisis para C3a y C5a. Estos últimos análisis miden tanto los fragmentos no procesados como sus fragmentos 'desArg', que son las formas principales que se encuentran en la circulación. Los fragmentos no procesados y C5a_{desArg} se eliminan rápidamente mediante la unión a receptores de la superficie celular y están, por lo tanto, presentes a concentraciones muy bajas, mientras que C3a_{desArg} no se une a las células y se acumula en el plasma. La medición de C3a proporciona un indicador de la activación del complemento sensible, independiente de la vía. La activación de la vía alternativa se puede evaluar midiendo el fragmento Bb. La detección del producto de la fase fluida de la activación de la vía de ataque a la membrana, sC5b-9, proporciona evidencia de que el complemento está siendo activado hasta su finalización. Debido a que tanto la vía de las lectinas como la clásica generan los mismos productos de activación, C4a y C4d, la medición de estos dos fragmentos no proporciona ninguna información acerca de cuál de estas dos vías ha generado los productos de activación.

AGENTES ADICIONALES

35 Las composiciones y métodos que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 pueden comprender opcionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales, que pueden aumentar la actividad del agente inhibidor de MASP-2 o que proporcionan funciones terapéuticas relacionadas de una manera aditiva o sinérgica. Por ejemplo, se pueden administrar uno o más agentes inhibidores de MASP-2 combinados con uno o más agentes anti-inflamatorios y/o analgésicos. La inclusión y la selección de uno o varios agentes adicionales serán determinadas para lograr un resultado terapéutico deseado. Los agentes anti-inflamatorios y/o analgésicos adecuados incluyen: antagonistas de los receptores de serotonina; agonistas de los receptores de serotonina; antagonistas de los receptores de histamina; antagonistas de los receptores de bradiquina; inhibidores de calicreína; antagonistas de los receptores de taquiquininas, incluyendo antagonistas del subtipo de receptores de neuroquinina₁ y neuroquinina₂; antagonistas de receptores de péptidos relacionados con el gen de la calcitonina (CGRP); antagonistas del receptor de interleuquina; inhibidores de enzimas activas en la ruta sintética para metabolitos de ácido araquidónico, incluyendo inhibidores de fosfolipasa, incluyendo inhibidores de la isoforma PLA₂ e inhibidores de la isoforma PLC_γ, inhibidores de la ciclooxigenasa (COX) (que puede ser inhibidores de COX-1, COX-2, o de COX-1 y -2 no selectivos), inhibidores de lipooxigenasa; antagonistas de los receptores prostanoides, incluyendo antagonistas del subtipo de receptores EP-1 y EP-4 eicosanoides y antagonistas del subtipo de receptor de tromboxano; antagonistas de los receptores de leucotrienos, incluyendo antagonistas del subtipo de receptor de leucotrieno B₄ y antagonistas del subtipo de receptor de leucotrieno D₄; agonistas de los receptores opioides, incluyendo los agonistas del subtipo μ-opioide, δ-opioide, y κ-opioide; agonistas y antagonistas de purinoceptores incluyendo antagonistas de los receptores P_{2X} y agonistas de los receptores P_{2Y}; abridores del canal de potasio sensibles a adenosintrifosfato (ATP); inhibidores de la MAP quinasa; inhibidores nicotínicos de acetilcolina; y agonistas del receptor alfa adrenérgico (incluyendo agonistas alfa-1, alfa-2, y alfa-1 y 2 no selectivos).

Los agentes inhibidores de MASP-2 descritos en la presente memoria también se pueden administrar combinados con uno o más de otros inhibidores del complemento. No hay inhibidores del complemento aprobados actualmente para su uso en seres humanos, sin embargo, se ha demostrado que algunos agentes farmacológicos bloquean el complemento *in vivo*. Muchos de estos agentes también son tóxicos o son sólo inhibidores parciales (Asghar, S.S., *Pharmacol. Rev.* 36:223-44, 1984), y el uso de éstos se ha limitado a la utilización como herramientas de investigación. K76COOH y mesilato de nafamstat son dos agentes que han mostrado 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 en la regulación de la actividad del complemento (Edens, R.E., et al., *Cumpliment Today*, págs. 96-120, Basilea: Karger, 1993). Se cree que estos inhibidores de molécula pequeña pueden ser útiles como agentes para su uso combinado con los agentes inhibidores de MASP-2 descritos en la presente memoria.

Otros inhibidores del complemento de origen natural pueden ser útiles combinados con los agentes inhibidores de MASP-2 descritos en la presente memoria. Los inhibidores biológicos del complemento incluyen el factor 1 del complemento soluble (sCR1). Éste es un inhibidor de origen natural que se puede encontrar en la membrana externa de las células humanas. Otros inhibidores de membrana incluyen DAF, MCP, y CD59. Las formas recombinantes se han sometido a ensayo para determinar 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 alternativo como clásico) proporciona el desencadenante de un síndrome de rechazo hiperactivo en el plazo de minutos después de la perfusión de sangre a través del 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 alarga el tiempo de supervivencia del órgano trasplantado, que implica 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).

Otros inhibidores del complemento adecuados para uso combinado con las composiciones descritas en la presente memoria también incluyen, a modo de ejemplo, MoAb tales como los que están siendo desarrollados por Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut, y MoAb anti-properdina.

PORTADORES Y VEHÍCULOS DE SUMINISTRO FARMACÉUTICOS

En general, las composiciones de agentes inhibidores de MASP-2 descritas en la presente memoria, combinados con otros agentes terapéuticos seleccionados, están contenidos de forma adecuada en un portador farmacéuticamente aceptable. El portador es no tóxico, biocompatible y se selecciona con el fin de no afectar perjudicialmente a la actividad biológica del agente inhibidor de MASP-2 (y cualquier otro agente terapéutico combinado con el mismo). Los portadores farmacéuticamente aceptables ilustrativos para los péptidos se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.211.657 de Yamada. Los anticuerpos anti-MASP-2 y los péptidos inhibidores se pueden formular en preparaciones en formas sólidas, semi-sólidas, en gel, líquidas o gaseosas tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, depósitos, inhalantes e inyecciones que permiten la administración oral, parenteral o quirúrgica. La descripción también contempla la administración local de las composiciones mediante el recubrimiento de dispositivos médicos y similares.

Los portadores adecuados para el suministro parenteral por vía inyectable, infusión o irrigación y el suministro tópico incluyen agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, solución de Ringer normal o con lactato añadido, solución de dextrosa, solución de Hank, o propanodiol. Además, se pueden emplear aceites fijos estériles como un medio disolvente o de suspensión. Para este propósito se puede emplear cualquier aceite biocompatible incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables. El portador y el agente se pueden componer en forma de un líquido, suspensión, gel polimerizable o no polimerizable, pasta o pomada.

El portador también puede comprender un vehículo de suministro para mantener (es decir, prolongar, retrasar o regular) el suministro del agente o los agentes o para mejorar el suministro, la absorción, la estabilidad o la farmacocinética del agente o los agentes terapéuticos. Semejante vehículo de suministro puede incluir, a modo de ejemplo no limitante, micropartículas, microesferas, nanoesferas o nanopartículas compuestas por proteínas, liposomas, carbohidratos, compuestos orgánicos sintéticos, compuestos inorgánicos, hidrogeles poliméricos y copoliméricos y micelas poliméricas. Los sistemas de suministro de hidrogeles y de micelas adecuados incluyen los copolímeros PEO:PHB:PEO y los complejos de copolímero/ciclodextrina descritos en el documento WO 2004/009664 A2 y los complejos de PEO y PEO/ciclodextrina descritos en la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2002/0019369 A1. Tales hidrogeles se pueden inyectar localmente en el sitio de acción deseado, o por vía subcutánea o por vía intramuscular para formar un depósito de liberación sostenida.

Para el suministro intra-articular, el agente inhibidor del MASP-2 puede ser presentado en portadores líquidos o en gel descritos anteriormente que son inyectables, vehículos de suministro de liberación sostenida descritos anteriormente que son inyectables, o un ácido hialurónico o derivado de ácido hialurónico.

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

Para la administración tópica, el agente inhibidor de MASP-2 se puede presentar en forma de ungüento, loción, crema, gel, gota, supositorio, pulverización, líquido o en polvo, o en sistemas de suministro en gel o microcapsulares o mediante un parche transdérmico.

Se están desarrollando varios sistemas de suministro nasales y pulmonares, incluyendo aerosoles, inhaladores de dosis medidas, inhaladores de polvo seco, y nebulizadores, y se pueden adaptar adecuadamente para el suministro

en un aerosol, inhalante, o vehículo de suministro nebulizado, respectivamente.

Para el suministro intratecal (IT) o intracerebroventricular (ICV), se pueden utilizar sistemas de suministro apropiadamente estériles (p. ej., líquidos; geles, suspensiones, etc.).

- 5 Las composiciones descritas en la presente memoria también pueden incluir excipientes biocompatibles, tales como agentes dispersantes o humectantes, agentes de suspensión, diluyentes, tampones, potenciadores de la penetración, emulsionantes, aglutinantes, espesantes, agentes aromatizantes (para administración oral).

PORTADORES FARMACÉUTICOS PARA ANTICUERPOS Y PÉPTIDOS

- 10 Más específicamente con respecto a los anticuerpos anti-MASP-2 y péptidos inhibidores, las formulaciones ilustrativas se pueden administrar por vía parenteral en forma de dosis inyectables de una solución o suspensión del compuesto en un diluyente fisiológicamente aceptable con un portador farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceites, solución salina, glicerol o etanol. Además, pueden estar presentes sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponadoras de pH y similares en las 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, 15 aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles tales como el propilenglicol o el polietilenglicol son portadores líquidos preferidos para soluciones inyectables.

Los anticuerpos anti-MASP-2 y péptidos inhibidores también se pueden administrar en forma de una inyección de depósito o preparación de implante que se puede formular de una manera tal que permita una liberación sostenida o pulsátil de los agentes activos.

20 PORTADORES FARMACÉUTICAMENTE ACEPTABLES PARA INHIBIDORES DE LA EXPRESIÓN

Más específicamente con respecto a los inhibidores de la expresión útiles en los métodos descritos en la presente memoria, se proporcionan composiciones que comprenden un inhibidor de la expresión como se ha descrito anteriormente y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender además un sistema de dispersión coloidal.

- 25 Las composiciones farmacéuticas que incluyen los inhibidores de la expresión pueden incluir, pero no se limitan a, soluciones, emulsiones, y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones se pueden generar a partir de una variedad de componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes. La preparación de tales composiciones típicamente implica la combinación del inhibidor de la expresión con uno o más de los siguientes: tampones, antioxidantes, polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas, aminoácidos, carbohidratos incluyendo glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes 30 quelantes tales como EDTA, glutatión y otros estabilizadores y excipientes. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina de suero no específica son ejemplos de diluyentes adecuados.

- 35 En algunos aspectos, las composiciones pueden ser preparadas y formuladas en forma de emulsiones que son normalmente sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas (véase, Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Vol. 1, Rieger y Banker (eds.), Marcek Dekker, Inc., N.Y., 1988). Los ejemplos de emulsionantes de origen natural utilizados en las formulaciones de emulsiones incluyen goma arábiga, cera de abejas, lanolina, lecitina y fosfátidos.

- 40 En un aspecto las composiciones que incluyen ácidos nucleicos pueden ser formuladas en forma de microemulsiones. Una microemulsión, según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un sistema de agua, aceite y anfifilo que es una solución líquida ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable, única (véase Rosoff en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Vol. 1). El método descrito en la presente memoria también puede utilizar liposomas para la transferencia y el suministro de oligonucleótidos antisentido en el sitio deseado.

- 45 Las composiciones y formulaciones farmacéuticas de los inhibidores de la expresión para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Se pueden utilizar portadores farmacéuticos convencionales, así como bases acuosas, en polvo u oleosas y espesantes y similares.

MODOS DE ADMINISTRACIÓN

- 50 Las composiciones farmacéuticas que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 se pueden administrar de numerosas maneras, dependiendo de si el modo de administración local o sistémico es el más apropiado para la afección que se vaya a tratar. Además, como se ha descrito en la presente memoria anteriormente con respecto a los procedimientos de reperfusión extracorpóreos, los agentes inhibidores de MASP-2 pueden ser administrados a través de la introducción de las composiciones descritas en la presente memoria en la sangre de recirculación o en el plasma. Además, las composiciones descritas en la presente memoria pueden ser suministradas por recubrimiento o incorporación de las composiciones sobre o dentro de un dispositivo médico implantable.

SUMINISTRO SISTÉMICO

Según se utilizan en la presente memoria, se pretende que los términos "suministro sistémico" y "administración sistémica" incluyan, pero no se limiten a las rutas oral y parenteral, incluyendo las rutas intramuscular (IM), subcutánea, intravenosa (IV), intra-arterial, por inhalación, sublingual, bucal, tópica, transdérmica, nasal, rectal, vaginal y otras rutas de administración que dan como resultado de manera eficaz la dispersión del agente suministrado en uno o varios sitios de acción terapéutica pretendida. Las rutas de administración sistémica preferidas para las presentes composiciones incluyen intravenosa, intramuscular, subcutánea y por inhalación. Se apreciará que la ruta de administración sistémica exacta para los agentes seleccionados utilizados en composiciones particulares de la presente invención se determinará, en parte, teniendo en cuenta la susceptibilidad del agente a las rutas de transformación metabólicas asociadas con una ruta de administración dada. Por ejemplo, los agentes peptidérgicos se pueden administrar más adecuadamente mediante rutas distintas de la oral.

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

A modo de ejemplo representativo, se pueden introducir anticuerpos y péptidos inhibidores de MASP-2 en un organismo vivo mediante la aplicación de una membrana corporal capaz de absorber los polipéptidos, por ejemplo, las membranas nasal, gastrointestinal y rectal. Los polipéptidos se aplican típicamente a la membrana de absorción junto con un potenciador de la 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 tiene una estructura similar a la de las sales biliares, y se ha utilizado como potenciador de la penetración para el suministro 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 los polipéptidos de la degradación enzimática. Por ejemplo, se ha utilizado el anclaje covalente de polímeros, en especial polietilenglicol (PEG), para proteger ciertas proteínas de la hidrólisis enzimática en el organismo y de ese modo prolongar la semivida (Fuertges, F., et al., *J. Controlled Release* 11:139, 1990). Se ha informado sobre muchos sistemas de polímeros para el suministro de proteínas (Bae, Y.H., et al., *J. Controller 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 una estabilidad en suero y tiempos medios de circulación mejorados (véase, p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.741.516, de Webb). Además, se han revisado diversos métodos de preparaciones de liposomas y de tipo liposómico como portadores de fármacos potenciales (véanse, p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.567.434, de Szoka; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.552.157, de Yagji; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.565.213, de Nakamori; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.738.868, de Shinkarenko; y Patente de los Estados Unidos Núm. 5.795.587, de Gao).

Para aplicaciones transdérmicas, se pueden combinar anticuerpos y polipéptidos inhibidores de MASP-2 con otros ingredientes adecuados, tales como portadores y/o coadyuvantes. No hay limitaciones sobre la naturaleza de tales otros ingredientes, excepto que deben ser farmacéuticamente aceptables para su administración pretendida, y que no pueden degradar la actividad de los ingredientes activos de la composición. Los ejemplos de los vehículos adecuados incluyen ungüentos, cremas, geles, o suspensiones, con o sin colágeno purificado. Los anticuerpos y polipéptidos inhibidores de MASP-2 también se pueden impregnar en parches transdérmicos, emplastos, y vendas, preferiblemente en forma líquida o semi-líquida.

Las composiciones descritas en la presente memoria se pueden administrar por vía sistémica periódicamente a intervalos determinados para mantener un nivel de efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, las composiciones se pueden administrar, mediante inyección subcutánea, cada dos a cuatro semanas, o a intervalos menos frecuentes. El régimen de dosificación será determinado por el médico considerando 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 vaya a tratar, la edad, sexo y peso del paciente, y otros factores clínicos. La dosificación para cada agente individual variará en función del agente inhibidor de MASP-2 que se incluya en la composición, así como de la presencia y la naturaleza de cualquier vehículo de suministro de fármacos (p. ej., un vehículo de suministro de liberación sostenida). Además, la cantidad de dosificación se puede ajustar para tener en cuenta la variación en la frecuencia de administración y el comportamiento farmacocinético del agente o los agentes suministrados.

SUMINISTRO LOCAL

Según se utiliza en la presente memoria, el término "local" abarca la aplicación de un fármaco en o alrededor de un sitio previsto de acción localizada, y puede incluir, por ejemplo el suministro tópico a la piel u otros tejidos afectados, el suministro oftálmico, la administración, colocación o irrigación intratecal (IT), intracerebroventricular (ICV), intra-articular, intracavitaria, intracraneal o intravesicular. La administración local puede ser preferible para permitir la administración de una dosis más baja, para evitar los efectos secundarios sistémicos, y para un control más preciso de la sincronización del suministro y la concentración de los agentes activos en el lugar de suministro local. La administración local proporciona una concentración conocida en el sitio diana, independientemente de la variabilidad entre pacientes en el metabolismo, flujo sanguíneo, etc. También se proporciona un mejor control de la dosificación por medio del modo directo de suministro.

El suministro local de un agente inhibidor de MASP-2 se puede lograr en el contexto de los métodos quirúrgicos para el tratamiento de una enfermedad o afección, tal como por ejemplo durante procedimientos como la cirugía de derivación arterial, atrectomía, procedimientos con láser, procedimientos con ultrasonidos, angioplastia con balón y colocación de dispositivo intraluminal. Por ejemplo, se puede administrar un inhibidor de MASP-2 a un sujeto combinado con un procedimiento de angioplastia con balón. Un procedimiento de angioplastia con balón implica la inserción de un catéter que tiene un balón desinflado en una arteria. El balón desinflado se coloca en la proximidad de la placa aterosclerótica y se infla de manera que la placa se comprima contra la pared vascular. Como resultado, la superficie del balón está en contacto con la capa de células endoteliales vasculares sobre la superficie del vaso sanguíneo. El agente inhibidor de MASP-2 puede estar unido al catéter de angioplastia con balón de una manera que permita la liberación del agente en el lugar de la placa aterosclerótica. El agente puede estar unido al catéter con balón de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, el agente puede ser almacenado en un compartimento del catéter con balón hasta que el balón se infla, momento en el que se libera en el entorno local. Alternativamente, el agente puede ser impregnado en la superficie del balón, de manera que entra en contacto con las células de la pared arterial a medida que se infla el balón. El agente también se puede suministrar en un catéter con balón perforado tal como los descritos por Flugelman, M.Y., et al., *Circulation* 85:1110-1117, 1992. Véase también la Solicitud PCT publicada WO 95/23161 para un procedimiento ilustrativo para el anclaje de una proteína terapéutica a un catéter de angioplastia con balón. Del mismo modo, el agente inhibidor de MASP-2 se puede incluir en un gel o recubrimiento polimérico aplicado a un dispositivo intraluminal, o se puede incorporar al material del dispositivo intraluminal, de manera que el dispositivo intraluminal eluya el agente inhibidor de MASP-2 después de la colocación vascular.

Las composiciones inhibidoras de MASP-2 utilizadas en el tratamiento de la artritis y otros trastornos musculoesqueléticos se pueden suministrar localmente por medio de inyección intra-articular. Tales composiciones pueden incluir de manera adecuada un vehículo de suministro de liberación sostenida. Como un ejemplo adicional de casos en los que puede ser deseable la administración local, las composiciones inhibidoras de MASP-2 utilizadas en el tratamiento de afecciones urogenitales pueden ser adecuadamente instiladas por vía intravesical o dentro de otra estructura urogenital.

RECUBRIMIENTOS SOBRE UN DISPOSITIVO MÉDICO

Los agentes inhibidores de MASP-2 tales como anticuerpos y péptidos inhibidores se pueden inmovilizar sobre (o dentro de) una superficie de un dispositivo médico implantable o anclable. La superficie modificada típicamente estará en contacto con el tejido vivo después de la implantación en un organismo animal. Por "dispositivo médico implantable o anclable" se entiende cualquier dispositivo que se implanta en, o se ancla a, tejido de un organismo animal, durante el funcionamiento normal del dispositivo (p. ej., dispositivos intraluminales y dispositivos de suministro de fármacos implantables). Tales dispositivos médicos implantables o anclables pueden estar elaborados, por ejemplo, de nitrocelulosa, diazocelulosa, vidrio, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), polipropileno, polietileno, dextrano, Sefarosa, agar, almidón, nailon, acero inoxidable, titanio y polímeros biodegradable y/o biocompatibles. La unión de la proteína a un dispositivo se puede lograr por cualquier técnica que no destruya la actividad biológica de la proteína ligada, por ejemplo anclando uno o ambos de los residuos N- o C-terminales de la proteína al dispositivo. El anclaje también se puede realizar en uno o más sitios internos en la proteína. También se pueden utilizar anclajes múltiples (tanto internos como en los extremos de la proteína). Una superficie de un dispositivo médico implantable o anclable puede ser modificada para que incluya grupos funcionales (p. ej., carboxilo, amida, amino, éter, hidroxilo, ciano, nitruro, sulfanamido, acetilénico, epoxi, silánico, anhídrico, succinimico, azido) para la inmovilización de la proteína a los mismos. Las químicas de acoplamiento incluyen, pero no se limitan a, la formación de ésteres, éteres, amidas, derivados azido y sulfanamido, cianato y otros enlaces a los grupos funcionales disponibles en los anticuerpos o péptidos inhibidores de MASP-2. Los anticuerpos o fragmentos inhibidores MASP-2 también se pueden unir de forma no covalente mediante la adición de una secuencia de etiqueta 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. Tales etiquetas de afinidad pueden ser utilizados para el anclaje reversible de la proteína a un dispositivo.

Las proteínas también se pueden unir covalentemente a la superficie de un cuerpo del dispositivo, por ejemplo, mediante la activación covalente de la superficie del dispositivo médico. A modo de ejemplo representativo, se pueden anclar una o varias proteínas matricelulares al cuerpo del dispositivo por cualquiera de los siguientes pares de grupos reactivos (estando presente un miembro del par en la superficie del cuerpo del dispositivo, y estando el otro miembro del par presente en la proteína o las proteínas matricelulares): hidroxilo/ácido carboxílico para producir

un enlace éster; hidroxilo/anhídrido para producir un enlace éster; hidroxilo/isocianato para producir un enlace uretano. Una superficie de un cuerpo del dispositivo que no posee grupos reactivos útiles se puede tratar mediante ataque de plasma de descarga de radiofrecuencia (RFGD) para generar grupos reactivos con el fin de permitir el depósito de la proteína o las proteínas matricelulares (p. ej., tratamiento con plasma de oxígeno para introducir grupos que contienen oxígeno, tratamiento con plasma de aminopropilo para introducir grupos amina).

Los agentes inhibidores de MASP-2 que comprenden moléculas de ácido nucleico tales como inhibidores peptídicos que codifican ARNi o ADN antisentido, se pueden incluir en matrices porosas ancladas al cuerpo de un dispositivo. Las matrices porosas representativas útiles para la fabricación de la capa superficial son aquellas preparadas a partir de tendón o colágeno dérmico, que pueden ser obtenidos a partir de una variedad de fuentes comerciales (p. ej., Sigma y Collagen Corporation), o matrices de colágeno preparadas como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.394.370, de Jefferies y 4.975.527, de Koezuka. Un material de colágeno se denomina Ultrafiber™ y se puede obtener de Norian Corp. (Mountain View, California).

También se pueden emplear si se desea ciertas matrices poliméricas, e incluyen polímeros de ésteres acrílicos y polímeros de ácido láctico, como se describe, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.526.909 y 4.563.489, de Urist. Los ejemplos particulares de polímeros útiles son los de ortoésteres, anhídridos, propileno-cofumaratos, o un polímero de uno o más monómeros de ácido alfa-hidroxicarboxílico, (p. ej., ácido α -hidroxiacético (ácido glicólico) y/o ácido α -hidroxipropiónico (ácido láctico)).

REGÍMENES DE TRATAMIENTO

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto susceptible a, o de otra manera en 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 las aplicaciones terapéuticas, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto 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 al menos reducir parcialmente, los síntomas de la afección. En los regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, las composiciones que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 se pueden administrar en varias dosis hasta que se logra un resultado terapéutico suficiente en el sujeto. La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-2 descritas en la presente memoria se puede llevar a cabo en una única administración de la composición, o en una secuencia limitada de administraciones, para el tratamiento de una afección aguda, p. ej., lesión por reperfusión u otras lesiones traumáticas. Alternativamente, la composición se puede administrar a intervalos periódicos durante un periodo prolongado de tiempo para el tratamiento de afecciones crónicas, p. ej., artritis o psoriasis.

Los métodos y composiciones descritos en la presente memoria se pueden utilizar para inhibir procesos de inflamación y relacionados que resultan típicamente de procedimientos médicos y quirúrgicos de diagnóstico y terapéuticos. Para inhibir estos procesos, la composición inhibidora de MASP-2 descrita en la presente memoria se puede aplicar de manera periprocedimental. Según se utiliza en la presente memoria "de manera periprocedimental" se refiere a la administración de la composición inhibidora de manera preprocedimental y/o intraprocedimental y/o postprocedimental, 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 periprocedimental se puede llevar a cabo mediante la administración local de la composición a la zona quirúrgica o de procedimiento, tal como mediante inyección o irrigación continua o intermitente del sitio o por medio de administración sistémica. Los métodos adecuados para el suministro perioperatorio local de las soluciones de agentes inhibidores de MASP-2 se describen en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.420.432 de Demopulos y 6.645.168 de Demopulos. Los métodos adecuados para el suministro local de composiciones condroprotectoras incluyendo uno o varios agentes inhibidores de MASP-2 se describen en la Solicitud de Patente Internacional PCT WO 01/07067 A2. Los métodos y composiciones adecuados para el suministro sistémico dirigido de composiciones condroprotectoras incluyendo uno o varios agentes inhibidores de MASP-2 se describen en la Solicitud de Patente Internacional PCT WO 03/063799 A2.

VI. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran meramente el mejor modo contemplado ahora para la práctica de la invención, pero no debe interpretarse que limitan la invención.

EJEMPLO 1

Este ejemplo describe la generación de una cepa de ratón con deficiencia de MASP-2 (MASP-2^{-/-}) pero con suficiente MAp19 (MAp19^{+/+}).

Materiales y métodos: El vector de direccionamiento pKO-NTKV 1901 fue diseñado para interrumpir los tres exones que codifican el extremo C-terminal de MASP-2 murino, incluyendo el exón que codifica el dominio de serina proteasa, como se muestra en la Figura 4. Se utilizó pKO-NTKV 1901 para transfectar la línea celular murina ES E14.1a (SV129 Ola). Se seleccionaron clones resistentes a la Neomicina y sensibles a la Timidina Quinasa. Se escrutaron 600 clones ES y, de éstos, se identificaron cuatro clones diferentes y se verificó mediante transferencia

Southern que contenían el evento de direccionamiento y recombinación selectivo esperado, como se muestra en la Figura 4. Las quimeras se generaron a partir de estos cuatro clones positivos mediante transferencia de embriones. Las quimeras se sometieron después a retrocruzamiento en la base genética C57/BL6 para crear machos transgénicos. Los machos transgénicos se cruzaron con hembras para generar F1, mostrando 50% de las crías heterocigotas para el gen *MASP-2* interrumpido. Los ratones heterocigotos fueron entrecruzados para generar crías con deficiencia de *MASP-2* homocigota, lo que da como resultado ratones heterocigotos y de tipo salvaje a una razón de 1:2:1, respectivamente.

Resultados y Fenotipo: Se encontró que los ratones con deficiencia de *MASP-2*^{-/-} homocigotos resultantes eran viables y fértiles y se verificó que tenían deficiencia de *MASP-2* mediante transferencia Southern para confirmar el evento de direccionamiento correcto, mediante transferencia de Northern para confirmar la ausencia de ARNm de *MASP-2*, y mediante transferencia Western para confirmar la ausencia de la proteína *MASP-2* (datos no mostrados). La presencia de ARNm de MAP19 y la ausencia de ARNm de *MASP-2* se confirmaron adicionalmente usando RT-PCR resuelta en el tiempo en una máquina LightCycler. Los ratones *MASP-2*^{-/-} siguen expresando ARNm y proteína MAP19, *MASP-1*, y *MASP-3* como se esperaba (datos no mostrados). La presencia y abundancia de ARNm en los ratones *MASP-2*^{-/-} para properdina, Factor B, Factor D, C4, C2, y C3 se evaluó mediante análisis LightCycler y se encontró que eran idénticas a la de los controles de la camada de tipo salvaje (datos no mostrados). El plasma de los ratones *MASP-2*^{-/-} homocigotos carece totalmente de la activación del complemento mediada por la vía de las lectinas y la activación del complemento de la vía alternativa como se describe adicionalmente en el EJEMPLO 2.

Generación de una cepa *MASP-2*^{-/-} en una Base C57BL6 pura: Los ratones *MASP-2*^{-/-} se someten a retrocruzamiento con una línea C57BL6 pura durante nueve generaciones antes del uso de la cepa *MASP-2*^{-/-} como un modelo animal experimental.

EJEMPLO 2

Este ejemplo demuestra que *MASP-2* es necesaria para la activación del complemento a través de la vía alternativa y de las lectinas.

Métodos y materiales:

Análisis de escisión de C4 específica de la vía de las lectinas: Un análisis de escisión de C4 ha sido descrito por Petersen, et al., *J. Immunol. Methods* 257:107 (2001) que mide la activación de la vía de las lectinas resultante del ácido lipoteicoico (LTA) de *S. aureus*, que se une a L-ficolina. El análisis descrito en el EJEMPLO 11 se adaptó para medir la activación de la vía de las lectinas a través de MBL mediante el recubrimiento de la placa con LPS y manano o zimosano antes de añadir suero de ratones *MASP-2*^{-/-} como se describe a continuación. El análisis también se modificó para eliminar la posibilidad de escisión de C4 debida a la vía clásica. Esto se logró mediante el uso de un tampón de dilución de muestra que contenía NaCl 1 M, que permite la unión de alta afinidad de los componentes de reconocimiento de la vía de las lectinas a sus ligandos, pero impide la activación de C4 endógena, lo que excluye la participación de la vía clásica mediante la disociación del complejo C1. Descrito en pocas palabras, las muestras de suero de análisis modificadas (diluidas en tampón de alta concentración de sal (NaCl 1 M)) se añaden a las placas recubiertas con ligando, seguido 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, lo que da como resultado el depósito de C4b.

Métodos de análisis:

1) Se recubrieron placas de microtitulación Nunc Maxisorb (Maxisorb, Nunc, Núm. Cat. 442404, Fisher Scientific) con 1 µg/ml de manano (M7504 Sigma) o cualquier otro ligando (p.ej., tales como los enumerados a continuación) diluidos en tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM, pH 9,6).

En el análisis se utilizaron los siguientes reactivos:

- a. manano (1 µg/pocillo de manano (M7504 Sigma) en 100 µl de tampón de recubrimiento);
- b. zimosano (1 µg/pocillo de zimosano (Sigma) en 100 µl de tampón de recubrimiento);
- c. LTA (1 µg/pocillo en 100 µl de tampón de recubrimiento o 2 µg/pocillo en 20 µl de 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 de tampón de recubrimiento)
- f. 100 µl/pocillo de *S. aureus* DSM20233 (DO₅₅₀= 0,5) fijado con formalina en tampón de recubrimiento.

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

3) Después de la incubación durante la noche, los sitios de unión de las proteínas residuales se saturaron incubando las placas con tampón de bloqueo de HSA al 0,1%-TBS (HSA al 0,1% (p/v) en Tris-Cl 10 mM, NaCl 140 mM, NaN₃

1,5 mM, pH 7,4) durante 1-3 horas, a continuación, lavando las placas 3 veces con TBS/Tween/Ca²⁺ (TBS con Tween 20 al 0,05% y CaCl₂ 5 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,4).

4) Las muestras de suero que se debían someter a ensayo se diluyeron en tampón de unión de 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 recibían únicamente tampón se utilizaron como controles negativos.

5) Después de la incubación durante la noche a 4°C, las placas se lavaron 3 veces con TBS/Tween/Ca²⁺. A continuación se añadió a las placas C4 humana (100 µl/pocillo de 1 µg/ml diluido en BBS (barbital 4 mM, NaCl 145 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,4)) y se incubaron durante 90 minutos a 37°C. Las placas se lavaron de nuevo 3 veces con TBS/Tween/Ca²⁺.

6) El depósito de C4b se detectó con un anti-C4c humana de pollo conjugado con fosfatasa alcalina (diluido 1:1000 en TBS/Tween/Ca²⁺), que se añadió a las placas y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo 3 veces con TBS/Tween/Ca²⁺.

7) La fosfatasa alcalina se detectó mediante la adición de 100 µl de solución de sustrato de fosfato de *p*-nitrofenilo, incubando a temperatura ambiente durante 20 minutos, y leyendo la DO₄₀₅ en un lector de placas de microtitulación.

Resultados: Las FIGURAS 6A-B muestran la cantidad de depósito de C4b en manano (Figura 6A) y zimosano (Figura 6B) en diluciones de suero de MASP-2+/+ (cruces), MASP-2+/- (círculos cerrados) y MASP-2-/- (triángulos cerrados). La Figura 6C muestra la actividad convertasa de C4 relativa sobre placas recubiertas con zimosano (barras de color blanco) o manano (barras sombreadas) de ratones MASP-2+/+ (n = 5) y ratones MASP-2-/- (n = 4) con respecto a ratones de tipo salvaje (n = 5) basándose en la medición de la cantidad de depósito de C4b normalizado a suero de tipo salvaje. Las barras de error representan la desviación típica. Como se muestra en las Figuras 6A-C, el plasma de los ratones MASP-2-/- es totalmente deficiente en la activación del complemento mediada por la vía de las lectinas sobre placas recubiertas de manano y de zimosano. Estos resultados demuestran claramente que MASP-2, pero no MASP-1 o MASP-3, es el componente efector de la vía de las lectinas.

Análisis de depósito de C3b:

1) Se recubren placas de microtitulación Nunc Maxisorb (Maxisorb, Nunc, Núm. Cat. 442404, Fisher Scientific) con 1 µg/pocillo de manano (M7504 Sigma) o cualquier otro ligando diluido en tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM pH 9,6) y se incuban durante la noche a 4°C.

2) Los sitios de unión a proteína residuales se saturan mediante la incubación de la placa con tampón de bloqueo de HSA al 0,1%-TBS (HSA al 0,1% (p/v) en Tris-Cl 10 mM, NaCl 140 mM, NaN₃ 1,5 mM, pH 7,4) durante 1-3 horas.

3) Las placas se lavan en TBS/tw/Ca⁺⁺ (TBS con Tween 20 al 0,05% y CaCl₂ 5 mM) y se añade BBS diluida a las muestras de suero (barbital 4 mM, NaCl 145 mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,4). Los pocillos que reciben sólo tampón se utilizan como controles negativos. Un conjunto de control de muestras de suero obtenidas de ratones de tipo salvaje o MASP-2-/- están empobrecidas en C1q antes de su uso en el análisis. El suero de ratón empobrecido en C1q se preparó utilizando Dynabeads acopladas a proteína A (DynaL Biotech, Oslo, Noruega) recubiertas con IgG de conejo anti-C1q humano (Dako, Glostrup, Dinamarca), de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

4) Después de la incubación durante la noche a 4°C, y otro lavado con TBS/tw/Ca⁺⁺, C3 convertido y unido se detecta con un Anticuerpo policlonal anti-C3c humana (Dako A 062) diluido en TBS/tw/Ca⁺⁺ a 1:1000). El anticuerpo secundario es IgG de cabra anti-conejo (molécula completa) conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Immunochemicals A-3812) diluido 1:10.000 en TBS/tw/Ca⁺⁺. La presencia de la vía alternativa del complemento (AP) se determina mediante la adición de 100 µl de solución de sustrato (conjuntos de comprimidos Sigma Fast de Fosfato de *p*-Nitrofenilo, Sigma) e incubación a temperatura ambiente. La hidrólisis se controla cuantitativamente mediante la medición de la absorción a 405 nm en un lector de placas de microtitulación. Se prepara una curva patrón para cada análisis utilizando diluciones seriadas de las muestras de plasma/suero.

Resultados: Los resultados mostrados en las FIGURAS 7A y 7B son de suero agrupado de varios ratones. Las cruces representan suero MASP-2+/+, los círculos rellenos representan suero MASP-2+/+ empobrecido en C1q, los cuadrados abiertos representan suero MASP-2-/- y los triángulos abiertos representan suero MASP-2-/- empobrecido en C1q. Como se muestra en las FIGURAS 7A-B, el suero de los ratones MASP-2-/- sometido a ensayo en un análisis de depósito de C3b dio como resultado niveles muy bajos de activación de C3 en placas recubiertas con manano (FIGURA 7A) y con zimosano (FIGURA 7B). Este resultado demuestra claramente que MASP-2 es necesaria para contribuir a la generación de C3b inicial a partir de C3 para iniciar la vía alternativa del complemento. Este es un resultado sorprendente en vista de la opinión ampliamente aceptada de que los factores C3, factor B, el factor D y properdina del complemento forman una vía alternativa funcional independiente en la que C3 puede experimentar un cambio conformacional espontáneo a una forma "de tipo C3b" que genera a continuación una iC3Bb convertasa en fase de fluido y deposita moléculas de C3b sobre superficies de activación, tales como zimosano.

MASP-2 recombinante reconstituye la activación de C4 dependiente de la vía de las lectinas en el suero de

ratones MASP-2^{-/-}

Con el fin de establecer que la ausencia de MASP-2 era la causa directa de la pérdida de la activación de C4 dependiente de la vía de las lectinas en ratones MASP-2^{-/-}, el efecto de la adición de proteína MASP-2 recombinante a muestras de suero fue examinado en el análisis de escisión de C4 descrito anteriormente. Las proteínas recombinantes MASP-2 murina funcionalmente activa y MASP-2A murina catalíticamente inactiva (en la que el residuo de serina del sitio activo en el dominio de la serina proteasa se substituyó por el residuo alanina) se produjeron y se purificaron como se describe a continuación en el EJEMPLO 5. El suero agrupado de 4 ratones MASP-2^{-/-} se pre-incubó con concentraciones crecientes de proteína de actividad MASP-2A murina recombinante o MASP-2 murina recombinante inactiva y se sometió a ensayo la actividad convertasa de C4 como se ha descrito anteriormente.

Resultados: Como se muestra en la FIGURA 8, la adición de proteína MASP-2 recombinante murina funcionalmente activa (que se muestra en forma de triángulos abiertos) al suero obtenido de ratones MASP-2^{-/-} restauró la activación de C4 dependiente de la vía de las lectinas de una manera dependiente de la concentración de proteína, mientras que la proteína MASP-2A murina catalíticamente inactiva (que se muestra en forma de estrellas) no restauró la activación de C4. Los resultados mostrados en la FIGURA 8 se normalizan a la activación de C4 observada con suero de ratón de tipo salvaje agrupado (que se muestra en forma de una línea de puntos).

EJEMPLO 3

Este ejemplo describe la generación de una cepa de ratón transgénico que es MASP-2^{-/-} murina, M^{Ap}19^{+/+} y que expresa un transgén MASP-2 humano (una MASP-2 murina desactivada y una MASP-2 humana activada).

Materiales y métodos: Se construyó un minigen que codificaba MASP-2 humana denominado "mini hMASP-2" (SEQ ID NO: 49) como se muestra en la FIGURA 5 que incluye la región promotora del gen *MASP 2* humano, incluyendo los 3 primeros exones (exón 1 a exón 3), seguido de la secuencia de ADNc que representa la secuencia codificante de los siguientes 8 exones, que codifican por lo tanto la proteína MASP-2 completa dirigida por su promotor endógeno. El constructo mini hMASP-2 se inyectó a huevos fertilizados de MASP-2^{-/-} con el fin de reemplazar el gen *MASP 2* murino deficiente por MASP-2 humana expresada transgénicamente.

EJEMPLO 4

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

Método de aislamiento de MASP-2 humana: Un método para el aislamiento de MASP-2 a partir de suero humano ha sido descrito por Matsushita et al., *J. Immunol.* 165: 2637-2642, 2000. Brevemente, el suero humano se pasa a través de una columna de manano de levadura-Sefarosa utilizando un tampón de imidazol 10 mM (pH 6,0) que contiene NaCl 0,2 M, CaCl₂ 20 mM, NPGb 0,2 mM, *p*-APMSF 20 mM, y 2% de manitol. Las proenzimas MASP-1 y MASP-2 forman complejo con MBL y se eluyen con el tampón anterior que contiene manosa 0,3 M. Para separar las proenzimas MASP-1 y MASP-2 de MBL, las preparaciones que contienen el complejo se aplican a anti-MBL-Sefarosa y a continuación 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 una de la otra pasando a través de anti-MASP-1-Sefarosa en el mismo tampón que el utilizado para anti-MBL-Sefarosa. Se recupera 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 proteína MASP-2 humana, de rata y murina, completa recombinante, polipéptidos derivados de MASP-2, y formas mutantes catalíticamente inactivas de MASP-2

Expresión de MASP-2 humana, murina y de rata completa:

La secuencia de ADNc completa de MASP-2 humana (SEQ ID NO: 4) se subclonó también en el vector de expresión de mamífero pCI-Neo (Promega), que conduce la expresión eucariota bajo el control de la región potenciadora/promotora de CMV (descrita por R. J. Kaufman et al., *Nucleic Acids Research* 19:4485-90, 1991; Kaufman, *Methods in Enzymology*, 185:537-66 (1991)). El ADNc completo de ratón (SEQ ID NO: 50) y el ADNc MASP-2 de rata (SEQ ID NO: 53) se subclonaron cada uno en el vector de expresión pED. Los vectores de expresión de MASP-2 se transfectaron a continuación a la línea celular de ovario de hámster chino adherente DXB1 utilizando el procedimiento de transfección con fosfato de calcio convencional descrito por Maniatis et al., 1989. Las células transfectadas con estos constructos crecieron muy lentamente, lo que implica que la proteasa codificada es citotóxica.

En otro enfoque, el constructo de minigén (SEQ ID NO: 49) que contiene el ADNc humano de MASP-2 conducido por su promotor endógeno se transfecta transitoriamente a células de ovario de hámster chino (CHO). La proteína MASP-2 humana se secreta al medio de cultivo y se aísla como se describe a continuación.

Expresión de MASP-2 catalíticamente inactiva completa:

Fundamento: MASP-2 se activa mediante la escisión autocatalítica después de que los subcomponentes de reconocimiento de MBL o ficolinas (ya sea L-ficolina, H-ficolina o M-ficolina) se unan a sus respectivos patrones de carbohidratos. A menudo se produce la escisión autocatalítica que da como resultado la activación de MASP-2 durante el procedimiento de aislamiento de MASP-2 a partir de suero, o durante la purificación que sigue a la expresión recombinante. Con el fin de obtener una preparación de proteína más estable para su uso como antígeno, se creó una forma catalíticamente inactiva de MASP-2, diseñada como MASP-2A mediante la sustitución del residuo de serina que está presente en la tríada catalítica del dominio de proteasa por un residuo de alanina, en la rata (SEQ ID NO: 55 Ser617 a Ala617); en el ratón (SEQ ID NO: 52 Ser617 a Ala617); o en el ser humano (SEQ ID NO: 3 Ser618 a Ala618).

Con el fin de generar proteínas MASP-2A humanas y murinas catalíticamente inactivas, se llevó a cabo la mutagénesis dirigida al sitio utilizando los oligonucleótidos mostrados en la TABLA 5. Los oligonucleótidos de la TABLA 5 fueron diseñados para hibridar con la región del ADNc humano y murino que codifica la serina enzimáticamente activa y el oligonucleótido contiene un emparejamiento erróneo con el fin de cambiar el codón de serina a un codón de alanina. Por ejemplo, se utilizaron los oligonucleótidos de PCR de los SEQ ID NOS: 56-59 combinados con ADNc de MASP-2 (SEQ ID NO: 4) para amplificar la región desde el codón de inicio de la serina enzimáticamente activa y desde la serina al codón de parada para generar la lectura abierta completa de MASP-2A mutada que contenía la mutación de Ser618 a Ala618. Los productos de PCR se purificaron después de la electroforesis en gel de agarosa y la preparación de bandas y se generaron solapamientos de una sola adenosina utilizando un procedimiento de formación de cola convencional. A continuación MASP-2A con cola de adenosina se clonó en el vector pGEM-T Easy, transformado en *E. coli*.

Se generó una proteína de rata MASP-2A catalíticamente inactiva mediante tratamiento con quinasa y reasociación de los SEQ ID NO: 64 y SEQ ID NO: 65 mediante la combinación de estos dos oligonucleótidos en cantidades molares iguales, calentamiento a 100°C durante 2 minutos y enfriamiento lento a temperatura ambiente. El fragmento reasociado resultante tiene extremos Pst1 y Xba1 compatibles y se insertó en lugar del fragmento Pst1-Xba1 del ADNc de MASP-2 de rata de tipo salvaje (SEQ ID NO: 53) para generar MASP-2A de rata.

5' GAGGTGACGCAGGAGGGGCATTAGTGTTT 3' (SEQ ID NO: 64)

5' CTAGAAACACTAATGCCCTCCTGCGTCACCTCTGCA 3' (SEQ ID NO: 65)

Las MASP-2A humana, murina y de rata se subclonaron cada una adicionalmente en cualquiera de los vectores de expresión de mamífero pED o pCI-Neo y se transflectaron a la línea celular de ovario de hámster chino DXB1 como se describe a continuación.

En otro enfoque, se construye una forma catalíticamente inactiva de MASP-2 utilizando el método descrito por Chen et al., *J. Biol. Chem.*, 276 (28):25894-25902, 2001. Brevemente, el plásmido que contiene el ADNc de MASP-2 humana completo (descrito por Thiel et al., *Nature* 386:506, 1997) se digiere con *Xho*1 y *Eco*R1 y el ADNc de MASP-2 (que se describe en la presente memoria como SEQ ID NO: 4) se clona en los sitios de restricción correspondientes del vector de transferencia de baculovirus pFastBac1 (Life Technologies, NY). El sitio activo de la serina proteasa MASP-2 en Ser618 es alterado a continuación a Ala618 mediante la sustitución de los oligonucleótidos de doble hebra que codifican los aminoácidos 610 a 625 de la región del péptido (SEQ ID NO: 13) con los aminoácidos 610 a 625 de la región nativa para crear un polipéptido MASP-2 completo con un dominio proteasa inactivo. Construcción de los plásmidos de expresión que contienen las regiones polipeptídicas derivadas de MASP-2 humana.

Los siguientes constructos se producen utilizando el péptido señal de MASP-2 (residuos 1-15 del SEQ ID NO: 5) para secretar diversos dominios de MASP-2. Se prepara un constructo que expresa el dominio CUBI de MASP-2 humana (SEQ ID NO: 8) amplificando mediante PCR la región que codifica los residuos 1-121 de MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (correspondiente al dominio CUBI N-terminal). Se prepara un constructo que expresa el dominio CUBIEGF de MASP-2 humana (SEQ ID NO: 9) amplificando mediante PCR la región que codifica los residuos 1-166 de MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (correspondiente al dominio CUBIEGF N-terminal). Se prepara un constructo de expresión del dominio CUBIEGFCUBII de MASP-2 humana (SEQ ID NO: 10) amplificando mediante PCR la región que codifica los residuos 1-293 de MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (correspondiente al dominio CUBIEGFCUBII N-terminal). Los dominios mencionados anteriormente se amplifican mediante PCR utilizando polimerasa Vent_R y pBS-MASP-2 como molde, de acuerdo con métodos de PCR establecidos. La secuencia del cebador 5' del cebador efector (5'-CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' SEQ 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 MASP-2, mostrados a continuación en la TABLA 5, se diseñan para introducir un codón de terminación (negrita) seguido de un sitio *Eco*RI (subrayado) en el extremo de cada producto de PCR. Una vez amplificados, los fragmentos de ADN se digieren con *Bam*HI y *Eco*RI y se clonan en los sitios correspondientes del vector pFastBac1. Los constructos resultantes se caracterizan mediante mapeo de restricción y se confirman mediante secuenciación del ADN de doble hebra.

TABLA 5: Cebadores de PCR MASP-2

Dominio MASP-2	Cebador de PCR 5'	Cebador de PCR 3'
SEQ ID NO: 8 CUBI (aa 1-121 del SEQ ID NO: 6)	5'CGGGATCCATGA GGCTGCTGACCCT C-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGGCTGCAT A (SEQ ID NO:35)
SEQ ID NO: 9 CUBIEGF (aa 1-166 del SEQ ID NO: 6)	5'CGGGATCCATGA GGCTGCTGACCCT C-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTACAGGGCGC T-3' (SEQ ID NO:36)
SEQ ID NO: 10 CUBIEGFCUBII (aa 1-293 del SEQ ID NO: 6)	5'CGGGATCCATGA GGCTGCTGACCCT C-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGTAGTGGA T 3' (SEQ ID NO:37)
SEQ ID NO: 4 MASP-2 humana	5'ATGAGGCTGCTG ACCCTCCTGGGCC TTC 3' (SEQ ID NO: 56) hMASP-2 directo	5'TTAAAATCACTAATTATG TTCTCGATC 3' (SEQ ID NO: 59) hMASP-2_inverso
SEQ ID NO: 4 ADNc de MASP-2 humana	5'CAGAGGTGACGC AGGAGGGGCAC 3' (SEQ ID NO: 58) hMASP-2_ala_directo	5'GTGCCCCCTCCTGCGTCAC CTCTG 3' (SEQ ID NO: 57) hMASP-2_ala_inverso
SEQ ID NO: 50 ADNc de MASP-2 Murina	5'ATGAGGCTACTC ATCTTCCTGG3' (SEQ ID NO: 60) mMASP-2 directo	5'TTAGAAATTACTIONTATTAT GTTCTCAATCC3' (SEQ ID NO: 63) mMASP-2_inverso
SEQ ID NO: 50 ADNc de MASP-2 Murina	5'CCCCCCTGCGT CACCTCTGCAG3' (SEQ ID NO: 62) mMASP-2_ala_directo	5'CTGCAGAGGTGACGCAG GGGGG 3' (SEQ ID NO: 61) mMASP-2_ala_inverso

Expresión eucariótica recombinante de MASP-2 y producción de proteínas de MASP-2A de ratón, rata y humana enzimáticamente inactivas.

- 5 Los constructos de expresión de MASP-2 y MASP-2A descritos anteriormente se transfectaron a células DXB1 utilizando el procedimiento de transfección convencional con fosfato de calcio (Maniatis et al., 1989). Se produjo MASP-2A en medio libre de suero para asegurarse de que las preparaciones no estaban contaminadas con otras proteínas del suero. El medio se recolectó a partir de células confluentes cada dos días (cuatro veces en total). El nivel de MASP-2A recombinante promedió aproximadamente 1,5 mg/litro de medio de cultivo para cada una de las tres especies.
- 10

Purificación de proteínas MASP-2A: La MASP-2A (mutante Ser-Ala descrito anteriormente) se purificó mediante cromatografía de afinidad en columnas de MBP-A-agarosa. Esta estrategia permitió la purificación rápida sin el uso

de etiquetas extrañas. La MASP-2A (100-200 ml de medio diluido con un volumen igual de tampón de carga (Tris-Cl 50 mM, pH 7,5, que contenía NaCl 150 mM y CaCl₂ 25 mM) se cargó en una columna de afinidad de MBP-agarosa (4 ml) pre-equilibrada con 10 ml de tampón de carga. Tras el lavado 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 la MASP-2A se identificaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Cuando fue necesario, MASP-2A se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico en una columna MonoQ (HR 5/5). La proteína se dializó con Tris-Cl 50 mM de pH 7,5, que contenía NaCl 50 mM y se cargó en la columna equilibrada en el mismo tampón. Después del lavado, la MASP-2A unida se eluyó con un gradiente de NaCl 0,05-1 M en 10 ml.

Resultados: Se obtuvieron rendimientos de 0,25-0,5 mg de proteína MASP-2A a partir de 200 ml de medio. La masa molecular de 77,5 kDa determinada mediante MALDI-MS es mayor que el valor calculado del polipéptido no modificado (73,5 kDa) debido a la glicosilación. El anclaje de glicanos a cada uno de los sitios de *N*-glicosilación justifica la masa observada. La MASP-2A migra como una sola banda en geles de SDS-poliacrilamida, lo que demuestra que no se procesa proteolíticamente durante la biosíntesis. La masa molecular media ponderal determinada por ultracentrifugación de equilibrio está de acuerdo con el valor calculado para los homodímeros del polipéptido glicosilado.

PRODUCCIÓN DE POLIPÉPTIDOS MASP-2 HUMANOS RECOMBINANTES

Otro método para producir polipéptidos derivados de MASP-2 y MASP2A recombinantes es descrito por Thielens, N.M., et al., *J. Immunol.* 166:5068-5077, 2001. Brevemente, se cultivan células de insecto de *Spodoptera frugiperda* (células Sf9 Ready-Plaques obtenidas de Novagen, Madison, WI) y se mantienen en medio libre de suero SF900II (Life Technologies) con un suplemento de 50 UI/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomycin (Life Technologies). Las células de insecto de *Trichoplusia ni* (High Five) (proporcionadas por Jadwiga Chroboczek, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, Francia) se mantienen en medio TC100 (Life Technologies) que contiene 10% de FCS (Dominique Dutscher, Brumath, Francia) con un suplemento de 50 UI/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomycin. Los baculovirus recombinantes se generan utilizando el sistema Bac-to-Bac (Life Technologies). El ADN de bácmido se purifica utilizando el sistema de purificación Qiagen Midiprep (Qiagen) y se utiliza para transfectar células Sf9 de insecto utilizando CellFECTIN en medio Sf900 II SFM (Life Technologies) como se describe en el protocolo del fabricante. Las partículas de virus recombinantes se recogen 4 días después, se titulan mediante el análisis en placa de virus, y se amplifican como describen King y Possee, en *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, Chapman and Hall Ltd., Londres, págs. 111-114, 1992.

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

Los polipéptidos MASP-2 se secretan en el medio de cultivo. Los sobrenadantes de cultivo se dializan frente a NaCl 50 mM, CaCl₂ 1 mM, hidrocloreuro de trietanolamina 50 mM, pH 8,1, y se cargan a 1,5 ml/min en una columna Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) (2,8 x 12 cm) equilibrada en el mismo tampón. La elución se lleva a cabo mediante la aplicación de un gradiente lineal de 1,2 litros de NaCl 350 mM en el mismo tampón. Las fracciones que contienen los polipéptidos MASP-2 recombinantes se identifican mediante análisis de transferencia Western, se precipitan por adición de (NH₄)₂SO₄ al 60% (p/v), y se dejan durante la noche a 4°C. Los sedimentos se resuspenden en NaCl 145 mM, CaCl₂ 1 mM, hidrocloreuro de trietanolamina 50 mM, pH 7,4, y se aplican sobre una columna TSK G3000 SWG (7,5 x 600 mm) (Tosohaas, Montgomeryville, PA) equilibrada en el mismo tampón. Los polipéptidos purificados se concentran a continuación a 0,3 mg/ml mediante ultrafiltración en microconcentradores Microsep (p.m. de corte = 10.000) (Filtron, Karlstein, Alemania).

EJEMPLO 6

Este ejemplo describe un método de producción de anticuerpos policlonales contra polipéptidos MASP-2.

Materiales y métodos:

Antígenos MASP-2: Se produce antisuero policlonal anti-MASP-2 humana mediante la inmunización de conejos con los siguientes polipéptidos MASP-2 aislados: MASP-2 humana (SEQ ID NO: 6) aislada a partir de suero como se describe en el EJEMPLO 4; MASP-2 humana recombinante (SEQ ID NO: 6), MASP-2A que contiene el dominio proteasa inactivo (SEQ ID NO: 13), como se describe en los EJEMPLOS 4-5; y CUBI (SEQ ID NO: 8), CUBEGFI (SEQ ID NO: 9), y CUBEGFCUBII (SEQ ID NO: 10) recombinantes, expresados como se describe anteriormente en el EJEMPLO 5.

Anticuerpos policlonales: Se inmunizan conejos de seis semanas de edad, cebados con BCG (vacuna de bacilo de Calmette-Guerin) inyectando 100 mg de polipéptido MASP-2 a 100 µg/ml en solución salina estéril. Las inyecciones se realizan cada 4 semanas, con el título de anticuerpos supervisado por análisis ELISA como se describe en el EJEMPLO 7. Los sobrenadantes de cultivo se recogen para la purificación de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad con proteína A.

EJEMPLO 7

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

Materiales y métodos:

- 5 A ratones macho A/J (Harlan, Houston, Tex.), 8-12 semanas de edad, se les inyectan por vía subcutánea 100 µg de polipéptidos rMASP-2 o rMASP-2A humanos o de rata (preparados como se describe en el EJEMPLO 4 o el EJEMPLO 5) en coadyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) en 200 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4. Con intervalos de dos semanas, a los ratones se les inyectan dos veces por vía subcutánea 50 µg de polipéptido rMASP-2 o rMASP-2A humano o de rata en coadyuvante incompleto de Freund.
- 10 La cuarta semana a los ratones se les inyectan 50 µg de polipéptido rMASP-2 o rMASP-2A humano o de rata en PBS y se fusionan 4 días después.

- Para cada fusión, se preparan suspensiones de células individuales de bazo de un ratón inmunizado y se utilizan para la fusión con las células Sp2/0 de mieloma. Se fusionan 5×10^8 de las células Sp2/0 y 5×10^8 de bazo en un medio que contiene 50% de polietilenglicol (P.M. 1450) (Kodak, Rochester, N.Y.) y 5% de dimetilsulfóxido (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Las células se ajustan a una concentración de $1,5 \times 10^5$ células de bazo por 200 µl de la suspensión en medio de Iscove (Gibco, Grand Island, NY), con un suplemento de 10% de suero fetal bovino, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, hipoxantina 0,1 mM, aminopterina 0,4 µM y timidina 16 µM. Se añaden doscientos µl de la suspensión celular a cada pocillo de aproximadamente veinte placas de microcultivo de 96 pocillos. Después de unos diez días los sobrenadantes de cultivo se retiran para el escrutinio de la reactividad con el factor MASP-2 purificado en un análisis ELISA.
- 15
- 20

- Análisis ELISA:** Los pocillos de microplacas de ensayo Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.) se recubren mediante la adición de 50 µl de hMASP-2 purificada a 50 ng/ml o rMASP-2 (o rMASP-2A) de rata durante la noche a temperatura ambiente. La baja concentración de MASP-2 para el recubrimiento permite la selección de anticuerpos de alta afinidad. Después de retirar la solución de recubrimiento con un movimiento rápido de la placa, se añaden a cada pocillo 200 µl de BLOTTO (leche en polvo sin grasa) en PBS durante una hora para bloquear los sitios no específicos. Una hora más tarde, los pocillos se lavan a continuación con un tampón de PBST (PBS que contiene Tween 20 al 0,05%). Se recogen cincuenta µl de sobrenadantes de cultivo de cada pocillo de fusión y se mezclan con 50 µl de BLOTTO y después se añaden a los pocillos individuales de las microplacas de análisis. Después de una hora de incubación, los pocillos se lavan con PBST. Los anticuerpos murinos unidos se detectan a continuación mediante reacción con anti-IgG de ratón de cabra (específico de Fc) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.) y se diluyen a 1:2.000 en BLOTTO. Se añade a los pocillos solución de sustrato de peroxidasa que contiene 0,1% de 3,3,5,5-tetrametil bencidina (Sigma, St. Louis, Mo.) y peróxido de hidrógeno al 0,0003% (Sigma) para el desarrollo del color durante 30 minutos. La reacción se termina mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ 2M por pocillo. La densidad óptica a 450 nm de la mezcla de reacción se lee con un lector ELISA de BioTek (BioTek Instruments, Winooski, Vt.).
- 25
- 30
- 35

Análisis de unión de MASP-2:

- Los sobrenadantes de cultivo que dan positivo en el análisis ELISA de MASP-2 descrito anteriormente se pueden someter a ensayo en un análisis de unión para determinar la afinidad de unión que los agentes inhibidores de MASP-2 tienen por MASP-2. Un análisis similar se puede utilizar también para determinar si los agentes inhibidores se unen a otros antígenos en el sistema del complemento.
- 40

- Los pocillos de placas de microtitulación de poliestireno (placas de 96 pocillos de medio de unión, Corning Costar, Cambridge, MA) se recubren con MASP-2 (20 ng/100 µl/pocillo, Advanced Research Technology, San Diego, CA) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4 durante la noche a 4°C. Después de aspirar la solución 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. Se añaden a los pocillos alícuotas de sobrenadantes de hibridoma o MoAb anti-MASP-2 purificados, a concentraciones variables en solución de bloqueo. Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se enjuagan exhaustivamente con PBS. El MoAb anti-MASP-2 unido a MASP-2 se detecta por medio de la adición de anti-IgG de ratón de cabra conjugado con peroxidasa (Sigma Chemical) en solución de bloqueo, que se deja incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se aclara de nuevo a fondo con PBS, y se añaden 100 µl de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (TMB) (Kirkegaard y Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). La reacción de TMB se interrumpe mediante la adición de 100 µl de ácido fosfórico 1 M, y la placa se lee a 450 nm en un lector de microplacas (SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).
- 45
- 50

- Los sobrenadantes de cultivo de los pocillos positivos se someten a ensayo a continuación para determinar la capacidad de inhibir la activación del complemento en un análisis funcional tal como el análisis de escisión de C4 como se ha descrito en el EJEMPLO 2. Las células en los pocillos positivos se clonan a continuación mediante dilución limitante. Los MoAb se someten a ensayo de nuevo para determinar la reactividad con hMASP-2 en un análisis ELISA como se describe anteriormente. Los hibridomas seleccionados se cultivan en matraces de agitación
- 55

y el sobrenadante de cultivo usado se recoge para la purificación de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad con proteína A.

EJEMPLO 8

5 Este ejemplo describe la generación de un ratón con el gen de MASP-2^{-/-} desactivado que expresa MASP-2 humano para su uso como un modelo para escrutar agentes inhibidores de MASP-2.

Materiales y métodos: Un ratón MASP-2^{-/-} como se describe en el EJEMPLO 1 y un ratón MASP-2^{-/-} que expresa un constructo transgénico de MASP-2 humana (con el gen de MASP-2 humano activado) como se describe en el EJEMPLO 3 se cruzan, y la progenie que son MASP-2^{-/-} murina, MAp19⁺ murina, MASP-2⁺ humana se utilizan para identificar agentes inhibidores de MASP-2 humana.

10 Tales modelos animales se pueden utilizar como sustratos de ensayo para la identificación y para determinar la 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 que desencadena la activación del complemento dependiente de MASP-2, y se administra un agente inhibidor de MASP-2 al modelo animal en un tiempo y a una
15 concentración suficientes para provocar una reducción de síntomas de la enfermedad en el animal expuesto.

Además, los ratones con MASP-2^{-/-} murina, MAp19⁺, MASP-2⁺ humana se pueden utilizar para generar líneas celulares que contienen uno o más tipos de células que participan en una enfermedad asociada a MASP-2 que se puede utilizar como un modelo de cultivo celular para ese trastorno. La generación de líneas celulares continuas de animales transgénicos es bien conocida en la técnica, por ejemplo véase Small, J. A., et al., *Mol. Cell Biol.*, 5:642-48,
20 1985.

EJEMPLO 9

Este ejemplo describe un método de producción de anticuerpos humanos contra MASP-2 humana en un ratón con el gen de MASP-2 desactivado que expresa MASP-2 humana e inmunoglobulinas humanas.

Materiales y métodos:

25 Se generó un ratón MASP-2^{-/-} como se describe en el EJEMPLO 1. A continuación, se construyó un ratón que expresaba 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 embrionarias modificada genéticamente para que contenga interrupciones elegidas como diana de los loci endógenos de cadena pesada y de cadena ligera de la inmunoglobulina y la expresión de al menos un segmento del locus de la inmunoglobulina humana. Preferiblemente, el segmento del locus de la inmunoglobulina humana incluye
30 secuencias no reordenadas de componentes de la cadena pesada y ligera. Tanto la inactivación de genes endógenos de inmunoglobulina como la introducción de genes exógenos de inmunoglobulina pueden lograrse por recombinación homóloga dirigida. Los mamíferos transgénicos resultantes de este proceso son capaces de reorganizar funcionalmente las secuencias de componentes de inmunoglobulina y expresar un repertorio de anticuerpos de diversos isotipos codificados por genes de inmunoglobulina humana, sin expresar genes endógenos de inmunoglobulina. Se describen la producción y propiedades de los mamíferos que tienen estas propiedades, por ejemplo véase Thomson, A. D., *Nature* 148:1547-1553, 1994 y Sloane, B. F., *Nature Biotechnology* 14:826, 1996. Las cepas de ratones modificadas genéticamente en las que los genes de anticuerpos de ratón son inactivados y
35 reemplazados funcionalmente por genes de anticuerpos humanos están disponibles comercialmente (p.ej., XenoMouse[®], disponible de Abgenix, Fremont CA). Los ratones de las camadas resultantes son capaces de producir MoAb humanos contra MASP-2 humana que son adecuados para su uso en terapia en seres humanos.

EJEMPLO 10

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

45 Se genera un anticuerpo monoclonal anti-MASP-2 murino en ratones macho A/J como se describe en el EJEMPLO 7. El anticuerpo murino es humanizado a continuación como se describe más abajo para reducir su inmunogenicidad mediante la sustitución de las regiones constantes murinas por sus contrapartes humanas para generar una IgG quimérica y un fragmento de Fab del anticuerpo, lo que es útil para la inhibición de los efectos adversos de la activación del complemento dependiente de MASP-2 en sujetos humanos, de acuerdo con la presente invención.

50 **1. Clonación de los genes de la región variable anti-MASP-2 a partir de células de hibridoma murino.** El ARN total se aísla de las células de hibridoma que segregan MoAb anti-MASP-2 (obtenido como se describe en el EJEMPLO 7) utilizando RNazol siguiendo el protocolo del fabricante (Biotech, Houston, Tex.). El ADNc de la primera hebra se sintetiza a partir del ARN total usando oligo dT como cebador. La PCR se realiza utilizando cebadores 3' derivados de la región C constante de inmunoglobulina y conjuntos de cebadores degenerados derivados del péptido
55 líder o la primera región marco de los genes de V_H o V_K murinos como cebadores 5'. La PCR anclada se lleva a cabo

como describen Chen y Platsucas (Chen, P. F., *Scand. J. Immunol.* 35:539-549, 1992). Para la clonación del gen de V_K , se prepara ADNc de doble hebra utilizando un cebador NotI-MAK1 (5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTTT-3' SEQ ID NO: 38). Se ligan adaptadores reasociados AD1 (5'-GGAATTCCTCGTTATTCTCGGA-3' SEQ ID NO: 39) y AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEQ ID NO: 40) a ambos extremos 5' y 3' del ADNc de doble hebra. Los adaptadores en los extremos 3' se eliminan mediante digestión con NotI. El producto digerido se utiliza a continuación como molde en la PCR con el oligonucleótido AD1 como cebador 5' y MAK2 (5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTTC-3' SEQ ID NO: 41) como cebador 3'. Los fragmentos de ADN de aproximadamente 500 pb se clonan en pUC19. Se seleccionan varios clones para el análisis de secuencia para verificar que la secuencia clonada abarca la región constante de inmunoglobulina murina esperada. Los oligonucleótidos Not1-MAK1 y MAK2 se obtienen de la región V_K y tienen 182 y 84 pb, respectivamente, aguas abajo del primer par de bases del gen kappa C. Se eligen clones que incluyen V_K completa y el péptido líder.

Para la clonación del gen de V_H , se prepara ADNc de doble hebra utilizando el cebador Not1 MAG1 (5'-CGCGGCCGAGCTGCTCAGAGTGTAGA-3' SEQ ID NO: 42). Se ligan adaptadores reasociados AD1 y AD2 a ambos extremos 5' y 3' del ADNc de doble hebra. Los adaptadores de los extremos 3' se eliminan mediante digestión con NotI. El producto digerido se utiliza como molde en la PCR con el oligonucleótido AD1 y MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGGAAATA-3' SEQ ID NO: 43) como cebadores. Los fragmentos de ADN de 500 a 600 pb de longitud se clonan en pUC19. Los oligonucleótidos NotI-MAG1 y MAG2 se obtienen de la región $C\gamma.7.1$ murina, y tienen 180 y 93 pb, respectivamente, aguas abajo del primer pb del gen $C\gamma.7.1$ murino. Se eligen clones que abarcan la V_H completa y el péptido líder.

2. Construcción de vectores de expresión para IgG de MASP-2 quimérica y Fab. Los genes de V_H y V_K clonados descritos anteriormente se utilizan como moldes en una reacción de PCR para añadir la secuencia consenso de Kozak al extremo 5' final y el donador de corte y empalme al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos. Después se analizan las secuencias para confirmar la ausencia de errores de PCR, los genes V_H y V_K se insertan en casetes de vector de expresión que contienen $C.\gamma 1$ y $C.$ kappa humanos, respectivamente, para proporcionar pSV2neo V_H -hu $C\gamma 1$ y pSV2neoV-hu $C\gamma$. Los ADN plasmídicos purificados en gradiente de CsCl de los vectores de cadena pesada y ligera se utilizan para transfectar células COS mediante electroporación. Después de 48 horas, el sobrenadante de cultivo se somete a ensayo mediante ELISA para confirmar la presencia de aproximadamente 200 ng/ml de IgG quimérica. Las células se cosechan y se prepara el ARN total. El ADNc de la primera hebra se sintetiza a partir del ARN total utilizando oligo dT como cebador. Este ADNc se utiliza como molde en la PCR para generar los fragmentos de ADN Fd y kappa. Para el gen de Fd, se lleva a cabo la PCR utilizando 5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAAC-3' (SEQ ID NO: 44) como cebador 5' y un cebador 3' derivado de CH1 (5'-CGGGATCCTCAAACCTTTCTTGCCACCTTGG-3' SEQ ID NO: 45). Se confirma que la secuencia de ADN contiene V_H completa y el dominio CH1 de IgG1 humana. Después de la digestión con las enzimas adecuadas, los fragmentos de ADN de Fd se insertan en los sitios de restricción HindIII y BamHI del casete del vector de expresión pSV2dhfr-TUS para proporcionar pSV2dhfrFd. El plásmido pSV2 está disponible comercialmente y se compone de segmentos de ADN procedentes de diversas fuentes: el ADN de pBR322 (línea fina) contiene el origen de replicación del ADN de pBR322 (pBR ori) y el gen de resistencia a ampicilina por lactamasa (Amp); el ADN de SV40, representado mediante sombreado más ancho y marcado, contiene el origen de replicación del ADN de SV40 (SV40 ori), el promotor temprano (5' con respecto a los genes dhfr y neo), y señal de poliadenilación (3' con respecto a los genes dhfr y neo). La señal de poliadenilación derivada de SV40-(pA) también se coloca en el extremo 3' del gen de Fd.

Para el gen kappa, la PCR se lleva a cabo utilizando 5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTCACTAGCTCT-3' (SEQ ID NO: 46) como cebador 5' y un cebador 3' derivado de C_K (5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACACTCT-3' SEQ ID NO: 47). Se confirma que la secuencia de ADN contiene las regiones V_K completa y C_K humana. Después de la digestión con las enzimas de restricción adecuadas, los fragmentos de ADN kappa se insertan en los sitios de restricción HindIII y BamHI del casete del vector de expresión pSV2neo-TUS para proporcionar pSV2neoK. La expresión de ambos genes Fd y .kappa es conducida por los elementos potenciadores y promotores derivados de HCMV. Dado que el gen de Fd no incluye el residuo de aminoácido de cisteína implicado en el enlace disulfuro entre cadenas, este Fab quimérico recombinante contiene cadenas ligeras y pesadas no unidas covalentemente. Este Fab quimérico se denomina cFab.

Para obtener Fab recombinante con un enlace disulfuro inter-cadena pesada y ligera, el gen de Fd anterior se puede ampliar para incluir la secuencia codificante de 9 aminoácidos adicionales (EPKSCDKTH SEQ ID NO: 48) de la región bisagra de la IgG1 humana. El segmento de ADN BstEII-BamHI que codifica 30 aminoácidos en el extremo 3' del gen de Fd puede ser reemplazado por los segmentos de ADN que codifican el Fd ampliado, dando como resultado pSV2dhfrFd/9aa.

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

Para generar líneas celulares que secretan IgG anti-MASP-2 quimérica, se transfectan células NSO con ADN plasmídicos purificados de pSV2neo V_H -hu $C.\gamma 1$ y pSV2neoV-hu C kappa mediante electroporación. Las células transfectadas se seleccionan en presencia de 0,7 mg/ml de G418. Las células se cultivan en un matraz de agitación de 250 ml utilizando medio que contiene suero.

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

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

Para generar líneas celulares que secretan Fab anti-MASP-2 quimérico, las células CHO se transfectan con ADN plasmídicos purificados de pSV2dhfrFd (o pSV2dhfrFd/9aa) y pSV2neokappa, mediante electroporación. Las células transfectadas se seleccionan en presencia de G418 y metotrexato. Las líneas celulares seleccionadas se amplifican en concentraciones crecientes de metotrexato. Las células son subclonadas en una sola célula mediante dilución limitante. Las líneas celulares subclonadas en una sola célula de alta producción son cultivadas a continuación en 100 ml de cultivo de agitación utilizando medio libre de suero.

El Fab anti-MASP-2 quimérico se purifica mediante cromatografía de afinidad utilizando un MoAb anti-idiotípico de ratón para el MoAb contra MASP-2. Se puede preparar un MoAb contra MASP-2 anti-idiotípico inmunizando ratones con un MoAb anti-MASP-2 murino conjugado con hemocianina de lapa californiana (KLH) y escrutando la unión de MoAb específica que puede competir con MASP-2 humana. Para la purificación, se cargan 100 ml de sobrenadante de cultivos de agitación de células CHO productoras de cFab o cFab/9aa sobre la columna de afinidad acoplada a un MoAb contra MASP-2 anti-idiotipo. La columna se lava después a fondo con PBS antes de que el Fab unido se eluya con dietilamina 50 mM, pH 11,5. Las sales residuales se eliminan mediante intercambio de tampón como se ha descrito anteriormente. La concentración de proteína del Fab purificado se determina por medio del método BCA (Pierce).

La capacidad de la IgG contra MASP-2 quimérica, cFab y cFab/9aa para inhibir vías del complemento dependientes de MASP-2 se puede determinar mediante el uso de los análisis inhibidores descritos en el EJEMPLO 2.

EJEMPLO 11

Este ejemplo describe un análisis de escisión de C4 *in vitro* utilizado como un escrutinio funcional para identificar agentes inhibidores de MASP-2 capaces de bloquear la activación del complemento dependiente de MASP-2 a través de L-ficolina/P35, H-ficolina, M-ficolina o manano.

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

Reactivos: Se prepara *S. aureus* (DSM20233) fijado en formalina como sigue: las bacterias se cultivan durante la noche a 37°C en un medio de sangre y soja triptico, se lavan tres veces con PBS, después se fijan durante 1 h a temperatura ambiente en PBS/formalina al 0,5%, y se lava otras tres veces con PBS, antes de ser resuspendido en tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM, pH 9,6).

Análisis: Los pocillos de una placa de microtitulación Nunc MaxiSorb (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) se recubren con: 100 µl de *S. aureus* DSM20233 fijado con formalina (DO₅₅₀ = 0,5) en tampón de recubrimiento con 1 µg de L-ficolina en tampón de recubrimiento. Después de la incubación durante 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), a continuación, se lavan con TBS que contiene Tween 20 al 0,05% 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, Triton X-100 al 0,05%, HSA al 0,1%, pH 7,4, que impide la activación de C4 endógena y disocia el complejo de C1 (compuesto de C1q, C1r y C1s). Los agentes inhibidores de MASP-2, incluyendo los MoAb anti-MASP-2 y los péptidos inhibidores se añaden a las muestras de suero a 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, a continuación, se añaden a cada pocillo 0,1 µg de C4 humana purificado (obtenido como describe 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 de nuevo y el depósito de C4b se detecta utilizando anti-C4c humana de pollo conjugado con fosfatasa alcalina (obtenido de Immunsystem, Uppsala, Suecia) y se mide utilizando el sustrato colorimétrico fosfato de p-nitrofenilo.

Análisis de C4 en manano: El análisis descrito anteriormente está adaptado para medir la activación de la vía de las lectinas a través de MBL mediante el recubrimiento de la placa con LSP y manano antes de añadir suero mezclado con diversos agentes inhibidores de MASP-2.

Análisis de C4 en H-ficolina (Hakata Ag): El análisis descrito anteriormente está adaptado para medir la activación de la vía de las lectinas a través de H-ficolina mediante el recubrimiento de la placa con LPS y H-ficolina antes de añadir suero mezclado con diversos agentes inhibidores de MASP-2.

EJEMPLO 12

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

Métodos: Se generaron complejos inmunológicos *in situ* mediante el recubrimiento de placas de microtitulación (Maxisorb, Nunc, Núm. Cat. 442404, Fisher Scientific) con albúmina de suero humano al 0,1% 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 anti-suero completo de oveja (Scottish Antibody Production Unit, Carlisle, Escocia) diluido 1:1000 en TBS/tween/Ca²⁺. Las muestras de suero se obtuvieron a partir de ratones de tipo salvaje y MASP-2^{-/-} y se añadieron a las placas recubiertas. Se prepararon muestras de control en las que se empobreció C1q a partir de las muestras de suero de tipo salvaje y MASP-2^{-/-}. El suero de ratón empobrecido en C1q se preparó utilizando Dynabeads acopladas a proteína-A (DynaL Biotech, Oslo, Noruega) recubiertas con IgG de conejo anti-C1q humano (Dako, Glostrup, Dinamarca), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las placas se incubaron durante 90 minutos a 37°C. La C3b unida se detectó con un Anticuerpo policlonal anti-C3c humana (Dako A 062) diluido en TBS/tw/Ca⁺⁺ a 1:1000. El anticuerpo secundario es IgG de cabra anti-conejo.

Resultados: La FIGURA 9 muestra los niveles relativos de depósito de C3b sobre placas recubiertas con IgG en el suero de tipo salvaje, el suero MASP-2^{-/-}, el suero de tipo salvaje empobrecido en C1q y MASP-2^{-/-} empobrecido en C1q. Estos resultados demuestran que la vía clásica está intacta en la cepa de ratón MASP-2^{-/-}.

EJEMPLO 13

El siguiente análisis se usa para comprobar si un agente inhibidor de MASP-2 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 los complejos inmunológicos.

Métodos: Para someter a ensayo el efecto de un agente inhibidor de MASP-2 en condiciones de activación del complemento donde la vía clásica es iniciada por los complejos inmunológicos, se incuban a 37°C muestras de 50 µl por triplicado que contienen NHS al 90% en presencia de 10 µg/ml de complejo inmunológico (CI) o PBS, y también se incluyen muestras por triplicado paralelas (+/- CI) que contienen anticuerpo monoclonal anti-properidina 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 del complemento y las muestras se enfrían inmediatamente a 5°C. Las muestras se almacenan a -70°C antes de ser analizadas para determinar los productos de activación del complemento (C3a y sC5b-9) utilizando kits ELISA (Quidel, Núm. de Catálogo A015 y A009) siguiendo las instrucciones del fabricante.

EJEMPLO 14

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

Fundamento y Diseño experimental: Los pacientes sometidos a reparación de aneurisma aórtico abdominal (AAA) se someten a una lesión por isquemia-reperfusión, que está en gran parte mediada por la activación del complemento. Los autores de la presente invención han investigado el papel de la vía de las lectinas dependiente de MASP-2 de activación del complemento en la lesión por isquemia-reperfusión en pacientes sometidos a reparación de AAA. El consumo de lectina de unión a manano (MBL) en suero se utilizó para medir la cantidad de activación de la vía de las lectinas dependiente de MASP-2 que se produjo durante la reperfusión.

Aislamiento de la muestra de suero del paciente: En este estudio se incluyeron un total de 23 pacientes sometidos a reparación de AAA infrarrenal electiva y 8 pacientes del grupo control sometidos a cirugía abdominal mayor.

Para los pacientes que se sometieron a reparación de AAA, se tomaron muestras de sangre sistémica de la arteria radial de cada paciente (a través de una línea arterial) en cuatro puntos temporales definidos durante el procedimiento: punto horario 1: inducción de anestesia; punto horario 2: inmediatamente antes del pinzamiento aórtico; punto horario 3: inmediatamente antes de la eliminación del pinzamiento aórtico; y punto horario 4: durante la reperfusión.

Para los pacientes de control sometidos a cirugía abdominal mayor, se tomaron muestras de sangre sistémica en la inducción de la anestesia y dos horas después del inicio del procedimiento.

Análisis para determinar los niveles de MBL: Cada muestra de plasma del paciente se analizó para determinar los niveles de las lectinas de unión a manano (MBL), utilizando técnicas de ELISA.

Resultados: Los resultados de este estudio se muestran en la FIGURA 10, que presenta un gráfico que muestra el cambio porcentual medio de los niveles de MBL (eje y) en cada uno de los diversos puntos temporales (eje x). Los valores iniciales de MBL son 100%, mostrándose a continuación disminuciones relativas. Como se muestra en la FIGURA 10, los pacientes de AAA (n = 23) muestran una disminución significativa de los niveles de MBL en plasma, con un promedio de 41% de disminución aproximada en el momento de la isquemia/reperfusión después de AAA. En contraste, en los pacientes de control (n = 8) sometidos a cirugía abdominal mayor solamente se observó un pequeño consumo de MBL en las muestras de plasma.

Los datos presentados proporcionan una fuerte indicación de que la vía de las lectinas dependiente de MASP-2 del sistema del complemento se activa en la fase de isquemia/reperfusión después de la reparación de AAA. La disminución de los niveles de MBL parece estar asociada con la lesión por isquemia-reperfusión debido a que los niveles de MBL caen significativamente y rápidamente cuando el vaso principal pinzado se reperfunde después del final de la operación. En contraste, los sueros de control de los pacientes sometidos a cirugía abdominal mayor sin un insulto por isquemia-reperfusión importante sólo muestran una ligera disminución de los niveles plasmáticos de MBL. En vista de la contribución bien establecida de la activación del complemento en la lesión por reperfusión, los autores de la presente invención concluyen que la activación de la vía de las lectinas dependiente de MASP-2 en células endoteliales isquémicas es un factor importante en la patología de la lesión por isquemia/reperfusión. Por lo tanto, se esperaría que un bloqueo o reducción transitorios específicos de la vía de las lectinas dependiente de MASP-2 de activación del complemento tuviera un impacto terapéutico beneficioso significativo para mejorar el resultado de los procedimientos clínicos y enfermedades que implican un insulto isquémico transitorio, por ejemplo, infarto de miocardio, infarto intestinal, quemaduras, trasplante e ictus.

EJEMPLO 15

Este ejemplo describe el uso de la cepa MASP-2/- como un modelo animal para someter a ensayo agentes inhibidores de MASP-2 útiles para el tratamiento de la Artritis Reumatoide.

Antecedentes y fundamento: Modelo murino de artritis: El ratón transgénico (tg) para el receptor de células T (TCR) K/BxN, es un modelo desarrollado recientemente 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 autoinmunitaria con la mayoría de las características clínicas, histológicas e inmunológicas de la artritis reumatoide en seres humanos (Ji, H., et al., *Immunity* 16:157-168, 2002). El trastorno murino es específico de las articulaciones, pero es iniciado, a continuación perpetuado por la autorreactividad de las células T, después B a la glucosa-6-fosfato isomerasa ("GPI"), un antígeno expresado de forma ubicua. Adicionalmente, la transferencia de suero (o Ig anti-GPI purificadas) de ratones K/BxN artríticos a animales sanos provoca artritis en el plazo de varios días. También se ha demostrado que los anticuerpos policlonales anti-GPI o un grupo de anticuerpos monoclonales anti-GPI del isotipo IgG1 inducen artritis cuando se inyectan en receptores sanos (Maccioni et al., 2002). El modelo murino es relevante para la AR humana, debido a que también se ha encontrado que el suero de pacientes con AR contiene anticuerpos anti-GPI, que no se encuentra en los individuos normales. También se sometió a ensayo un ratón con deficiencia de C5 en este sistema y se encontró que bloqueaba el desarrollo de la artritis (Ji, H., et al., 2002, *supra*). También hubo una fuerte inhibición de la artritis en ratones nulos para C3, lo que implica la vía alternativa, sin embargo, ratones nulos para MBP-A desarrollaron artritis. En ratones sin embargo, la presencia de MBP-C puede compensar la pérdida de MBP-A.

Basándose en las observaciones descritas en la presente memoria de que MASP-2 juega un papel esencial en el inicio de la vía tanto de las lectinas como alternativa, el modelo de artritis K/BxN es útil para el escrutinio de agentes inhibidores de MASP-2 que son eficaces para su uso como agentes terapéuticos para el tratamiento de la AR.

Métodos: El suero de ratones artríticos K/BxN se obtiene a los 60 días de edad, se reúne y se inyecta (150-200 μ l i.p.) en receptores MASP-2/- (obtenidos como se describe en el EJEMPLO 1); y compañeros de camada de control con o sin agentes inhibidores de MASP-2 (Moab, péptidos inhibidores y similares descritos en la presente memoria) los días 0 y 2. Un grupo de ratones normales también se pretrata con un agente inhibidor de MASP-2 durante dos días antes de recibir la inyección de suero. Un grupo adicional de ratones reciben una inyección de suero el día 0, seguido de un agente inhibidor de MASP-2 el día 6. Se evalúa un índice clínico a lo largo del tiempo anotando un punto para cada pata afectada, anotando $\frac{1}{2}$ punto para una pata con una hinchazón leve. El grosor del tobillo se mide también por medio de un calibre (el grosor se define como la diferencia con respecto a la medición del día 0).

EJEMPLO 16

Este ejemplo describe un análisis para la inhibición de daño tisular mediado por el complemento en un modelo *ex vivo* de corazones de conejo perfundidos con plasma humano.

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

Métodos: Para determinar si los agentes inhibidores anti-MASP-2 aislados tales como los anticuerpos anti-MASP-2 obtenidos como se describe en el EJEMPLO 7 son capaces de inhibir la ruta del complemento en el daño tisular, los MoAb y fragmentos de anticuerpos anti-MASP-2 se pueden someter a ensayo utilizando un modelo *ex vivo* en el que los corazones de conejo aislados se perfunden con plasma humano diluido. Se había demostrado previamente que este modelo causaba daños en el miocardio de conejo debido a la activación de la vía alternativa del complemento (Gralinski, M. R., et al., *Immunopharmacology* 34: 79-88, 1996).

EJEMPLO 17

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

- 5 **Métodos:** Gupta-Bansal, R., et al., en *Molecular Immunol.* 37: 191-201, 2000 han descrito un método para medir la elastasa de neutrófilos. Brevemente, el complejo de elastasa y α_1 -antitripsina del suero se mide con un análisis de tipo sándwich de dos sitios que utiliza anticuerpos tanto contra elastasa como contra α_1 -antitripsina. Se recubren placas de microtitulación de poliestireno con una dilución 1:500 de anticuerpo anti-elastasa humana (The Binding Site, Birmingham, Reino Unido) en PBS durante la noche a 4°C. Después de aspirar la solución de anticuerpo, los pocillos se bloquean con PBS que contiene HAS al 0,4% durante 2 h a temperatura ambiente. Se añaden a los pocillos alícuotas (100 μ l) de las muestras de plasma que se tratan con o sin un agente inhibidor de MASP-2. Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se enjuagan exhaustivamente con PBS. El complejo de elastasa- α_1 -antitripsina unido se detecta por medio de la adición de una dilución 1:500 de anticuerpo contra α_1 -antitripsina conjugado con peroxidasa en solución de bloqueo que se deja incubando durante 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 interrumpe mediante la adición de 100 μ l de ácido fosfórico, y la placa se lee a 450 nm en un lector de microplacas.

EJEMPLO 18

Este ejemplo describe un modelo animal para someter a ensayo agentes inhibidores de MASP-2 útiles para el tratamiento de la isquemia/reperfusión miocárdica.

- 20 **Métodos:** Väkevä et al., en *Circulation* 97:2259-2267, 1998 y Jordan et al., en *Circulation* 104 (12):1413-1418, 2001 han descrito un modelo de isquemia-reperfusión miocárdica. El modelo descrito puede ser modificado para su uso en ratones MASP-2^{-/-} y MASP-2^{+/+} como sigue. Brevemente, se anestesian ratones macho adultos. La vena yugular y la tráquea se canulan y se mantiene ventilación con oxígeno al 100% con un ventilador para roedores ajustado para mantener el CO₂ exhalado entre 3,5% y 5%. Se realiza una toracotomía izquierda y se coloca sutura a 3 - 4 mm del origen de la arteria coronaria izquierda. Cinco minutos antes de la isquemia, a los animales se les administra un agente inhibidor de MASP-2, tal como anticuerpos anti-MASP-2 (p.ej., en un intervalo de dosificación entre 0,01 y 10 mg/kg). La isquemia se iniciada a continuación apretando la sutura alrededor de la arteria coronaria y se mantiene durante 30 minutos, seguido de cuatro horas de reperfusión. Los animales con operación simulada se preparan de forma idéntica sin apretar la sutura.
- 25 **Análisis de depósito de C3 del complemento:** Después de la reperfusión, se obtienen las muestras para inmunohistoquímica de la región central del ventrículo izquierdo, se fijan y se congelan a -80°C hasta su procesamiento. Las secciones de tejido se incuban con un anticuerpo de cabra anti-C3 de rata conjugado con HRP. Las secciones de tejido se analizan para determinar la presencia de tinción de C3 en presencia de agentes inhibidores anti MASP-2 en comparación con los animales de control con operación simulada y los animales MASP-2^{-/-} para identificar los agentes inhibidores de MASP-2 que reducen el depósito de C3 *in vivo*.

EJEMPLO 19

Este ejemplo describe el uso de la cepa MASP-2^{-/-} como un modelo animal para someter a ensayo agentes inhibidores de MASP-2 para determinar la capacidad para proteger el tejido transplantado de la lesión por isquemia/reperfusión.

- 40 **Antecedentes/Fundamento:** Se sabe que la lesión por isquemia/reperfusión se produce en un órgano de un donante durante el trasplante. El grado de daño en el tejido está relacionado con la duración de la isquemia y está mediado por el complemento, como se ha demostrado en varios modelos de isquemia y mediante el uso de agentes inhibidores del complemento tales 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 el trasplante por Pratt et al., en *Am. J. Path.* 163(4):1457-1465, que puede ser modificado para su uso con el modelo de ratón MASP-2^{-/-} y/o para su uso como un sistema modelo de MASP-2^{+/+} en el que escrutar agentes inhibidores de MASP-2 para determinar la capacidad para proteger el tejido transplantado de la lesión por isquemia/reperfusión. El lavado del riñón del donante con el líquido de perfusión antes del trasplante ofrece una oportunidad para introducir agentes inhibidores anti-MASP-2 en el riñón de un donante.
- 45 **Métodos:** Se anestesian ratones MASP-2^{-/-} y/o MASP-2^{+/+}. El riñón izquierdo del donante se disecciona y la aorta se liga cefálica y caudal a la arteria renal. Se inserta un catéter de tubo Portex (Portex Ltd, Hythe, Reino Unido) entre las ligaduras y el riñón se perfunde con 5 ml de Solución de Perfusión de Riñón Soltran (Baxter Health Care, Reino Unido) que contiene agentes inhibidores de MASP-2 tales como anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 (a un intervalo de dosificación de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg) durante un período de al menos 5 minutos. A continuación se realiza el trasplante renal, y se hace un seguimiento de los ratones a lo largo del tiempo.

Análisis de los receptores de trasplantes: Los trasplantes de riñón se cosechan a diferentes intervalos de tiempo y las secciones de tejido se analizan utilizando anti-C3 para determinar la extensión del depósito de C3.

EJEMPLO 20

Este ejemplo describe el uso de un modelo animal de la artritis inducida por colágeno (AIC) para el análisis de agentes inhibidores de MASP-2 útiles para tratar la artritis reumatoide (AR).

5 **Antecedentes y fundamento:** La artritis inducida por colágeno (AIC) representa una poliartritis autoinmunitaria inducible en cepas susceptibles de roedores y primates después de la inmunización con colágeno de tipo II nativo y se reconoce como un modelo relevante para la artritis reumatoide humana (AR) (véase Courtney et al., *Nature* 283:666 (1980); Trentham et al., *J. Exp. Med.* 146:857 (1977)). Tanto la AR como la AIC se caracterizan por la inflamación de las articulaciones, la formación de pannus y la erosión del cartílago y del hueso. La cepa DBA/1LacJ murina susceptible de AIC es un modelo desarrollado de AIC en el que los ratones desarrollan artritis clínicamente
10 grave después de la inmunización con colágeno bovino tipo II (Wang et al., *J. Immunol.* 164:4340-4347 (2000)). Una cepa de ratón con deficiencia de C5 se cruzó con DBA/1LacJ y se encontró que la cepa resultante era resistente al desarrollo de artritis AIC (Wang et al., 2000, *supra*).

Basándose en las observaciones descritas en la presente memoria de que MASP-2 juega un papel esencial en el inicio de las vías tanto de las lectinas como alternativas, el modelo de artritis AIC es útil para la detección de agentes
15 inhibidores de MASP-2 que son eficaces para su uso como agentes terapéuticos para tratar la AR.

Métodos: Se genera un ratón MASP-2^{-/-} como se describe en el EJEMPLO 1. El ratón MASP-2^{-/-} se cruza a continuación con un ratón derivado de la cepa DBA/1LacJ (The Jackson Laboratory). La descendencia F₁ y posterior se entrecruzan para producir MASP-2^{-/-} homocigotos en la línea de DBA/1LacJ.

20 La inmunización con colágeno se lleva a cabo como describen Wang et al., 2000, *supra*. Brevemente, se inmunizan ratones DBA/1LacJ de tipo salvaje y ratones DBA/1LacJ MASP-2^{-/-} con colágeno bovino tipo II (BCII) o colágeno de tipo II de ratón (MCII) (obtenido de Elastin Products, Owensville, MO), disuelto en ácido acético 0,01 M a una concentración de 4 mg/ml. A cada ratón se le inyectan por vía intradérmica en la base de la cola 200 µg de CII y 100 µg de micobacterias. Los ratones se re-inmunizan después de 21 días y se examinan diariamente para determinar la aparición de la artritis. Un índice de artritis se evalúa a lo largo del tiempo con respecto a la gravedad de la artritis en
25 cada pata afectada.

Los agentes inhibidores de MASP-2 se escrutan en los ratones con AIC DBA/1LacJ de tipo salvaje mediante la inyección de un agente inhibidor de MASP-2, tal como anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 (en un intervalo de dosificación de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg) en el momento de la inmunización con colágeno, o bien sistémicamente o bien localmente en una o más articulaciones y se evalúa un índice de artritis a lo largo del tiempo como se describió
30 anteriormente. Los anticuerpos monoclonales anti-hMASP-2 como agentes terapéuticos se pueden evaluar fácilmente en un modelo de ratón con AIC DBA/1LacJ MASP-2^{-/-}, activado para hMASP-^{+/+}.

EJEMPLO 21

Este ejemplo describe el uso de un modelo animal (NZB/W) F₁ para someter a ensayo agentes inhibidores de MASP-2 útiles para tratar la glomerulonefritis mediada por complejos inmunitarios.

35 **Antecedentes y fundamento:** Los ratones New Zealand negro x New Zealand blanco (NZB/W) F₁ desarrollan espontáneamente un síndrome autoinmunitario con similitudes notables con la glomerulonefritis humana mediada por complejos inmunitarios. Los ratones NZB/W F₁ invariablemente sucumben a la glomerulonefritis a los 12 meses de edad. Como se comentó anteriormente, se ha demostrado que la activación del complemento desempeña un papel importante en la patogénesis de la glomerulonefritis mediada por complejos inmunitarios. Se ha demostrado,
40 además, que la administración de un MoAb anti-C5 en el modelo de ratón NZB/W F₁ dio lugar a la mejora significativa del curso de la glomerulonefritis (Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:8563-8568 (1996)). Basándose en las observaciones descritas en la presente memoria de que MASP-2 juega un papel esencial en el inicio de las vías tanto de de las lectinas como alternativa, el modelo animal NZB/W F₁ es útil para la detección de agentes inhibidores de MASP-2 que son eficaces para su uso como agentes terapéuticos para el tratamiento de la glomerulonefritis.
45

Métodos: Se genera un ratón MASP-2^{-/-} como se describe en el EJEMPLO 1. El ratón MASP-2^{-/-} se cruza a continuación por separado con un ratón derivado de las cepas NZB y NZW (The Jackson Laboratory). La descendencia F₁ y posteriores se entrecruzan para producir MASP-2^{-/-} homocigotos en las bases genéticas NZB y NZW. Para determinar el papel de MASP-2 en la patogénesis de la glomerulonefritis en este modelo, se compara el desarrollo de esta enfermedad en individuos F₁ resultantes de los cruces de ratones NZB x NZW de tipo salvaje o
50 ratones NZB MASP-2^{-/-} x NZW MASP-2^{-/-}. A intervalos semanales se recogieron muestras de orina de los ratones MASP-2^{+/+} y MASP-2^{-/-} F₁ y se controlaron los niveles de proteína en la orina para detectar la presencia de anticuerpos anti-ADN (como describen Wang et al., 1996, *supra*). También se lleva a cabo el análisis histopatológico de los riñones para controlar la cantidad de depósito de matriz mesangial y el desarrollo de glomerulonefritis.

55 El modelo animal NZB/W F₁ también es útil para la detección de agentes inhibidores de MASP-2 que son eficaces para su uso como agentes terapéuticos para el tratamiento de la glomerulonefritis. A las 18 semanas de edad, a los ratones NZB/W F₁ de tipo salvaje se les inyectan por vía intraperitoneal agentes inhibidores anti-MASP-2, tales

como anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 (en un intervalo de dosificación de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg) a una frecuencia semanal o quincenal. Los marcadores histopatológicos y bioquímicos antes mencionados de la glomerulonefritis se utilizan 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.

5 EJEMPLO 22

Este ejemplo describe el uso de un bucle de tubo como un modelo para someter a ensayo agentes inhibidores de MASP-2 útiles para prevenir el daño tisular que resulta de la circulación extracorpórea (ECC), tal como un circuito de derivación cardiopulmonar (CPB).

10 **Antecedentes y justificación:** Como se comentó anteriormente, los pacientes sometidos a ECC durante el CPB sufren una reacción inflamatoria generalizada, que es en parte causada tanto por la exposición de la sangre a las superficies artificiales del circuito extracorpóreo, como también por factores independientes de las superficies como el trauma quirúrgico y la lesión por isquemia-reperusión (Butler, J., et al., *Ann. Thorac. Surg.* 55:552-9, 1993; Edmunds, L.H., *Ann. Thorac. Surg.* 66(Suppl): S12-6, 1998; Asimakopoulos, G., *Perfusion* 14:269-77, 1999).
 15 Adicionalmente, se ha demostrado que la vía alternativa del complemento juega un papel predominante en la activación del complemento en los circuitos de CPB, dando como resultado la interacción de la sangre con las superficies artificiales de los circuitos de CPB (véase Kirklín et al., 1983, 1986, comentado *supra*). Por lo tanto, basándose en las observaciones descritas en la presente memoria de que MASP-2 juega un papel esencial en el inicio de las vías tanto de las lectinas como alternativa, el modelo de bucle de tubo es útil para la detección de
 20 agentes inhibidores de MASP-2 que son eficaces para su uso como agentes terapéuticos para prevenir o tratar una reacción inflamatoria desencadenada por la exposición extracorpórea.

Métodos: Se utiliza una modificación de un modelo de bucle de tubo descrito anteriormente para los circuitos de derivación cardiopulmonar (véase Gong et al., *J. Clinical Immunol.* 16(4):222-229 (1996)) como describen Gupta-Bansal et al., *Molecular Immunol.* 37: 191-201 (2000). Brevemente, se recoge sangre recién extraída de un sujeto sano en un tubo Vacutainer de 7 ml (que contiene 7 unidades de heparina por ml de sangre completa). El tubo de polietileno similar al que se utiliza durante los procedimientos de CPB (p.ej., diámetro interno de 2,92 mm; diámetro
 25 externo de 3,73 mm, longitud: 45 cm) se llena con 1 ml de sangre y se cierra en un bucle con una pieza corta de tubo de silicona. En el estudio se incluyó como control de fondo un tubo de control que contenía sangre heparinizada con EDTA 10 mM. La muestra y los tubos de control se rotaron verticalmente en un baño de agua durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación, las muestras de sangre se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1,7 ml que
 30 contenían EDTA, dando como resultado una concentración final de EDTA 20 mM. Las muestras se centrifugaron y se recogió el plasma. Los agentes inhibidores de MASP-2, tales como los anticuerpos anti-MASP-2 se añaden a la sangre heparinizada inmediatamente antes de la rotación. Las muestras de plasma se someten a continuación a análisis para medir la concentración de C3a y C5b-9 soluble como describen Gupta-Bansal et al., 2000, *supra*.

EJEMPLO 23

35 Este ejemplo describe el uso de un sistema modelo de ligadura y punción cecal (CLP) en roedor para someter a ensayo los agentes inhibidores de MASP-2 útiles para el tratamiento de la sepsis o una afección resultante de la sepsis, incluyendo sepsis severa, choque séptico, síndrome de dificultad respiratoria aguda que resulta de la sepsis y síndrome de respuesta inflamatoria generalizada.

40 **Antecedentes y fundamento:** Como se comentó anteriormente, se ha demostrado en numerosos estudios que la activación del complemento tiene un papel importante en la patogénesis de la sepsis (véase Bone, R.C., *Annals. Internal. Med.* 115:457-469, 1991). El modelo de roedor CLP es un modelo reconocido que imita el curso clínico de la sepsis en los seres humanos y se considera que es un modelo sustituto razonable para la sepsis en los seres humanos (véase Ward, P., *Nature Review Immunology* 4:133-142 (2004)). Un estudio reciente ha demostrado que el
 45 tratamiento de los animales CLP con anticuerpos anti-C5a da como resultado bacteriemia reducida y supervivencia mejorada enormemente Huber-Lang et al., *J. of Immunol.* 169:3223-3231 (2002). Por lo tanto, basándose en las observaciones descritas en la presente memoria de que MASP-2 juega un papel esencial en el inicio de las vías de las lectinas y alternativa, el modelo de roedor CLP es útil para la detección de agentes inhibidores de MASP-2 que son eficaces para su uso como agentes terapéuticos para prevenir o tratar la sepsis o una afección que resulta de sepsis.

50 **Métodos:** El modelo CLP es una adaptación del modelo descrito por Huber-Lang et al., 2004, *supra* como sigue. Se anestesian animales MASP-2^{-/-} y MASP-2^{+/+}. Se realiza una incisión en la línea media abdominal de 2 cm y se liga fuertemente el ciego por debajo de la válvula íleo-cecal, evitando la obstrucción del intestino. El ciego se perfora completamente a continuación con una aguja de calibre 21. Después, la incisión abdominal se cierra en capas con sutura de seda y grapas cutáneas (Ethicon, Summerville, NJ). Inmediatamente después de la CLP, los animales
 55 reciben una inyección de un agente inhibidor de MASP-2, tal como anticuerpos anti-MASP-2 monoclonales (en un intervalo de dosificación 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 ratón CLP para MASP-2^{-/-}, activado para hMASP-^{+/+}. El plasma de los ratones se analiza a continuación, para determinar los niveles de anafilotoxinas y estallido respiratorio derivados del complemento utilizando los análisis descritos por Huber-Lang et al., 2004, *supra*.

EJEMPLO 24

Este ejemplo describe la identificación de fragmentos de anticuerpos Fab2 anti-MASP-2 de alta afinidad que bloquean la actividad de MASP-2.

- Antecedentes y fundamento:** MASP-2 es una proteína compleja con muchos dominios funcionales separados, incluyendo: uno o varios sitios de unión para MBL y ficolinas, un sitio catalítico para serina proteasa, un sitio de unión para sustrato proteolítico C2, un sitio de unión para sustrato proteolítico C4, un sitio de escisión MASP-2 para la autoactivación del zimógeno de MASP-2, y dos sitios de unión de Ca^{++} . Se identificaron fragmentos de anticuerpos Fab2 que se unían con alta afinidad a MASP-2, y los fragmentos Fab2 identificados se sometieron a ensayo en un análisis funcional para determinar si eran capaces de bloquear la actividad funcional de MASP-2.
- Para bloquear la actividad funcional de MASP-2, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo Fab2 deben unirse e interferir con un epítipo estructural de MASP-2 que se requiere para la actividad funcional de MASP-2. Por lo tanto, muchos o todos los Fab2 anti-MASP-2 de unión de alta afinidad pueden no inhibir la actividad funcional de MASP-2, a menos que se unan a epítopos estructurales en MASP-2 que están directamente involucrados en la actividad funcional de MASP-2.
- Se utilizó un análisis funcional que mide la inhibición de la formación de convertasa de C3 por la vía de las lectinas para evaluar la "actividad de bloqueo" de los Fab2 anti-MASP-2. Se sabe que el papel fisiológico principal de la MASP-2 en la vía de las lectinas es generar el siguiente componente funcional de la vía del complemento mediada por las lectinas, a saber, la convertasa de C3 de la vía de las lectinas. La convertasa de C3 de la vía de las lectinas es un complejo enzimático crítico (C4bC2a) que escinde proteolíticamente C3 a C3a y C3b. MASP-2 no es un componente estructural de la convertasa de C3 de la vía de las lectinas (C4bC2a); sin embargo, se requiere actividad funcional de MASP-2 con el fin de generar los dos componentes de la proteína (C4b, C2a) que comprenden la convertasa de C3 de la vía de las lectinas. Además, parecen ser necesarias todas las actividades funcionales separadas de MASP-2 en la lista anterior con el fin de que MASP-2 genere la convertasa de C3 de la vía de las lectinas. Por estas razones, se cree que un análisis preferido para su uso en la evaluación de la "actividad de bloqueo" de los Fab2 anti-MASP-2 es un análisis funcional que mide la inhibición de la formación de la convertasa de C3 de la vía de las lectinas.

- Generación de Fab2 de alta afinidad:** Se utilizaron una biblioteca de presentación de fagos de secuencias de anticuerpos de cadena ligera y pesada variable humanas y la tecnología de selección de anticuerpos automatizada para la identificación de Fab2 que reaccionan con ligandos seleccionados de interés para crear Fab2 de alta afinidad contra la proteína MASP-2 de rata (SEQ ID NO: 55). Se utilizó una cantidad conocida de proteína MASP-2 de rata (aproximadamente 1 mg, >85% de pureza) para el escrutinio de anticuerpos. Se utilizaron tres rondas de amplificación para la selección de los anticuerpos con la mejor afinidad. Se eligieron aproximadamente 250 resultados diferentes que expresaban fragmentos de anticuerpos para el escrutinio ELISA. Los resultados de alta afinidad se secuenciaron posteriormente para determinar la singularidad de los diferentes anticuerpos.
- Se purificaron cincuenta anticuerpos anti-MASP-2 únicos y se utilizaron 250 μ g de cada anticuerpo Fab2 purificado para la caracterización de la afinidad de unión a MASP-2 y el ensayo funcional de la vía del complemento, como se describe con más detalle a continuación.

Análisis utilizados para evaluar la actividad inhibidora (bloqueo) de Fab2 anti-MASP-2

1. Análisis para medir la inhibición de la formación de convertasa de C3 por la vía de las lectinas:

- Antecedentes:** La convertasa de C3 de la vía de las lectinas es el complejo enzimático (C4bC2a) que escinde proteolíticamente C3 a los dos fragmentos proinflamatorios potentes, C3a anafilotoxina y C3b opsónico. La formación de la convertasa de C3 parece un paso clave en la vía de las lectinas en términos de mediación de la inflamación. MASP-2 no es un componente estructural de la convertasa de C3 de la vía de las lectinas (C4bC2a); por lo tanto, los anticuerpos (o Fab2) anti-MASP-2 no inhiben directamente la actividad de la convertasa de C3 preexistente. Sin embargo, se requiere la actividad de la serina proteasa MASP-2 con el fin de generar los dos componentes de la proteína (C4b, C2a) que comprenden la convertasa de C3 de la vía de las lectinas. Por lo tanto, los Fab2 anti-MASP-2 que inhiben la actividad funcional de MASP-2 (es decir, el bloqueo por Fab2 anti-MASP-2) inhibirá la formación *de novo* de la convertasa de C3 de la vía de las lectinas. C3 contiene un grupo tioéster inusual y muy reactivo como parte de su estructura. Tras la escisión de C3 por la convertasa de C3 en este análisis, el grupo tioéster en C3b puede formar un enlace covalente con grupos hidroxilo o amino en macromoléculas inmovilizadas sobre el fondo de los pocillos de plástico a través de enlaces éster o amida, lo que facilita la detección de C3b en el análisis ELISA.

- El manano de levadura es un activador conocido de la vía de las lectinas. En el siguiente método para medir la formación de la convertasa de C3, se incubaron pocillos de plástico recubiertos con manano durante 30 min a 37°C con suero de rata diluido para activar la vía de las lectinas. Los pocillos se lavaron y se analizaron a continuación para determinar C3b inmovilizado sobre los pocillos utilizando métodos ELISA convencionales. La cantidad de C3b generada en este análisis es un reflejo directo de la formación *de novo* de la convertasa de C3 de la vía de las lectinas. Los Fab2 anti-MASP-2 a concentraciones seleccionadas se sometieron a ensayo en este análisis para

determinar su capacidad de inhibir la formación de la convertasa de C3 y la consiguiente generación de C3b.

Métodos:

Se incubaron placas Costar Medium Binding de 96 pocillos durante la noche a 5°C con manano diluido en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,5 a 1 µg/50 TI/pocillo. Después de la incubación durante la noche, cada pocillo se lavó tres veces con 200 TI de PBS. Los pocillos se bloquearon a continuación con 100 TI/pocillo de albúmina de suero bovino al 1% en PBS y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave. A continuación, cada pocillo se lavó tres veces con 200 TI de PBS. Las muestras de Fab2 anti-MASP-2 se diluyeron a concentraciones seleccionadas en tampón GVB con Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (barbital 4,0 mM, NaCl 141 mM, MgCl₂ 1,0 mM, CaCl₂ 2,0 mM, gelatina al 0,1%, pH 7,4) a 5 C. Se añadió un suero de rata al 0,5% a las muestras anteriores a 5 C y se transfirieron 100 TI a cada pocillo. Las placas se cubrieron y se incubaron durante 30 minutos en un baño de agua a 37 C para permitir la activación del complemento. La reacción se detuvo mediante la transferencia de las placas de un baño de agua a 37 C a un recipiente que contenía una mezcla de agua con hielo. Cada pocillo se lavó cinco veces con 200 TI de PBS-Tween 20 (Tween 20 al 0,05% en PBS), después se lavó dos veces con 200 TI de PBS. Se añadieron 100 TI/pocillo de una dilución de 1:10000 del anticuerpo primario (anti-C3c humana de conejo, DAKO A0062) en PBS que contenía 2,0 mg/ml de albúmina de suero bovino y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Cada pocillo se lavó con 5 x 200 TI de PBS. Se añadieron 100 TI/pocillo de una dilución 1:10.000 del anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo de cabra conjugado con peroxidasa, American Qualex A102PU) en PBS que contenía 2,0 mg/ml de albúmina de suero bovino y se incubó durante una hora a temperatura ambiente en un agitador con mezclado suave. Cada pocillo se lavó cinco veces con 200 TI de PBS. Se añadieron 100 TI/pocillo de sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. La reacción de la peroxidasa se detuvo añadiendo 100 TI/pocillo de H₃PO₄ 1,0 M y se midió la DO₄₅₀.

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

Antecedentes: La actividad de la serina proteasa de MASP-2 es altamente específica y sólo se han identificado dos sustratos proteicos para MASP-2; C2 y C4. La escisión de C4 genera C4a y C4b. El Fab2 anti-MASP-2 se puede unir a epítomos estructurales en MASP-2 que están directamente involucrados en la escisión de C4 (p.ej., sitio de unión a MASP-2 para C4; sitio catalítico para serina proteasa MASP-2) y por tanto, inhibe la actividad funcional de escisión de C4 de MASP-2.

El manano de levadura es un activador conocido de la vía de las lectinas. En el siguiente método para medir la actividad de escisión de C4 de MASP-2, se incubaron pocillos de plástico recubiertos de manano durante 30 minutos a 37 C con suero de rata diluido para activar la vía de las lectinas. Puesto que el anticuerpo primario utilizado en este análisis ELISA sólo reconoce C4 humana, el suero de rata diluido también se complementó con C4 humana (1,0 Tg/ml). Los pocillos se lavaron y se analizaron para determinar C4b humana inmovilizada sobre los pocillos utilizando métodos de ELISA convencionales. La cantidad de C4b generada en este análisis es una medida de la actividad de escisión de C4 dependiente de MASP-2. Se sometieron a ensayo Fab2 anti-MASP-2 a concentraciones seleccionadas en este análisis para determinar su capacidad para inhibir la escisión de C4.

Métodos: Se incubaron placas Costar Medium Binding de 96 pocillos durante la noche a 5 C con manano diluido en tampón carbonato 50 mM, pH 9,5 a 1,0 Tg/50 TI/pocillo. Cada pocillo se lavó 3 veces con 200 TI de PBS. Los pocillos se bloquearon a continuación con 100 TI/pocillo de albúmina de suero bovino al 1% en PBS y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Cada pocillo se lavó 3 veces con 200 TI de PBS. Las muestras de Fab2 anti-MASP-2 se diluyeron a concentraciones seleccionadas en tampón GVB que contenía Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (barbital 4,0 mM, NaCl 141 mM, MgCl₂ 1,0 mM, CaCl₂ 2,0 mM, gelatina al 0,1%, pH 7,4) a 5 C. También se incluyeron en estas muestras 1,0 Tg/ml de C4 humana (Quidel). Se añadió suero de rata al 0,5% a las muestras anteriores a 5 C y se transfirieron 100 TI a cada pocillo. Las placas se cubrieron y se incubaron durante 30 min en un baño de agua a 37 C para permitir la activación del complemento. La reacción se detuvo mediante la transferencia de las placas del baño de agua a 37 C a un recipiente que contenía una mezcla de agua con hielo. Cada pocillo se lavó con 5 x 200 TI de PBS-Tween 20 (Tween 20 al 0,05% en PBS), a continuación cada pocillo se lavó con 2X 200 TI de PBS. Se añadieron 100 TI/pocillo de una dilución 1:700 de anti-C4c humana de pollo conjugado con biotina (Immunsystem AB, Uppsala, Suecia) en PBS que contenía 2,0 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) y se incubó una hora a temperatura ambiente mezclando suavemente. Cada pocillo se lavó con 5 x 200 TI de PBS. Se añadieron 100 TI/pocillo de 0,1 Tg/ml de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Pierce Chemical Núm. 21126) en PBS que contenía 2,0 mg/ml de BSA y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en un agitador con agitación suave. Cada pocillo se lavó con 5 x 200 TI de PBS. Se añadieron 100 TI/pocillo de sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) y se incubaron a temperatura ambiente durante 16 min. La reacción de la peroxidasa se detuvo añadiendo 100 TI/pocillo de H₃PO₄ 1,0 M y se midió la DO₄₅₀.

3. Análisis de unión de Fab2 anti-MASP-2 de rata a MASP-2 de rata 'nativa'

Antecedentes: La MASP-2 está presente usualmente en el plasma como un complejo dímérico de MASP-2 que también incluye moléculas de lectina específicas (proteína de unión a manosa (MBL) y ficolinas). Por lo tanto, si se está interesado en el estudio de la unión de Fab2 anti-MASP-2 a la forma fisiológicamente relevante de MASP-2, es

importante desarrollar un análisis de unión en el que se utilice la interacción entre el Fab2 y MASP-2 "nativa" en plasma, en lugar de MASP-2 recombinante purificada. En este análisis de unión el complejo MASP-2 "nativa"-MBL a partir de suero de rata al 10% se inmovilizó en primer lugar en pocillos recubiertos con manano. La afinidad de unión de diversos Fab2 anti-MASP-2 a la MASP-2 'nativa' inmovilizada se estudió a continuación utilizando una metodología ELISA convencional.

Métodos: Se incubaron placas Costar High Binding de 96 pocillos durante la noche a 5°C con manano diluido en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,5 a 1 Tg/50 TI/pocillo. Cada pocillo se lavó 3 veces con 200 TI de PBS. Los pocillos se bloquearon con 100 TI/pocillo de leche en polvo sin grasa al 0,5% en PBST (PBS con Tween 20 al 0,05%) y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Cada pocillo se lavó 3 veces con 200 TI de Tampón de Lavado TBS/Tween/Ca⁺⁺ (solución salina tamponada con Tris, Tween 20 al 0,05%, que contenía CaCl₂ 5,0 mM, pH 7,4. Se preparó en hielo suero de rata al 10% en Tampón de Unión con Alta Concentración de Sal (Tris 20 mM, NaCl 1,0 M, CaCl₂ 10 mM, Triton-X100 al 0,05%, albúmina de suero bovino al 0,1% (p/v), pH 7,4). Se añadieron 100 TI/pocillo y se incubaron durante la noche a 5°C. Los pocillos se lavaron 3 veces con 200 TI de Tampón de Lavado TBS/Tween/Ca⁺⁺. A continuación, los pocillos se lavaron 2 veces con 200 TI de PBS. Se añadieron 100 TI/pocillo de Fab2 anti-MASP-2 de concentración seleccionada diluido en Tampón GVB con Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (barbital 4,0 mM, NaCl 141 mM, MgCl₂ 1,0 mM, CaCl₂ 2,0 mM, gelatina al 0,1%, pH 7,4) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Cada pocillo se lavó con 5 x 200 TI de PBS. Se añadieron 100 TI/pocillo de anti-Fab2 de cabra conjugado con HRP (Biogenesis Núm. de Cat. 0500-0099) diluido 1:5000 en albúmina de suero bovino de 2,0 mg/ml en PBS y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Cada pocillo se lavó 5 x 200 TI de PBS. Se añadieron 100 TI/pocillo de sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) y se incubaron a temperatura ambiente durante 70 min. La reacción de la peroxidasa se detuvo añadiendo 100 TI/pocillo de H₃PO₄ 1,0 M y se midió la DO₄₅₀.

RESULTADOS:

Se recogieron aproximadamente 250 Fab2 diferentes que reaccionaron con alta afinidad con la proteína MASP-2 de rata para el escrutinio mediante ELISA. Estos Fab2 de alta afinidad se secuenciaron para determinar la singularidad de los diferentes anticuerpos, y 50 anticuerpos anti-MASP-2 únicos se purificaron para su análisis adicional. Se utilizaron 250 µg de cada anticuerpo Fab2 purificado para la caracterización de la afinidad de unión a MASP-2 y el ensayo funcional de la vía del complemento. Los resultados de este análisis se muestran a continuación en la TABLA 6.

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

Núm. de anticuerpo FAB2	Convertasa de C3 Cl ₅₀ (nM)	K _d	Escisión de C4 Cl ₅₀ (nM)
88	0,32	4,1	ND
41	0,35	0,30	0,81
11	0,46	0,86	<2 nM
86	0,53	1,4	ND
81	0,54	2,0	ND
66	0,92	4,5	ND
57	0,95	3,6	<2 nM
40	1,1	7,2	0,68
58	1,3	2,6	ND
60	1,6	3,1	ND
52	1,6	5,8	<2 nM
63	2,0	6,6	ND

49	2,8	8,5	<2 nM
89	3,0	2,5	ND
71	3,0	10,5	ND
87	6,0	2,5	ND
67	10,0	7,7	ND

5 Como se muestra anteriormente en la TABLA 6, de los 50 Fab2 anti-MASP-2 sometidos a ensayo, diecisiete Fab2 fueron identificados como Fab2 de bloqueo de MASP-2 que inhibían potentemente la formación de la convertasa de C3 con una Cl_{50} igual o inferior a Fab2 10 nm (una tasa de resultado positivo de 34%). Ocho de los diecisiete Fab2 identificados tenían Cl_{50} en el intervalo subnanomolar. Por otra parte, los diecisiete Fab2 de bloqueo de MASP-2 mostrados en la TABLA 6 produjeron una inhibición prácticamente completa de la formación de la convertasa de C3 en el análisis de convertasa de C3 por la vía de las lectinas. La FIGURA 11A ilustra gráficamente los resultados del análisis de formación de la convertasa de C3 para el anticuerpo Fab2 Núm. 11, que es representativo de los otros anticuerpos Fab2 sometidos a ensayo, los resultados se muestran en la TABLA 6. Esta es una consideración importante, ya que teóricamente es posible que un Fab2 de "bloqueo" solamente pueda inhibir la función de MASP-2 fraccionadamente, incluso cuando cada molécula de MASP-2 es unida mediante Fab2.

10 Aunque el manano es un activador conocido de la vía de las lectinas, es teóricamente posible que la presencia de anticuerpos anti-manano en el suero de rata también pueda activar la vía clásica y generar C3b a través de la convertasa de C3 de la vía clásica. Sin embargo, cada uno de los diecisiete Fab2 de bloqueo anti-MASP-2 enumerados en este ejemplo inhibe de forma potente la generación de C3b (>95%), lo que demuestra la especificidad de este análisis para la convertasa de C3 de la vía de las lectinas.

15 También se realizaron análisis de unión con los diecisiete Fab2 de bloqueo con el fin de calcular una K_d aparente para cada uno. Los resultados de los análisis de unión de los Fab2 anti-MASP-2 de rata a MASP-2 de rata nativa para seis de los Fab2 de bloqueo también se muestran en la TABLA 6. La FIGURA 11B ilustra gráficamente los resultados de un análisis de unión con el anticuerpo Fab2 Núm. 11. También se llevaron a cabo análisis de unión similares para los otros Fab2, cuyos resultados se muestran en la TABLA 6. En general, las K_d aparentes obtenidas mediante la unión de cada uno de los seis Fab2 a MASP-2 "nativa" corresponde razonablemente bien con la Cl_{50} para el Fab2 en el análisis funcional de la convertasa de C3. Existe evidencia de que MASP-2 sufre un cambio conformacional de una forma "inactiva" a una "activa" después de la activación de su actividad proteasa (Feinberg et al., *EMBO J* 22:2348-59 (2003); Gal et al., *J. Biol. Chem.* 280: 33435-44 (2005)). En el plasma de rata normal utilizado en el análisis de formación de la convertasa de C3, MASP-2 está presente principalmente en la conformación de zimógeno "inactiva". En cambio, en el análisis de unión, MASP-2 está presente como parte de un complejo con MBL unida a manano inmovilizado; por lo tanto, la MASP-2 estaría en la conformación "activa" (Petersen et al., *J. Immunol Methods* 257:107-16, 2001). En consecuencia, no se esperaría necesariamente una correspondencia exacta entre la Cl_{50} y la K_d para cada uno de los diecisiete Fab2 de bloqueo sometidos a ensayo en estos dos análisis funcionales ya que en cada análisis de la Fab2 se uniría a una forma de MASP-2 conformacional diferente. Sin embargo, con la excepción de Fab2 Núm. 88, parece que hay una correspondencia razonablemente estrecha entre la Cl_{50} y la K_d aparente para cada uno de los otros dieciséis Fab2 sometidos a ensayo en los dos análisis (véase la TABLA 6).

35 Varios de los Fab2 de bloqueo fueron evaluados para determinar la inhibición de la escisión de C4 mediada por MASP-2. La FIGURA 11C ilustra gráficamente los resultados de un análisis de escisión de C4, que muestra la inhibición con Fab2 Núm. 41, con una Cl_{50} = 0,81 nM (véase la TABLA 6). Como se muestra en la FIGURA 12, se encontró que todos los Fab2 sometidos a ensayo inhibían la escisión de C4 con unas Cl_{50} similares a las obtenidas en el análisis de convertasa de C3 (véase la TABLA 6).

40 Aunque el manano es un activador conocido de la vía de las lectinas, es teóricamente posible que la presencia de anticuerpos anti-manano en el suero de rata también pueda activar la vía clásica y de ese modo generar C4b mediante escisión de C4 mediada por C1s. Sin embargo, se han identificado varios Fab2 anti-MASP-2 que inhiben potentemente la generación de C4b (>95%), lo que demuestra la especificidad de este análisis para la escisión de C4 mediada por MASP-2. C4, al igual que C3, contiene un grupo tioéster inusual y muy reactivo como parte de su estructura. Tras la escisión de C4 por MASP-2 en este análisis, el grupo tioéster en C4b puede formar un enlace covalente con grupos hidroxilo o amino en macromoléculas inmovilizadas sobre el fondo de pocillos de plástico a través de enlaces éster o amida, lo que facilita la detección de C4b en el análisis ELISA.

45 Estos estudios demuestran claramente la creación de FAB2 de alta afinidad para la proteína MASP-2 de rata que bloquean funcionalmente la actividad de la convertasa tanto de C4 como de C3, evitando así la activación de la vía

de las lectinas.

EJEMPLO 25

Este EJEMPLO describe el mapeo de epítomos de varios de los anticuerpos Fab2 de bloqueo anti-MASP-2 de rata que se generaron como se describe en el EJEMPLO 24.

5 Métodos:

Como se muestra en la FIGURA 13, las siguientes proteínas, todas con etiquetas de 6X His N-terminales se expresaron en células CHO utilizando el **vector** pED4:

10 MASP-2A de rata, una proteína MASP-2 completa, inactivada mediante la alteración de la serina en el centro activo a alanina (S613A);

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

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

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

15 Estas proteínas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo mediante cromatografía de afinidad con níquel, como se ha descrito anteriormente (Chen et al., *J. Biol. Chem.* 276:25894-02 (2001)).

20 Un polipéptido C-terminal (CCPII-SP), que contenía CCPII y el dominio de serina proteasa de MASP-2 de rata, se expresó en *E. coli* como una proteína de fusión de tiorredoxina utilizando pTrxFus (Invitrogen). La proteína se purificó a partir de productos lisados celulares utilizando resina de afinidad Thiobond. El compañero de fusión de tiorredoxina se expresó a partir de pTrxFus vacío como control negativo.

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

ANÁLISIS DE TRANSFERENCIA PUNTUAL:

25 Las diluciones en serie de los cinco polipéptidos MASP-2 recombinantes descritos anteriormente y mostrados en la FIGURA 13 (y el polipéptido de tiorredoxina como control negativo para el polipéptido de la serina proteasa CCPII) se aplicaron sobre una membrana de nitrocelulosa. La cantidad de proteína aplicada varió de 100 ng a 6,4 pg, a una multiplicidad de cinco. En experimentos posteriores, la cantidad de proteína aplicada varió de 50 ng a 16 pg, de nuevo a una multiplicidad de cinco. Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% en TBS (tampón de bloqueo), a continuación se incubaron con 1,0 µg/ml de Fab2 anti-MASP-2 en tampón de bloqueo (que contenía Ca²⁺ 5,0 mM). Los Fab2 unidos se detectaron utilizando anti-Fab humano conjugado con HRP (ABD/Serotec; diluido 1/10.000) y un kit de detección ECL (Amersham). Una membrana se incubó con anticuerpos policlonales de conejo anti-MASP-2 humana (descrito por Stover et al., *J Immunol* 163:6848-59 (1999)) como control positivo. En este caso, el anticuerpo unido se detectó utilizando anti-IgG de conejo de cabra conjugado con HRP (Dako; diluido 1/2.000).

35 Análisis de unión de MASP-2

40 Las placas de ELISA se recubrieron con 1,0 µg/pocillo de MASP-2A recombinante o polipéptido CUBI-II en tampón de carbonato (pH 9,0) durante la noche a 4°C. Los pocillos se bloquearon con BSA al 1% en TBS, a continuación, se añadieron diluciones seriadas de los Fab2 anti-MASP-2 en TBS que contenía Ca²⁺ 5,0 mM. Las placas se incubaron durante una hora a RT. Después de lavar tres veces con TBS/Tween/Ca²⁺, se añadió anti-Fab humano conjugado con HRP (ABD/Serotec) diluido 1/10.000 en TBS/Ca²⁺ y las placas se incubaron durante una hora más a RT. El anticuerpo unido se detectó utilizando un kit de sustrato de peroxidasa TMB (Biorad).

RESULTADOS:

45 Los resultados del análisis de transferencia puntual que demuestran la reactividad de los Fab2 con diversos polipéptidos MASP-2 se proporcionan a continuación en la TABLA 7. Los valores numéricos proporcionados en la TABLA 7 indican la cantidad de proteína aplicada requerida para proporcionar aproximadamente una intensidad de la señal semimáxima. Como se muestra, todos los polipéptidos (con la excepción del compañero de fusión de tiorredoxina solo) fueron reconocidos por el Ab de control positivo (sueros policlonales anti-MASP-2 humana, generados en conejos).

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

Núm. de Anticuerpo FAB2	MASP-2A	CUBI-II	CUBI/tipo EGF	CCPII-SP	Tiorredoxina
40	0,16 ng	NR	NR	0,8 ng	NR
41	0,16 ng	NR	NR	0,8 ng	NR
11	0,16 ng	NR	NR	0,8 ng	NR
49	0,16 ng	NR	NR	> 20 ng	NR
52	0,16 ng	NR	NR	0,8 ng	NR
57	0,032 ng	NR	NR	NR	NR
58	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
60	0,4 ng	0,4 ng	NR	NR	NR
63	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
66	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
67	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
71	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
81	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
86	0,4 ng	NR	NR	10 ng	NR
87	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
Control positivo	<0,032 ng	0,16 ng	0,16 ng	<0,032 ng	NR

NR = No hay reacción. El anticuerpo de control positivo es suero policlonal anti-MASP-2 humana, generado en conejos.

5 Todos los Fab2 se hacen reaccionar con MASP-2A, así como MASP-2K (datos no mostrados). La mayoría de los Fab2 reconocen el polipéptido CCPII-SP pero no los fragmentos N-terminales. Las dos excepciones son Fab2 Núm. 60 y Fab2 Núm. 57. El Fab2 Núm. 60 reconoce MASP-2A y el fragmento CUBI-II, pero no el polipéptido CUBI/de tipo EGF o el polipéptido CCPII-SP, lo que sugiere que se une a un epítipo en CUBII, o que abarca el dominio CUBII y el dominio de tipo EGF. El Fab2 Núm. 57 reconoce MASP-2A, pero no reconoce ninguno de los fragmentos MASP-2 sometidos a ensayo, indicando tal vez que este FAB2 reconoce un epítipo en CCP1. Los Fab2 Núm. 40 y Núm. 49 se unieron únicamente a MASP-2A completa. En el análisis de unión ELISA que se muestra en la FIGURA 14, el Fab2 Núm. 60 también se unió al polipéptido CUBI-II, aunque con una afinidad aparente ligeramente inferior.

10 Estos hallazgos demuestran la identificación de Fab2 de bloqueo únicos para múltiples regiones de la proteína MASP-2

EJEMPLO 26

Este ejemplo describe el análisis de ratones MASP-2^{-/-} en un modelo de Isquemia/Reperusión Renal Murino.

15 **Antecedentes/Fundamento:** La lesión por Isquemia-Reperusión (I/R) en el riñón a la temperatura corporal tiene relevancia en diversas afecciones clínicas, incluyendo choque hipovolémico, oclusión de la arteria renal y procedimientos de pinzamiento transversal.

La isquemia-reperusión (I/R) del riñón es una causa importante de insuficiencia renal aguda, asociada con una tasa de mortalidad de hasta 50% (Levy et al., *JAMA* 275:1489-94, 1996; Thadhani et al., *N. Engl. J. Med.* 334:1448-60,

1996). La insuficiencia renal post-trasplante es una complicación común y mortal después de un trasplante renal (Nicholson et al., *Kidney Int.* 58:2585-91, 2000). El tratamiento eficaz para la lesión por I/R renal no está actualmente disponible y la hemodiálisis es el único tratamiento disponible. La fisiopatología de la lesión por I/R renal es complicada. Estudios recientes han demostrado que la vía de las lectinas de activación del complemento puede tener un papel importante en la patogénesis de la lesión por I/R renal (deVries et al., *Am. J. Path.* 165: 1677-88, 2004).

Métodos:

Se generó un ratón MASP-2(-/-) como se describe en el EJEMPLO 1 y se sometió a retrocruzamiento durante al menos 10 generaciones con ratones C57BL/6. A seis ratones MASP-2(-/-) y seis de tipo salvaje (+/+) macho que pesaban entre 22 y 25 g se les administró una inyección intraperitoneal de Hypnovel (6,64 mg/kg; Roche products Ltd. Welwyn Garden City, Reino Unido), y posteriormente se anestesiaron mediante inhalación de isoflurano (Abbott Laboratories Ltd., Kent, Reino Unido). Se eligió isoflurano porque es un anestésico por inhalación suave con una mínima toxicidad en el hígado; las concentraciones se producen con precisión y el animal se recupera rápidamente, incluso después de la anestesia prolongada. Se administró Hypnovel, ya que produce un estado de neuroleptanalgesia en el animal y significa que se necesita administrar menos isoflurano. Se colocó una almohadilla caliente debajo de los animales con el fin de mantener una temperatura corporal constante. A continuación, se realizó una incisión abdominal en la línea media y se mantuvo abierta la cavidad corporal utilizando un par de retractores. El tejido conectivo se aclaró por encima y por debajo de la vena renal y la arteria de ambos riñones derecho e izquierdo, y el pedículo renal se pinzó través de la aplicación de pinzas de microaneurisma durante un período de 55 minutos. Este período de isquemia se basó inicialmente en un estudio previo realizado en este laboratorio (Zhou et al., *J. Clin. Invest.* 105:1363-71 (2000)). Además, se eligió un tiempo de isquemia convencional de 55 minutos después de la titulación isquémica y se encontró que 55 minutos produjeron lesión uniforme que también era reversible, con una baja mortalidad, menor de 5%. Después de la oclusión, se colocaron 0,4 ml de solución salina caliente (37°C) en la cavidad abdominal y a continuación se cerró el abdomen durante el periodo de isquemia. Después de la retirada de las pinzas de microaneurisma, se observaron los riñones hasta el cambio de color, una indicación del re-flujo de sangre a los riñones. Se colocaron 0,4 ml adicionales de solución salina caliente en la cavidad abdominal y la apertura se suturó, después lo cual los animales fueron devueltos a sus jaulas. Se tomaron muestras de sangre de la cola 24 horas después de retirar las pinzas, y a las 48 horas se sacrificaron los ratones y se recogió una muestra de sangre adicional.

Evaluación de la lesión renal: La función renal se evaluó 24 y 48 horas después de la reperusión en seis ratones MASP-2 (-/-) y seis WT (+/+) macho. La medición de la creatinina en sangre se determinó mediante espectrometría de masas, que proporciona un índice reproducible de la función renal (sensibilidad <1,0 μ moles/L). La FIGURA 15 ilustra gráficamente el aclaramiento de nitrógeno ureico en sangre de controles C57Bl/6 de tipo salvaje y MASP-2(-/-) 24 horas y 48 horas después de la reperusión. Como se muestra en la FIGURA 15, los ratones MASP-2(-/-) muestran una reducción significativa de la cantidad de urea en sangre a las 24 y 48 horas, en comparación con los ratones de control de tipo salvaje, lo que indica un efecto funcional de protección contra el daño renal en el modelo de lesión por isquemia y reperusión.

En general, se observó un aumento de urea en sangre tanto en los ratones WT (+/+) como MASP-2 (-/-) a las 24 y 48 horas después del procedimiento quirúrgico y el insulto isquémico. Se determinó por separado que los niveles de urea en sangre en un animal de cirugía WT (+/+) no isquémico eran de 5,8 mmoles/L. Además de los datos presentados en la FIGURA 15, un animal MASP-2 (-/-) mostró una protección casi completa del insulto isquémico, con valores de 6,8 y 9,6 mmoles/L a las 24 y 48 horas, respectivamente. Este animal se excluyó del análisis del grupo como un valor atípico potencial, en el que puede no haber estado presente lesión isquémica. Por lo tanto, el análisis final mostrado en la FIGURA 15 incluyó 5 ratones MASP-2 (-/-) y 6 ratones WT (+/+) y se observó una reducción estadísticamente significativa en la urea en sangre a las 24 y 48 horas en los ratones MASP-2 (-/-) (prueba de la t de Student $p < 0,05$). Estos hallazgos indican que se esperaría que la inhibición de la actividad de MASP-2 tuviera un efecto protector o terapéutico del daño renal debido a una lesión isquémica.

EJEMPLO 27

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

Antecedentes/Fundamento:

La lectina de unión a manosa (MBL) es una molécula circulante que inicia la activación del complemento de una manera independiente del complejo inmunitario, en respuesta a una amplia variedad de estructuras carbohidratadas. Estas estructuras pueden ser componentes de agentes infecciosos o radicales carbohidratados endógenos alterados particularmente dentro de células necróticas, oncóticas o apoptóticas. Estas formas de muerte celular se producen en el miocardio reperfundido donde la activación del complemento extiende probablemente la lesión más allá del límite que existe en el momento en que la isquemia es terminada mediante reperusión. Aunque hay pruebas convincentes de que la activación del complemento agrava la reperusión miocárdica, el mecanismo de esta activación no se entiende bien y es probable que la inhibición de todas las vías conocidas tenga efectos adversos

intolerables. Un estudio reciente sugiere que la activación puede implicar la MBL, en lugar de la vía clásica o el bucle de amplificación alternativo (tal como se define en la presente invención), ya que el infarto se redujo en ratones MBL(A/C)-, pero no en C1q-, nulos (Walsh M.C. et al., *Jour of Immunol.* 175:541-546 (2005)). Sin embargo, aunque son alentadores, estos ratones todavía albergan componentes circulantes, tales como Ficolina A, capaces de activar el complemento a través de la vía de las lectinas.

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

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

Se generó un ratón MASP-2 (-/-) como se describe en el EJEMPLO 1 y se sometió a retrocruzamiento durante al menos 10 generaciones con C57BL/6. Siete ratones MASP-2 (-/-) y siete ratones (+/+) de tipo salvaje se anestesiaron con ketamina/medetomidina (100 mg/kg y 0,2 mg/kg respectivamente) y se colocaron en posición supina sobre un lecho de calentamiento controlado por termostato para mantener la temperatura rectal a $37 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$. Los ratones fueron intubados bajo visión directa y ventilados con aire ambiente a una frecuencia respiratoria de 110/min y un volumen corriente de 225 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Ventilador - Hugo Sachs Elektronik MiniVent Tipo 845, Alemania).

El pelo de piel se afeitó y se realizó una incisión en la piel anterolateral de la axila izquierda a la apófisis xifoide. El músculo pectoral mayor se disecó, se cortó en su margen esternal y se trasladó a la fosa axilar. El músculo pectoral menor se cortó en su borde craneal y se movió en sentido caudal. El músculo se utilizó más tarde como un colgajo de músculo que cubría el corazón durante la oclusión de la arteria coronaria. Los músculos del 5º espacio intercostal y la pleura parietal fueron penetrados con pinzas en un punto ligeramente medial al margen del pulmón izquierdo, evitando así el daño del pulmón o el corazón. Después de la penetración de la pleura las pinzas se dirigieron cuidadosamente más allá de la pleura hacia el esternón sin tocar el corazón, y la pleura y los músculos intercostales se disecaron con un cauterizador accionado a batería (Harvard Apparatus, UK). Se ejerció especial cuidado en evitar cualquier sangrado. Utilizando la misma técnica, la toracotomía se extendió a la línea axilar media. Después de cortar la 4ª costilla en su borde esternal el espacio intercostal se amplió hasta que se expuso todo el corazón desde la base hasta el ápice. Con dos pinzas hemostáticas pequeñas se abrió el pericardio y se formó una cuna pericárdica para mover el corazón ligeramente anterior. La arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) se expuso y a continuación se hizo pasar una sutura monofilamento 8-0 con una aguja redonda por debajo de la LAD. El sitio de la ligadura de la LAD se encuentra inmediatamente caudal a la punta de la aurícula izquierda, aproximadamente 1/4 a lo largo de la línea que va desde la cresta atrioventricular al ápice del ventrículo izquierdo.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de una forma ciega, sin estar el investigador al tanto del genotipo de cada animal. Después de la terminación de la instrumentación y los procedimientos quirúrgicos, a los ratones se les permitió un periodo de equilibrado de 15 min. Los ratones se sometieron a 30 min de oclusión de la arteria coronaria con 120 min de tiempo de reperfusión.

Modelo de oclusión y reperfusión de la arteria coronaria

La oclusión de la arteria coronaria se logró utilizando el sistema de peso colgante como se ha descrito anteriormente (Eckle et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H2533-H2540, 2006). Ambos extremos de la ligadura monofilamento se pasaron a través de una pieza de 2 mm de largo de un tubo de polietileno PE-10 y se unieron a una longitud de sutura 5-0 utilizando pegamento de cianoacrilato. A continuación, la sutura se dirigió sobre dos varillas de metal móviles montadas horizontalmente, y se fijaron masas de 1 g cada una a los dos extremos de la sutura. Mediante la elevación de las varillas, las masas se suspendieron y la sutura se colocó bajo tensión controlada para ocluir la LAD con una presión definida y constante. La oclusión de la LAD fue verificada por la palidez de la zona de riesgo, indicando el cambio de color de la zona de perfusión de LAD de rojo brillante a violeta el cese del flujo sanguíneo. La reperfusión se logró mediante la bajada de las varillas hasta que las masas se colocaban en la plataforma de funcionamiento y se aliviaba la tensión de la ligadura. La reperfusión fue verificada por los mismos tres criterios que se utilizaron para verificar la oclusión. Los ratones fueron excluidos del análisis adicional si no se cumplían los tres criterios al inicio de la oclusión de la arteria coronaria o a los 15 min de la reperfusión, respectivamente. Durante la oclusión de la arteria coronaria, la temperatura y la humedad de la superficie del corazón se mantuvieron cubriendo el corazón con el colgajo de músculo pectoral menor y sellando la toracotomía con una gasa humedecida con solución salina al 0,9%.

Medición del tamaño del infarto de miocardio:

El tamaño del infarto (INF) y el área en riesgo (AAR) se determinaron mediante planimetría. Después de la inyección i.v. de 500 U.I. de heparina la LAD fue re-ocluida y se inyectaron lentamente 300 μl de Azul de Evans (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido) al 5% (p/v) en la vena yugular para delinear el área en riesgo (AAR). Esto hace que tinte entre en la región no isquémica del ventrículo izquierdo y salga de la AAR isquémica sin teñir. Después de haber sacrificado los ratones mediante dislocación cervical, el corazón se retiró rápidamente. El corazón se enfrió en

hielo y se montó en un bloque de agarosa al 5% y a continuación se cortó en 8 secciones transversales de 800 µm de espesor. Todos los cortes se incubaron a 37°C durante 20 min con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (Sigma Aldrich, Poole, Reino Unido) al 3% disuelto en tampón de Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0,1 M ajustado a pH 7,4. Los cortes se fijaron durante la noche en formaldehído al 10%. Las secciones se colocaron entre dos cubres y se obtuvieron imágenes digitales de los lados de cada sección utilizando un escáner óptico de alta resolución. Las imágenes digitales se analizaron mediante el soporte lógico SigmaScan (SPSS, Estados Unidos). El tamaño del área infartada (pálido), el área del ventrículo izquierdo (VI) en situación de riesgo (rojo) y la zona del VI perfundida normalmente (azul) se trazaron en cada sección mediante la identificación de su apariencia de color y sus fronteras de color. Las áreas se cuantificaron en ambos lados de cada sección y se promediaron por un investigador. El tamaño del infarto se calculó como un % de la zona de riesgo para cada animal.

RESULTADOS: El tamaño del área infartada (pálido), área del VI en riesgo (rojo) y la zona del VI perfundida normalmente (azul) se describen en cada sección mediante la identificación de su apariencia de color y sus fronteras de color. Las áreas se cuantificaron en ambos lados de cada sección y se promediaron por un investigador. El tamaño del infarto se calculó como % de la zona de riesgo para cada animal. La FIGURA 16A muestra la evaluación de siete ratones (+/+) WT y siete ratones MASP-2 (-/-) para la determinación de su tamaño de infarto después de someterse a la técnica de oclusión y reperusión de la arteria coronaria descrita anteriormente. Como se muestra en la FIGURA 16A, los ratones MASP-2 (-/-) muestran una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el tamaño del infarto en comparación con los ratones (+/+) de tipo salvaje, lo que indica un efecto protector del miocardio de los daños en el modelo de lesión por isquemia y reperusión. La FIGURA 16B muestra la distribución de los animales individuales sometidos a ensayo, lo que indica un claro efecto de protección para los ratones MASP-2 (-/-).

EJEMPLO 28

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

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

Hace más de veinticinco años, Ryan describió un modelo de lesión inducida por láser de NVC en animales (Ryan, S. J., *Tr. Am. Opth. Soc. LXXVII:707-745, 1979*). El modelo se desarrolló inicialmente utilizando monos rhesus, sin embargo, la misma tecnología ha sido utilizada desde entonces para desarrollar modelos similares de NVC en una variedad de animales de investigación, incluyendo el ratón (Tobe et al., *Am. J. Pathol.* 153:1641-46, 1998). En este modelo, la fotocoagulación con láser se utiliza para romper la membrana de Bruch, un acto que se traduce en la formación de membranas de tipo NVC. El modelo inducido por láser captura muchas de las características importantes de la afección humana (para una revisión reciente, véase Ambati et al., *Survey Ophthalmology* 48:257-293, 2003). El modelo de ratón inducido por láser está ahora bien establecido, y se utiliza como una base experimental en un gran número, y cada vez mayor, de proyectos de investigación. En general se acepta que el modelo inducido por láser comparte suficiente similitud biológica con la NVC en seres humanos como para que los estudios preclínicos de la patogénesis y la inhibición con fármacos utilizando este modelo sean relevantes para la NVC en los seres humanos.

Métodos:

Se generó un ratón MASP-2/- como se describe en el EJEMPLO 1 y se sometió a retrocruzamiento durante 10 generaciones con C57BL/6. El actual estudio comparó los resultados cuando se evaluaron ratones MASP-2 (-/-) y MASP-2 (+/+) macho en el curso de la NVC inducida por láser, centrándose un modelo acelerado de DMRE neovascular en el volumen de NVC inducida por láser mediante microscopía confocal láser de barrido como una medida de la lesión tisular y la determinación de los niveles de VEGF, un potente factor angiogénico implicado en la NVC, en el epitelio pigmentario de la retina (RPE)/coroides mediante ELISA después de la lesión con láser.

Inducción de neovascularización coroidea (NVC): Se realizó la fotocoagulación con láser (532 nm, 200 mW, 100 ms, 75 µm; Oculight GL, Iridex, Mountain View, CA) en ambos ojos de cada animal el día cero por medio de un solo individuo enmascarado a la asignación de grupos de fármacos. Se aplicaron puntos de láser de una manera normalizada alrededor del nervio óptico, utilizando un sistema de suministro de lámpara de hendidura y un

ubreobjetos como lente de contacto. El criterio de valoración morfológico de la lesión con láser fue la aparición de una burbuja de cavitación, un signo que se piensa que se correlaciona con la alteración de la membrana de Bruch. Los métodos y criterios de valoración detallados que se evaluaron son los siguientes.

5 **Angiografía con fluoresceína:** La angiografía con fluoresceína se realizó con un sistema de cámara y proyección de imagen (cámara TRC 50 1A; sistema ImageNet 2.01; Topcon, Paramus, NJ) 1 semana después de la fotocoagulación con láser. Las fotografías fueron capturadas con una lente 20-D en contacto con la lente de la cámara de fundus después de la inyección intraperitoneal de 0,1 ml de fluoresceína de sodio al 2,5%. Un experto en la retina que no participó en la fotocoagulación con láser o la angiografía evaluó los angiogramas con fluoresceína en una única sesión en forma enmascarada.

10 **Volumen de la neovascularización coroidea (NVC):** Una semana después de la lesión por láser, los ojos se enuclearon y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min a 4°C. Las copas oculares se obtuvieron mediante la eliminación de los segmentos anteriores y se lavaron tres veces en PBS, seguido de deshidratación y rehidratación a través de una serie de metanol. Después de bloquear dos veces con tampón (PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1% y Triton X-100 al 0,5%) durante 30 minutos a temperatura ambiente, las copas
15 oculares se incubaron durante la noche a 4°C con FITC-isolectina B4 al 0,5% (Vector Laboratories, Burlingame, CA), se diluyeron con PBS que contenía BSA al 0,2% y Triton X-100 al 0,1%, que une residuos de β -D-galactosa terminales en la superficie de las células endoteliales y marca selectivamente la vasculatura murina. Después de dos lavados con PBS que contenía Triton X-100 al 0,1%, la retina neurosensorial se retiró suavemente y se separó del
20 nervio óptico. Se realizaron cuatro incisiones radiales relajantes, y el complejo de RPE-coroideas-esclerótica restante se montó en una preparación plana en medio Antifade (Immu-Mount Vectashield Mounting Medium; Vector Laboratories) y se cubrió con un cubreobjetos.

Las preparaciones planas se examinaron con un microscopio confocal láser de barrido (TCS SP; Leica, Heidelberg, Alemania). Los vasos se visualizaron mediante excitación de longitud de onda de argón azul (488 nm) y captura de
25 emisiones entre 515 y 545 nm. Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite 40X para todos los estudios de obtención de imágenes. Se obtuvieron secciones ópticas horizontales (paso de 1 μ m) de la superficie del complejo de RPE-coroideas-esclerótica. Se consideró el plano focal más profundo en el que se pudo identificar la red vascular coroidea circundante que se conectaba a la lesión para que fuera el suelo de la lesión. Cualquier vaso en la zona localizada con láser y superficial a este plano de referencia se consideró como NVC. Las imágenes de cada sección se almacenaron digitalmente. El área de la fluorescencia relacionada con la NVC se midió mediante análisis de
30 imágenes por ordenador con el soporte lógico para el microscopio (TCS SP; Leica). La suma del área fluorescente completa en cada sección horizontal se usó como un índice para el volumen de NVC. La obtención de imágenes la realizó un operador enmascarado para la asignación del grupo de tratamiento.

Debido a que la probabilidad de que cada lesión con láser que desarrolla NVC está influenciada por el grupo al que pertenece (ratón, ojos y punto láser), se compararon los volúmenes medios de las lesiones mediante un modelo
35 mixto lineal con un diseño de medidas repetidas de parcela dividida. El factor de parcela completa era el grupo genético al que pertenece el animal, mientras que el factor de parcela dividida era el ojo. La significación estadística se determina al nivel de 0,05. Se construyeron comparaciones *post hoc* de medios con un ajuste de Bonferroni para comparaciones múltiples.

40 **ELISA PARA VEGF.** Tres días después de la lesión por 12 puntos de láser, el complejo de RPE-coroideas se sometió a ultrasonidos en tampón de lisis (imidazol HCl 20 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 10 mM, Triton X-100 al 1%, NaF 10 mM, molibdato de Na 1 mM, y EDTA 1 mM con inhibidores de la proteasa) en hielo durante 15 min. Los niveles de proteína VEGF en el sobrenadante se determinaron mediante un kit de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) que reconoce todas las variantes de corte y empalme, a 450 - 570 nm (Emax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA), y se normalizaron a la proteína total. Las mediciones por duplicado en una forma enmascarada las
45 realizó un operador que no participó en la fotocoagulación, la obtención de imágenes, o la angiografía. Los números de VEGF se representaron como la media +/- ETM de al menos tres experimentos independientes y se compararon utilizando la Prueba U de Mann-Whitney. La hipótesis nula fue rechazada a P < 0,05.

RESULTADOS:

Evaluación de los niveles de VEGF:

50 La FIGURA 17A ilustra gráficamente los niveles de proteína VEGF en complejo de RPE-coroideas aislado de ratones de tipo salvaje C57Bl6 y MASP-2(-/-) el día cero. Como se muestra en la FIGURA 17A, la evaluación de los niveles de VEGF indica una disminución en los niveles de referencia para VEGF en los ratones MASP-2 (-/-) frente a los ratones de control de tipo salvaje C57bl. La FIGURA 17B ilustra gráficamente los niveles de proteína VEGF medidos el día tres después de la lesión inducida por láser. Como se muestra en la FIGURA 17B los niveles de VEGF se
55 incrementaron significativamente en los ratones (+/+) de tipo salvaje tres días después de la lesión inducida por láser, de acuerdo con los estudios publicados (Nozaki et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:2328-33 (2006)). Sin embargo, se observaron niveles sorprendentemente muy bajos de VEGF en los ratones MASP-2 (-/-).

Evaluación de la neovascularización coroidea (NVC):

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

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

10 EJEMPLO 29

Este ejemplo describe los resultados de MASP-2 (-/-) en un Modelo de Artritis Reumatoide Inducido por Anticuerpo Monoclonal Murino

Antecedentes/Fundamento: El modelo animal más comúnmente utilizado para la artritis reumatoide (AR) es la artritis inducida por colágeno (AIC) (para una revisión reciente, véase Linton y Morgan, *Mol. Immunol.* 36:905-14, 1999). El colágeno tipo II (CII) es uno de los principales constituyentes de la proteínas de la matriz articular y la inmunización con CII nativo en coadyuvante induce poliartritis autoinmunitaria por una respuesta autoinmunitaria que presenta reacción cruzada con CII en el cartilago articular. Como en la AR, la susceptibilidad a la AIC está vinculada a la expresión de ciertos alelos del MHC de clase II. Algunas cepas de ratones, incluyendo la cepa C57Bl/6, son resistentes a la AIC clásica porque carecen de un haplotipo de MHC adecuado y por lo tanto no generan altos títulos de anticuerpos anti-CII. Sin embargo, se ha encontrado que se puede inducir artritis consistente en todas las cepas de ratones por la administración *i.v.* o *i.p.* a ratones de un cóctel de cuatro anticuerpos monoclonales específicos contra el colágeno de tipo II. Estos anticuerpos monoclonales artritogénicos están disponibles comercialmente (Chondrex, Inc., Redmond, WA). Este modelo de transferencia pasiva de AIC ha sido utilizado con éxito en una serie de informes recientes publicados utilizando la cepa de ratón C57Bl/6 (Kagari et al., *J. Immunol.* 169:1459-66, 2002; Kato et al., *J. Rheumatol.* 30:247-55, 2003; Banda et al., *J. Immunol.* 177:1904-12, 2006). El siguiente estudio comparó la sensibilidad de ratones (+/+) de tipo salvaje (WT) y MASP-2 (-/-), ambos compartiendo la base genética de C57Bl/6, al desarrollo de artritis utilizando el modelo de transferencia pasiva de AIC.

Métodos:

Animales: Se generó un ratón MASP-2 (-/-) como se describe en el EJEMPLO 1 y se sometió a retrocruzamiento durante 10 generaciones con C57Bl/6. Se utilizaron catorce ratones de tipo salvaje C57Bl/6 macho y hembra que tenían de siete a ocho semanas de edad en el momento de la inyección del anticuerpo y diez ratones C57Bl/6 macho y hembra MASP-2 (-/-) y (+/+) de tipo salvaje que tenían de siete a ocho semanas de edad en el momento de la inyección del anticuerpo en este estudio. A veinte ratones se les inyectó un cóctel de anticuerpos monoclonales para obtener 20 respondedores sólidos (dos grupos de diez). Los animales (diez/grupo) se alojaron con cinco animales/jaula, y se aclimataron durante cinco a siete días antes de iniciar el estudio.

A los ratones se les inyectó por vía intravenosa un cóctel de anticuerpos monoclonales (Chondrex, Redmond WA) (5 mg) el día 0 y día 1. El agente de ensayo era un anticuerpo monoclonal + LPS de Chondrex. El día 2, a los ratones se les administraron dosis *ip* de LPS. Los ratones se pesaron los días 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y antes de la terminación el día 14. El día 14 los ratones se anestesiaron con isoflurano y se desangraron terminalmente para obtener el suero. Después de la recolección de la sangre, los ratones se sacrificaron, con separación de las extremidades anteriores y posteriores con las rodillas, que se colocaron en formalina para el procesamiento futuro.

Grupos de tratamiento:

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

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

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

Las puntuaciones clínicas de artritis fueron evaluadas diariamente utilizando el siguiente sistema de puntuación: 0 = normal; 1 = 1 articulación de la pata posterior o anterior afectada; 2 = 2 articulaciones de la patas posteriores o anteriores afectadas; 3 = 3 articulaciones de la patas posteriores o anteriores afectadas; 4 = moderada (eritema e hinchazón moderada o articulaciones de 4 dedos afectadas); 5 = grave (eritema difuso e inflamación severa de toda la pata, incapaz de flexionar los dedos)

Resultados:

La FIGURA 19 muestra los datos de los grupos representados por la puntuación de artritis clínica diaria media durante un máximo de dos semanas. No se observó puntuación clínica de artritis en el grupo control que no recibió el tratamiento con MoAb Col2. Los ratones MASP (-/-) tenían una puntuación clínica de artritis menor del día 9 al día

14. La puntuación de artritis clínica global con análisis del área bajo la curva (AUC) indicó una reducción de 21% en el grupo MASP-2 (-/-) frente a los ratones WT (+/+). Sin embargo, la dotación del ratón C57Bl6 como se comentó anteriormente no proporciona una puntuación clínica de artritis global robusta. Debido a la pequeña tasa de incidencia y al tamaño del grupo, a pesar de la tendencia positiva, los datos proporcionaron sólo tendencias ($p = 0,1$) y no fue estadísticamente significativa al nivel de $p < 0,05$. Serían necesarios animales adicionales en los grupos de tratamiento para demostrar la significación estadística. Debido a la reducción de la incidencia de la artritis, se evaluaron las puntuaciones de la pata afectada para determinar la gravedad. No se observó ni una sola incidencia de una puntuación de artritis clínica mayor de 3 en ninguno de los ratones MASP-2 (-/-), que se observó en 30% de los ratones WT (+/+), lo que sugiere, adicionalmente, que (1) la gravedad de la artritis puede estar relacionada con la activación de la vía del complemento y (2) que el bloqueo de MASP-2 puede tener un efecto beneficioso en la artritis.

EJEMPLO 30

Este ejemplo demuestra que la Proteína Asociada a Lectina de Unión a Manosa Pequeña (Map19 o sMAP) es un inhibidor de la activación del complemento dependiente de MASP-2.

Antecedentes/Fundamento:

Resumen:

La lectina de unión a manosa (MBL) y las ficolinas son proteínas de reconocimiento de patrones que actúan en la inmunidad innata y desencadenan la activación de la vía del complemento de las lectinas a través de serina proteasas asociadas a MBL (MASP). Tras la activación de la vía de las lectinas, MASP-2 escinde C4 y C2. La proteína asociada a MBL pequeña (sMAP), una forma truncada de MASP-2, también está asociada a los complejos de MBL/ficolina-MASP. Para aclarar el papel de sMAP, los autores de la presente invención han generado ratones con deficiencia de sMAP (*sMAP*^{-/-}) por alteración dirigida del exón específico de sMAP. Debido a la interrupción del gen, el nivel de expresión de MASP-2 también disminuyó en los ratones *sMAP*^{-/-}. Cuando sMAP recombinante (rsMAP) y MASP-2 recombinante (rMASP-2) reconstituyeron el complejo de MBL-MASP-sMAP en el suero deficiente, la unión de estos recombinantes a MBL era competitiva, y la actividad de escisión de C4 del complejo MBL-MASP-sMAP se restauró mediante la adición de rMASP-2, mientras que la adición de rsMAP atenuó la actividad. Por lo tanto, MASP-2 es esencial para la activación de C4 y sMAP desempeña un papel regulador en la activación de la vía de las lectinas.

Introducción:

El sistema del complemento media una reacción en cadena de proteólisis y montaje de complejos de proteínas, que juega un papel importante en la defensa biológica como parte de los sistemas inmunitarios tanto innatos como adaptativos. El sistema del complemento de mamíferos consta de tres vías de activación, la vía clásica, la vía alternativa y la vía de las lectinas (Fujita, *Nat. Rev. Immunol.* 2: 346-353 (2002); Walport, *N Engl J Med* 344: 1058-1066 (2001)). La vía de las lectinas proporciona la primera línea de defensa contra los patógenos invasores. Los componentes de reconocimiento de patógenos de esta vía, la lectina de unión a manosa (MBL) y las ficolinas, se unen a matrices de carbohidratos en las superficies de las bacterias, virus y parásitos y activan las proteasas séricas asociadas a MBL (MASP) para activar una cascada de reacciones aguas abajo. La importancia de la vía de las lectinas para la defensa inmunitaria innata está subrayada por una serie de estudios clínicos que enlazan una deficiencia de MBL con una mayor susceptibilidad a una variedad de enfermedades infecciosas, en particular en la primera infancia antes de que se establezca el sistema inmunitario adaptativo (Jack et al., *Immunol Rev.* 180: 86-99 (2001); Neth et al. *Infect Immun* 68: 688-693 (2000); Summerfield et al., *Lancet* 345: 886-889 (1995); Super et al., *Lancet* 2: 1236-1239 (1989)). Sin embargo, la vía de las lectinas también contribuye a la activación no deseada del complemento, que está implicado en la inflamación y el daño tisular en diversos estados patológicos, incluyendo la lesión por isquemia/perfusión en el corazón y los riñones (De Vries et al., *Am J Pathol* 165: 1677-1688 (2004); Fiane et al., *Circulation* 108: 849-856 (2003); Jordan et al., *Circulation* 104: 1413-1418 (2001); Walsh et al., *J Immunol* 175: 541-546 (2005)).

Como se mencionó anteriormente, la vía de las lectinas implica el reconocimiento de carbohidratos por MBL y ficolinas (Fujita et al., *Immunol Rev* 198: 185-202 (2004); Holmskov et al., *Annu Rev Immunol* 21: 547-578 (2003); Matsushita y Fujita, *Immunobiology* 205: 490-497 (2002) y estas lectinas forman complejos con MASP-1 (Matsushita y Fujita, *J Exp Med* 176: 1497-1502 (1992); Sato et al., *Int Immunol* 6: 665-669 (1994); Takada et al., *Biochem Biophys Res Commun* 196: 1003-1009 (1993), MASP-2 (Thiel et al., *Nature* 386: 506-510 (1997), MASP-3 (Dahl et al., *Immunity* 15: 127-135 (2001), y una proteína truncada de MASP-2 (proteína asociada a MBL pequeña; sMAP o MAp19) (Stover et al., *J Immunol* 162: 3481-3490 (1999); Takahashi et al., *Int Immunol* 11: 8590863 (1999). Los miembros de la familia de MASP consisten en seis dominios; dos dominios C1r/C1s/Uegf/proteína morfogenética ósea (CUB), un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF), dos dominios de proteínas de control del complemento (CCP) o de repeticiones consenso cortas (SCR) y, un dominio serina proteasa (Matsushita et al., *Curr Opin Immunol* 10: 29-35 (1998). MASP-2 y sMAP son generadas por corte y empalme alternativo de un único gen estructural, y sMAP consiste en el primer dominio CUB (CUB1), el dominio de tipo EGF y 4 aminoácidos extra en el extremo C-terminal codificado por un exón específico de sMAP. MASP-1 y MASP-3 también se generan a partir de un único gen mediante corte y empalme alternativo (Schwaeble et al., *Immunobiology* 205: 455-466 (2002). Cuando

la MBL y las ficolinas se unen a carbohidratos en la superficie de los microbios, la forma de proenzima de MASP se escinde entre el segundo CCP y el dominio proteasa, lo que da como resultado la forma activa que consiste en dos polipéptidos, denominados cadenas pesada (H) - y ligera (L), adquiriendo así actividades proteolíticas contra los componentes del complemento. La evidencia acumulada muestra que MASP-2 escinde C4 y C2 (Matsushita et al., *J. Immunol* 165: 2637-2642 (2000)), lo que conduce a la formación de la convertasa de C3 (C4bC2a). Los autores de la presente invención han propuesto que MASP-1 escinde C3 directamente y, posteriormente activa el bucle de amplificación (Matsushita y Fujita, *Immunobiology* 194: 443-448 (1995)), pero esta función es controvertida (Ambrus et al., *J. Immunol* 170: 1374-1382 (2003)). Aunque MASP-3 también contiene un dominio de serina proteasa en la cadena L y exhibe su actividad proteolítica contra un sustrato sintético (Zundel et al., *J Immunol* 172: 4342-4350 (2004)), no se han identificado sus sustratos fisiológicos. La función de sMAP que carece del dominio serina proteasa sigue siendo desconocido.

En el presente estudio, para aclarar el papel de sMAP en la activación de la vía del complemento por las lectinas, los autores de la presente invención interrumpieron el exón específico de sMAP que codifica 4 residuos de aminoácidos (EQSL) en el extremo C-terminal de sMAP y generaron ratones *sMAP*^{-/-}. Los autores de la presente invención presentan aquí por primera vez la capacidad de sMAP para regular a la baja la activación de la vía de las lectinas.

Materiales y métodos

Ratones

Se construyó un vector de direccionamiento que contiene el exón 1-4 y parte del exón 6 del gen *MASP-2* de ratón 129/Sv y un casete del gen de resistencia a neomicina en lugar del exón 5 (Figura 20A). Se insertó un gen *DT-A* en el extremo 3' del vector y se insertaron tres sitios *lox p* para llevar a cabo el direccionamiento condicional para eliminar el casete de neomicina y la región promotora en el futuro. El vector de direccionamiento se sometió a electroporación en células ES 129/Sv. Los clones ES direccionados se microinyectaron en blastocistos C57BL/6J que fueron implantados en úteros de madres adoptivas CIR. Se aparearon ratones quiméricos macho con ratones C57BL/6J hembra para producir ratones heterocigotos (+/-). Los ratones heterocigotos (+/-) se escrutaron mediante análisis de transferencia Southern del ADN de la cola digerido con *BamH* I utilizando la sonda indicada en la Figura 20A. El análisis de transferencia Southern mostró bandas de 6,5 kpb y 11 kpb en el ADN de ratones heterocigotos (+/-) (FIGURA 20B). Los ratones heterocigotos (+/-) se retrocruzaron con ratones C57BL/6J. Para obtener ratones homocigotos (-/-) se entrecruzaron ratones heterocigotos (+/-). Los ratones homocigotos (-/-) (dotación C57BL/6J) se identificaron mediante genotipificación basándose en PCR del ADN de la cola. El análisis PCR se realizó utilizando una mezcla de cebadores efectores específicos del exón 4 y específicos del gen *neo* y un cebador antisentido específico del exón 6. El ADN de ratones homocigotos (-/-) produjo una única banda de 1,8 kpb (FIGURA 20C). En todos los experimentos, se utilizaron ratones de 8 a 12 semanas de edad de acuerdo con las directrices para la experimentación animal de la Universidad Médica de Fukushima.

Análisis de transferencia Northern

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

RT-PCR cuantitativa

Se realizó la PCR en tiempo real con el sistema LightCycler (Roche Diagnostics). Se utilizaron ADNc sintetizados a partir de 60 ng de ARN poli (A)⁺ de hígados de ratones de tipo salvaje (+/+) y homocigotos (-/-) como moldes para la PCR en tiempo real y se amplificaron y se verificaron los fragmentos de ADNc de las cadenas H y L de MASP-2 y sMAP.

Inmunotransferencia

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

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

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

Análisis del depósito de C4

Se diluyó suero de ratón con tampón de TBS-Ca²⁺/BSA hasta 100 µl. Se añadió la muestra diluida a pocillos de microtitulación recubiertos con manano y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Los pocillos se lavaron con tampón de lavado enfriado (tampón de TBS-Ca²⁺ que contenía 0,05% (v/v) de Tween 20). Después del lavado, se añadió a cada pocillo C4 humana y se incubó en hielo durante 30 min. Los pocillos se lavaron con tampón de lavado enfriado y se añadió a cada pocillo anticuerpo policlonal anti-C4 humana conjugado con HRP (Biogenesis, Poole, Inglaterra). Después de la incubación a 37°C durante 30 min, se lavaron los pocillos con el tampón de lavado y se añadió solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) a cada pocillo. Tras el desarrollo, se añadió H₃PO₄ 1 M y se midió la absorbancia a 450 nm.

10 *Análisis del depósito de C3*

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

Recombinantes

Se prepararon sMAP de ratón recombinante (rsMAP), rMASP-2, y el mutante MASP-2 de ratón inactivo (MASP-2i) cuyo residuo de serina del sitio activo en el dominio de serina proteasa fue sustituido por el residuo de alanina como se ha descrito previamente (Iwaki y Fujita, 2005).

Reconstitución del complejo de MBL-MASP-sMAP

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

Reconstitución de la actividad de depósito de C4

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

Resultados

FIGURA 20: Interrupción elegida como diana del gen *sMAP*. (A) Mapas de restricción parcial del gen *MASP-2/sMAP*, el vector de direccionamiento, y el alelo elegido como diana. El exón específico de *sMAP* (exón 5) se reemplazó por un casete del gen *neo*. (B) Análisis de transferencia Southern de ADN genómico a partir de la descendencia derivada del apareamiento de ratones quiméricos macho con ratones C57BL/6J hembra. El ADN de la cola se digirió con *Bam*H I y se hibridó con la sonda representada en (A). Se obtuvo una banda de 11 kpb a partir del alelo de tipo salvaje, y una banda de 6,5 kpb a partir del alelo elegido como diana. (C) Análisis de genotipificación de PCR. Se analizó el ADN de la cola utilizando una mezcla de cebadores efectores específicos del exón 4 y específicos del gen *neo* y un cebador antisentido específico del exón 6. Se obtuvo una banda de 2,5 kpb a partir del alelo de tipo salvaje, una banda de 1,8 kb a partir del alelo elegido como diana.

FIGURA 21: Expresión de los ARNm de *sMAP* y *MASP-2* en ratones homocigotos (-/-). (A) Análisis de transferencia Northern. Los ARN poli(A)+ de hígados de ratones de tipo salvaje (+/+) y homocigotos (-/-) se sometieron a electroforesis, se transfirieron a una membrana de nailon, y se hibridaron con una sonda marcada con ³²P específica para *sMAP*, la cadena H de *MASP-2*, la cadena L de *MASP-2* o el gen *neo*. Se observó una banda específica para *neo* (2,2 kb) en los ratones homocigotos (-/-). (B) RT-PCR cuantitativa. Los fragmentos de ADNc de las cadenas H y L de *MASP-2* y *sMAP* se amplificaron mediante PCR en tiempo real en un aparato LightCycler (Roche Diagnostics). Los ADNc sintetizados a partir de ARN poli(A)+ de los hígados de ratones de tipo salvaje (+/+) y homocigotos (-/-) se utilizaron como moldes. Los datos mostrados son las medias de dos experimentos.

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

FIGURA 23: Disminución de la escisión de C4 y C3 en suero de ratón homocigoto (-/-). (A) Depósito de C4 en

pocillos recubiertos con manano. El suero de ratón se diluyó 2 veces y se incubó en pocillos recubiertos con manano a temperatura ambiente durante 30 min. Después del lavado de los pocillos, se añadió C4 humana a cada pocillo y se incubó en hielo durante 30 min. La cantidad de C4 humana depositada en los pocillos se midió utilizando anticuerpo policlonal anti-C4 humana conjugado con HRP. (B) Depósito de C3 en pocillos recubiertos de manano. Se añadió suero de ratón diluido a los pocillos recubiertos con manano y se incubó a 37°C durante 1 h. Se detectó el depósito de C3 endógeno en los pocillos con anticuerpo policlonal anti-C3c humano conjugado con HRP.

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

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

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

RESULTADOS:

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

Para aclarar el papel de sMAP *in vivo*, los autores de la presente invención establecieron un ratón con genes elegidos como diana que carece de sMAP. Se construyó un vector de direccionamiento para reemplazar el exón específico para sMAP (exón 5) por un casete del gen de resistencia a neomicina (FIGURA 20A). Los clones positivos para ES se inyectaron en blastocistos C57BL/6, y las quimeras fundadoras fueron engendradas por hembras C57BL/6J. El análisis de transferencia Southern del ADN de la cola de crías de color agutí mostró una transmisión germinal del alelo elegido como diana (FIGURA 20B). Se seleccionaron ratones heterocigotos (+/-) mediante análisis de transferencia Southern del ADN de la cola digerido con *Bam*H I utilizando la sonda indicada en la FIGURA 20A. El análisis de transferencia Southern mostró bandas de 6,5 kpb y de 11 kpb en ADN de ratones heterocigotos (+/-) (FIGURA 20B). Los ratones heterocigotos (+/-) se retrocruzaron con ratones C57BL/6J. Para obtener ratones homocigotos (-/-) se entrecruzaron ratones heterocigotos (+/-). Los ratones homocigotos (-/-) (dotación C57BL/6J) fueron identificados mediante genotipificación basada en PCR del ADN de la cola, produciendo una sola banda de 1,8 kpb (FIGURA 20C).

Los ratones homocigotos (-/-) se desarrollaron normalmente y no mostraron diferencias significativas en el peso corporal con los ratones tipo salvaje (+/+). Tampoco hubo diferencias morfológicas entre ellos. En un análisis de transferencia Northern, la sonda específica para sMAP detectó una sola banda de 0,9 kb en los ratones de tipo salvaje (+/+), mientras que no se detectaron bandas específicas en los ratones homocigotos (-/-) (FIGURA 21A). Cuando se utilizó la sonda específica para la cadena H o L de MASP-2, se detectaron varias bandas específicas de ratones de tipo salvaje (+/+) como se informó anteriormente (Stover et al., 1999) y la sonda específica de la cadena H también detectó la banda específica de sMAP. Sin embargo, en ratones homocigotos (-/-) las bandas correspondientes fueron muy débiles y se detectaron varias bandas adicionales. También se realizó un análisis cuantitativo de RT-PCR para comprobar los niveles de expresión del ARNm de sMAP y MASP-2. En ratones homocigotos (-/-), la expresión de ARNm de sMAP fue abolida completamente y la de MASP-2 también se redujo notablemente: se cuantificó como aproximadamente 2% de la de los ratones tipo salvaje (+/+) en ambas cadenas H y L mediante PCR en tiempo real (FIGURA 21B). Además, los autores de la presente invención examinaron la expresión de MASP-2 a nivel de proteínas. Tanto sMAP como MASP-2 fueron indetectables en suero de ratón homocigoto (-/-) mediante inmunotransferencia (FIGURA 22A). Después de la incubación del suero de ratón homocigoto (-/-) con gel de manano-agarosa, sMAP y MASP-2 fueron indetectables en la fracción unida a los geles, aunque se detectó MASP-1 en el complejo (FIGURA 22B).

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

Cuando el suero de ratón homocigoto (-/-) se incubó en los pocillos recubiertos con manano, la cantidad de C4 humana depositada en los pocillos fue aproximadamente 20% de la del suero normal en diluciones que variaban de 1/400 a 1/50 (Figura 23A). Los autores de la presente invención también examinaron la actividad de depósito de C3

de la vía de las lectinas en suero de ratón homocigoto (-/-). Se añadió el suero de ratón a los pocillos recubiertos con manano y se midió la cantidad de C3 endógena depositada en los pocillos. La cantidad se redujo en el suero deficiente y fue 21% de la del suero normal a una dilución de 1/10 (Figura 23B).

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

5 Cuando se añadió sMAP recombinante (rsMAP) de ratón o el mutante de MASP-2 de ratón inactivo (MASP-2i) a suero de ratón homocigoto (-/-), ambos recombinantes fueron capaces de unirse a MBL (Figura 24A, *calles 3 y 4*). Cuando rsMAP y MASP-2i se incubaron simultáneamente con el suero (Figura 24A, *calle 5*), se detectaron ambos recombinantes en el complejo de MBL-MASP-sMAP. Sin embargo la cantidad de sMAP unida al complejo fue menor que cuando solo se incubó con el suero rsMAP. A continuación, los autores de la presente invención investigaron
10 adicionalmente la unión competitiva de sMAP y MASP-2 a MBL. Se añadieron una cantidad constante de rsMAP y diversas cantidades de MASP-2i al suero deficiente. La unión de rsMAP disminuyó de una manera dependiente de la dosis con cantidades crecientes de MASP-2i (Figura 24B). A la inversa, la cantidad de MASP-2i unida a MBL se redujo por la adición de rsMAP (Figura 24C). Cuando se añadió rsMAP al suero de tipo salvaje, la unión de sMAP y de MASP-2 endógenos a MBL disminuyó de una manera dependiente de la dosis (Figura 24D).

15 *Reconstitución de la actividad de depósito de C4 en suero de ratón homocigoto (-/-)*

Los autores de la presente invención realizaron un experimento de reconstitución del depósito de C4 en pocillos recubiertos con manano utilizando recombinantes. Cuando se añadió rsMAP al suero deficiente, la cantidad de C4 depositada en realidad disminuyó a los niveles basales en una forma dependiente de la dosis (Figura 25A). Cuando se añadió rMASP-2 al suero, la cantidad de C4 se restauró hasta en 46% de la del suero de tipo salvaje en una
20 forma dependiente de la dosis y alcanzó una meseta (Figura 25B). A continuación, se investigó el efecto de sMAP sobre el depósito de C4. Cuando se añadieron una cantidad constante de rMASP-2 y diversas cantidades de rsMAP al suero deficiente, la cantidad de C4 depositada disminuyó con la adición de rsMAP de una manera dependiente de la dosis (Figura 26A) y la adición de rsMAP a suero de tipo salvaje también disminuyó la cantidad de C4 depositada (Figura 26B), lo que sugiere que sMAP desempeña un papel regulador en la activación de la vía de las lectinas.

25 **Discusión**

Los autores de la presente invención han generado ratones *sMAP*^{-/-} a través de la alteración elegida como diana del exón específico de sMAP. El nivel de expresión de MASP-2 también disminuyó extremadamente tanto a nivel de ARNm como de proteína en estos ratones (Figuras 21 y 22). Un análisis de transferencia Northern con una sonda de MASP-2 mostró solo bandas extra en el ARN poli(A)⁺ de ratones *sMAP*^{-/-}, lo que sugiere que el corte y empalme
30 normal del gen *MASP-2* fue alterado por el direccionamiento del gen *sMAP* y por lo tanto, el nivel de expresión de MASP-2 se redujo notablemente. Como resultado, la escisión de C4 por el complejo de MBL-MASP en el suero deficiente se redujo en aproximadamente 80% en comparación con la del suero normal (Figura 23A). En los experimentos de reconstitución, la actividad de escisión de C4 fue restaurada mediante adición de rMASP-2 pero no rsMAP (Figura 25). La reducción del depósito de C4 observado en el suero deficiente debería ser causada por la deficiencia de MASP-2 en el complejo de MBL-MASP (Figura 22B). Por lo tanto, resulta evidente que MASP-2 es esencial para la activación de C4 por el complejo de MBL-MASP. Sin embargo, la adición de rMASP-2 no restauró completamente la actividad de escisión y el depósito de C4 alcanzó una meseta. Como se informó anteriormente (Cseh et al., *J Immunol* 169: 5735-5743 (2002); Iwaki y Fujita, *J Endotoxin Res* 11: 47-50 (2005), la mayoría de rMASP-2 se convirtió en la forma activa mediante autoactivación durante los procedimientos de purificación y algunos perdieron su actividad proteasa. Dado que el estado activo o inactivo de MASP-2 no tiene influencia significativa en su asociación con MBL (Zundel et al., *J Immunol* 172: 4342-4350 (2004), es posible que rMASP-2 que ha perdido su actividad proteasa se una a MBL e impida competitivamente la asociación de la forma activa, dando como resultado una restauración incompleta del depósito de C4. La actividad de escisión de C3 de la vía de las lectinas también se atenuó en el suero deficiente (Figura 23B). La disminución de la cantidad de C3 depositada
45 es probablemente debida al bajo nivel de actividad de la convertasa de C3, que consiste en fragmentos C4b y C2a generados mediante MASP-2.

Cada uno de MASP y sMAP se asociaban como homodímeros y complejos con MBL o L-ficolina a través de sus dominios CUB y de tipo EGF N-terminales (Chen y Wallis, *J Biol Chem* 276: 25894-25902 (2001); Cseh et al., *J Immunol* 169: 5735-5743 (2002); Thielens et al., *J Immunol* 166: 5068-5077 (2001); Zundel et al., *J Immunol* 172: 4342-4350 (2004)). Las estructuras cristalinas de sMAP y el segmento CUB1-EGF-CUB2 de MASP-2 revelan su estructura homodimérica (Feinberg et al., *EMBO J* 22: 2348-2359 (2003); Gregory et al., *J Biol Chem* 278: 32.157-32.164 (2003)). El dominio de tipo colágeno de MBL está implicado en la asociación con MASP (Wallis y Cheng, *J Immunol* 163: 4953-4959 (1999); Wallis y Drickamer, *J Biol Chem* 279: 14065-14073 (1999) y algunas mutaciones introducidas en el dominio han disminuido la unión de MBL a los segmentos CUB1-EGF-CUB2 de MASP-1 y MASP-2
55 (Wallis y Dodd, *J Biol Chem* 275: 30962-30969 (2000)). Los sitios de unión para MASP-2 y para MASP-1/3 se solapan, pero no son idénticos (Wallis et al., *J Biol Chem* 279: 14065-13073 (2004)). Aunque el sitio de unión a sMAP de MBL no ha sido identificado todavía, los sitios de unión para sMAP y MASP-2 son probablemente idénticos, debido a que la región CUB1-EGF es la misma en sMAP y MASP-2. Por lo tanto, es razonable que sMAP y MASP-2 compitan entre sí para unirse a MBL en la reconstitución del complejo de MBL-MASP-sMAP (Figura 24). La afinidad de sMAP por MBL es inferior a la de MASP-2 (Cseh et al., *J Immunol* 169: 5735-5743 (2002); Thielens et

60

al., *J Immunol* 166: 5068-5077 (2001)). La concentración de sMAP en suero de ratón no se ha determinado. Como se muestra en la Figura 22A, sin embargo, la cantidad de sMAP en el suero de tipo salvaje es mucho mayor que la de MASP-2. Por lo tanto sMAP es capaz de ocupar el sitio de unión a MASP-2/sMAP y prevenir la unión de MASP-2 a MBL y, en consecuencia se reduce la actividad de escisión de C4 del complejo de MBL-MASP. El mecanismo de regulación de sMAP en la vía de las lectinas queda por investigar. Todavía no se sabe si sMAP juega su papel regulador antes o después de la activación del complemento. sMAP puede evitar la activación inadvertida del complejo de MBL-MASP antes de la infección microbiana o suprimir la activación en exceso de la vía de las lectinas una vez activada. Hay otro regulador de potencial en la vía de las lectinas. MASP-3 también es un competidor del MASP-2 en la unión a MBL y regula a la baja la actividad de escisión de C4 y C2 de MASP-2 (Dahl et al., *Immunity* 15: 127-135 (2001)). Aunque la interacción entre sMAP y MASP-3 no se ha investigado, es posible que sean capaces de regular a la baja la activación de la vía de las lectinas de manera cooperativa.

En este informe los autores de la presente invención han demostrado que sMAP y MASP-2 compiten por la unión a MBL y sMAP tiene la capacidad de regular a la baja la vía de las lectinas, que es activada por el complejo de MBL-MASP. Es razonable que sMAP también regule otra ruta de la vía de las lectinas activada por el complejo de ficolina-MASP. MASP-2 y sMAP también compiten para unirse a la ficolina A de ratón y regulan a la baja la actividad de escisión de C4 del complejo de ficolina A-MASP (Y Endo et al., en preparación). Se informó recientemente sobre un estudio de ratones nulos para MBL (Shi et al., *J Exp Med* 199: 1379-1390 (2004)). Los ratones nulos para MBL no tienen actividad de escisión de C4 en la vía de las lectinas MBL y son susceptibles a infecciones por *Staphylococcus aureus*. En el presente estudio, los ratones sMAP^{-/-}, que también tienen deficiencia de MASP-2, mostraron reducciones en la actividad de escisión de C3, además de la actividad de escisión de C4 en la vía de las lectinas. Debido al deterioro de su actividad de opsonización, los ratones con deficiencia de sMAP pueden ser susceptibles a infecciones bacterianas. La investigación adicional de los ratones con deficiencia de sMAP aclarará la función de la vía de las lectinas en la protección contra enfermedades infecciosas.

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

EJEMPLO 31

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

Antecedentes/Fundamento: Muy recientemente, se ha demostrado que la inhibición de la vía alternativa protege el riñón de la insuficiencia aguda isquémica (Thurman et al., *J Immunol* 170:1517-1523 (2003)). Los datos descritos en la presente memoria implican que la vía de las lectinas instruye la activación de la vía alternativa, que a su vez amplifica la activación del complemento sinérgicamente. Los autores de la presente invención piensan que la inhibición transitoria de la vía de las lectinas también puede afectar a la activación de la vía alternativa y por lo tanto mejorar el resultado a largo plazo en el trasplante de órganos al limitar el daño y la inflamación del injerto mediados por el complemento, y puede moderar la inducción no deseada de una respuesta inmunitaria adaptativa contra el injerto y reducir el riesgo de rechazo de injerto secundario a través del sistema inmunitario adaptativo. Esto es apoyado por datos clínicos recientes que muestran que una vía de las lectinas parcialmente deteriorada, que resulta de deficiencias de MBL heredadas (presentes en aproximadamente 30% de la población humana), se asocia con un aumento de la supervivencia del aloinjerto renal en seres humanos (Berger, *Am J Transplant* 5:1361-1366 (2005)).

La participación de los componentes del complemento C3 y C4 en la lesión por isquemia-reperusión (I/R) estaba bien establecida en modelos de isquemia intestinal y muscular transitoria utilizando cepas de ratones con genes elegidos como diana (Weiser et al., *J Exp Med* 183:2342-2348 (1996); Williams et al. *J Appl Physiol* 86:938-42, (1999)). Está bien establecido que C3 tiene un papel prominente en la lesión renal por I/R y el rechazo del injerto secundario (Zhou et al., *J Clin Invest* 105:1363-1371 (2000); Pratt et al., *Nat Med* 8:582-587 (2002); Farrar, et al., *Am J. Pathol* 164:133-141 (2004)). Por consiguiente, resultó sorprendente que no se observara un fenotipo de deficiencia de C4 en los modelos publicados de rechazo de aloinjertos de riñón de ratón (Lin, 2005 *En prensa*). Un análisis posterior de los sueros y plasma de estos ratones con deficiencia de C4, sin embargo, indicó que estos ratones conservan una actividad funcional residual que muestra la escisión dependiente de LP de C3 y la activación adicional aguas abajo del complemento (véase la FIGURA 27C).

La existencia de una derivación de C4 (y derivación de C2) funcional es un fenómeno descrito anteriormente (pero no caracterizado totalmente) por varios investigadores (Miller et al., *Proc Natl Acad Sci.* 72:418-22 (1975); Knutzen

Steuer et al., *J Immunol* 143 (7):2256-61 (1989); Wagner et al., *J Immunol* 163:3549-3558 (1999) y se refiere al recambio de C3 independiente de la vía alternativa en sueros con deficiencia de C4 (y C2).

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

Resultados: Los resultados mostrados en la FIGURA 27A-C son representativos de 3 experimentos independientes.

Al utilizar los mismos sueros en pocillos recubiertos con complejos de inmunoglobulina en lugar de manano o zimosano, se observan depósitos de C3b y escisión de Factor B en sueros de ratón WT (+/+) y sueros MASP-2 (-/-) agrupados, pero no en sueros empobrecidos en C1q (datos no mostrados). Esto indica que la activación de la vía alternativa puede ser restaurada en sueros MASP-2-/- cuando C3b inicial se proporcione vía actividad de CP. La FIGURA 27C muestra el hallazgo sorprendente de que C3 puede ser activado de manera eficiente de una manera dependiente de la vía de las lectinas en plasma con deficiencia de C4 (-/-). Esta "derivación de C4" es abolida por la inhibición de la activación de la vía de las lectinas a través de la preincubación de plasma con manano o manosa soluble.

Se puede observar que el depósito de C3b en manano y zimosano es gravemente comprometido en ratones con deficiencia de MASP-2 (-/-), incluso en condiciones experimentales que de acuerdo con muchos trabajos publicados previamente sobre la vía de activación alterativa deben ser permisivas para las tres vías. Como se muestra en la FIGURA 27A-C, el plasma de ratón con deficiencia de MASP-2 (-/-) no activa C4 a través de la vía de las lectinas y no escinde C3, ni a través de la vía de las lectinas ni de la vía alternativa. Por lo tanto, los autores de la presente invención establecen la hipótesis de que se requiere MASP-2 en esta derivación de C4. Más recientemente, el Prof. Teizo Fujita informó sobre nuevos avances en la identificación de los componentes que puedan estar involucrados en la derivación de C4 dependiente de la vía de las lectinas. El plasma de ratones con deficiencia de C4 cruzados con la cepa de ratón con deficiencia de MASP-1/3 de Fujita pierde la capacidad residual del plasma con deficiencia de C4 para escindir C3 a través de la vía de las lectinas. Ésta fue restaurada mediante la adición de MASP-1 recombinante al plasma con deficiencia de C4 y MASP-1/3 combinado (Takahashi, *Mol Immunol* 43: 153 (2006)), lo que sugiere que MASP-1 está implicada en la formación de complejos derivados de la vía de las lectinas que escinden C3 en ausencia de C4 (MASP-1 recombinante no escinde C3, pero escinde C2; Rossi et al., *J Biol Chem* 276: 40880-7 (2001); Chen et al., *J Biol Chem* 279:26058-65 (2004)). Los autores de la presente invención han observado que se requiere MASP-2 para que se forme esta derivación.

Aunque se necesitan más parámetros funcionales y cuantitativos e histología para consolidar este estudio piloto, sus resultados preliminares prestan un fuerte apoyo a la hipótesis de que la activación del complemento a través de la vía de las lectinas contribuye significativamente a la fisiopatología de la lesión por I/R renal, puesto que los ratones MASP-2-/- muestran una recuperación mucho más rápida de las funciones renales.

EJEMPLO 32

Este ejemplo demuestra que la activación de la trombina puede ocurrir después de la activación de la vía de las lectinas en condiciones fisiológicas, y demuestra el grado de participación de MASP-2. En el suero de rata normal, la activación de la vía de las lectinas conduce a la activación de la trombina (evaluada como depósito de trombina) al mismo tiempo que a la activación del complemento (evaluada como depósito de C4). Como se puede observar en las FIGURAS 28A y 28B, la activación de la trombina en este sistema es inhibida por un anticuerpo de bloqueo de MASP-2 (formato Fab2), que presenta una curva de inhibición de concentración-respuesta (FIGURA 28B) que es paralela a la de la activación del complemento (FIGURA 28A). Estos datos sugieren que la activación de la vía de las lectinas como ocurre en el trauma conducirá a la activación de los sistemas del complemento y de coagulación en un proceso que es totalmente dependiente de MASP-2. Por inferencia, los anticuerpos de bloqueo de MASP2 pueden resultar eficaces en la mitigación de los casos de coagulación sistémica excesiva, p.ej., coagulación intravascular diseminada, que es una de las características que conducen a la mortalidad en los casos de trauma importante.

EJEMPLO 33

Este ejemplo proporciona los resultados obtenidos utilizando un modelo de reacción de Schwartzman localizada de coagulación intravascular diseminada ("CID") en ratones con deficiencia de MASP-2-/- y con suficiente MASP-2+/- para evaluar el papel de la vía de las lectinas en la CID.

Antecedentes/Fundamento:

Como se ha descrito anteriormente, el bloqueo de MASP-2 inhibe la activación de la vía de las lectinas y reduce la generación de ambas anafilotoxinas C3a y C5a. Se puede demostrar que las anafilotoxinas C3a son agregadores plaquetarios potentes *in vitro*, pero su participación *in vivo* no está bien definida y la liberación de sustancias plaquetarias y plasmína en la reparación de heridas pueden implicar sólo secundariamente a C3 del complemento. En este ejemplo, el papel de la vía de las lectinas fue analizado en ratones MASP-2 (-/-) y WT (+/+) con el fin de

abordar si la elevación prolongada de la activación de C3 es necesaria para generar la coagulación intravascular diseminada.

Métodos:

5 Los ratones MASP-2 (-/-) utilizados en este estudio fueron generados como se describe en el EJEMPLO 27. En este experimento se utilizó el modelo de reacción de Schwartzman localizada. La reacción de Schwartzman localizada (LSR) es una respuesta inducida por lipopolisacáridos (LPS) con contribuciones bien caracterizadas de elementos celulares y humorales del sistema inmunitario innato. La dependencia de la LSR del complemento está bien establecida (Polak, L., et al., *Nature* 223:738-739 (1969); Fong J. S. et al., *J Exp Med* 134:642-655 (1971)). En el modelo de LSR, los ratones fueron cebados durante 4 horas con TNF alfa (500 ng, intraescrotales), a continuación, los ratones se anestesiaron y se prepararon para la microscopía intravital del músculo cremáster. Se seleccionaron redes de vénulas poscapilares (diámetro de 15 a 60 µm) con buen flujo de sangre (1-4 mm/s) para su observación. Los animales fueron tratados con anticuerpos fluorescentes para marcar selectivamente neutrófilos o plaquetas. La red de vasos fue escaneada de forma secuencial y se registraron digitalmente imágenes de todos los vasos de su ulterior análisis. Después de registrar el estado basal de la microcirculación, los ratones recibieron una sola inyección intravenosa de LPS (100 µg), ya sea solos o con los agentes enumerados a continuación. La misma red de vasos se escaneó a continuación cada 10 minutos durante 1 hora. La acumulación específica de fluoróforos se identificó restando la fluorescencia del fondo y se reforzó por umbralización de la imagen. La magnitud de las reacciones se mide a partir de las imágenes grabadas. La principal medida de las reacciones de Schwartzman fueron los datos agregados.

20 Los estudios compararon ratones con suficiente MASP-2 +/+ o de tipo salvaje, expuestos ya sea a un agente empobrecedor de la vía del complemento conocido, factor de veneno de cobra (CVF), o a un inhibidor de la vía terminal (antagonista de C5aR). Los resultados (Fig. 29A) demuestran que CVF, así como un antagonista de C5aR previnieron ambos la aparición de agregados en la vasculatura. Además, los ratones con deficiencia de MASP-2-/- (FIG. 29B) también demostraron la completa inhibición de la reacción de Schwartzman localizada, apoyando la participación de la vía de las lectinas. Estos resultados demuestran claramente el papel de MASP-2 en la generación de CID y apoyan el uso de inhibidores de MASP-2 para el tratamiento y la prevención de la CID.

EJEMPLO 34

Este EJEMPLO describe el análisis de ratones MASP-2 (-/-) en un Modelo Murino de Isquemia/Reperusión Miocárdica.

30 Antecedentes/Fundamento:

Para evaluar la contribución de MASP-2 a los daños por reperusión inflamatoria después de un insulto isquémico a la arteria coronaria, los ratones MASP-2 (-/-) y MASP-2 (+/+) se compararon en el modelo murino de isquemia/reperusión (MIRP) como describen Marber et al., en *J. Clin Invest.* 95: 1446-1456 (1995), y en un modelo de corazón de ratón perfundido aislado de Langendorff.

35 Métodos:

Los ratones MASP-2 (-/-) utilizados en este estudio fueron generados como se describe en el EJEMPLO 27. El insulto isquémico al ventrículo izquierdo se realizó en ocho ratones WT (MASP-2 (+/+)) y once MASP-2 (-/-) utilizando los métodos descritos en el EJEMPLO 27. El tamaño del infarto (INF) y el área en riesgo (AAR) se determinaron por planimetría como se describe en el EJEMPLO 27.

40 *Modelo de corazón de ratón aislado-perfundido de Langendorff:* El método de preparación de los corazones de los ratones para el modelo de corazón de ratón aislado-perfundido de Langendorff se llevó a cabo como describen F. J. Sutherland et al., *Pharmacol Res* 41:613 (2000). Véase también, A.M. Kabir et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H1893 (2006); Y. Nishino et al., *Circ Res* 103:307 (2008) e I.G. Webb et al., *Cardiovascular Res* (2010)).

45 Descrito en pocas palabras, se anestesiaron seis ratones WT (+/+) macho y nueve MASP-2 (-/-) macho con pentobarbital (300 mg/kg) y heparina (150 unidades) por vía intraperitoneal. Los corazones se aislaron rápidamente y se colocaron en tampón de Krebs-Henselit modificado enfriado con hielo (KH, 118,5 mmoles/l de NaCl, 25,0 mmoles/l de NaHCO₃, 4,75 mmoles de KCl, 1,18 de KH₂PO₄, 1,19 de MgSO₄, 11,0 de D-glucosa, y 1,41 de CaCl₂). El corazón extirpado se montó en un aparato de Langendorff con una camisa de agua y se perfundió retrógradamente a una presión constante de 80 mm de Hg con tampón de KH equilibrado con 95% O₂ y 5% de CO₂. La temperatura del perfusato se mantuvo a 37°C. Un balón lleno de fluido insertado en el ventrículo izquierdo supervisó la función contráctil. El balón fue inflado gradualmente hasta que la presión diastólica final estuvo entre 1 y 7 mm Hg. La estimulación auricular se realizó a 580 latidos por minuto con un alambre de plata de 0,075 mm (Advent). El flujo coronario se midió mediante la recogida temporizada del perfusato.

Evaluación de infarto in vitro

55 Después de comenzar la perfusión retrógrada, los corazones se estabilizaron durante 30 minutos. Para la inclusión,

5 todos los corazones tuvieron que cumplir los siguientes criterios: flujo coronario entre 1,5 y 4,5 ml/min, ritmo cardiaco > 300 lpm (no estimulado), presión desarrollada del ventrículo izquierdo > 55 mm Hg, tiempo de toracotomía para la canulación aórtica <3 min, y ninguna disritmia persistente durante la estabilización. A continuación, se llevaron a cabo la isquemia global y la reperfusión en ausencia de suero. Todos los corazones se sometieron a 30 minutos de isquemia global mediante el pinzamiento del tubo de flujo de entrada aórtico, seguido de 2 h de reperfusión.

10 La estimulación eléctrica se interrumpió cuando cesó la contracción durante la isquemia y se reinició en el plazo de 30 minutos en la reperfusión. Después de 2 h de reperfusión. Los corazones se perfundieron durante 1 min con 5 ml de cloruro de trifeníltetrazolio al 1% (TTC) en KH y a continuación se colocaron en una solución idéntica a 37°C durante 10 min. A continuación se retiraron las aurículas, y los corazones se secaron con papel secante, se pesaron y se almacenaron a -20°C hasta durante 1 semana.

15 Los corazones se descongelaron a continuación, se colocaron en glutaraldehído al 2,5% durante 1 minuto, y se fijaron en agarosa al 5%. Los bloques de corazón en agarosa se seccionaron a continuación desde el vértice a la base en secciones de 0,7 mm en un vibrátomo (Agar Scientific). Después de seccionar, las secciones se colocaron durante la noche en formaldehído al 10% a temperatura ambiente antes de ser transferidas a PBS durante un día adicional a 4°C. Las secciones se comprimieron a continuación entre placas Perspex (0,57 mm de separación) y se obtuvieron imágenes utilizando un escáner (Epson modelo G850A). Después de la ampliación, se realizó la planimetría utilizando soporte lógico de análisis de imagen (SigmaScan Pro 5.0, SPSS) y el área de superficie del miocardio ventricular izquierdo completo y negativo para TTC se transformó en volumen mediante la multiplicación por el espesor del tejido. Dentro de cada corazón, después de la suma de las secciones individuales, el volumen de infarto negativo para TTC se expresó como un porcentaje de, o se representó frente al, volumen ventricular izquierdo.

Resultados:

25 El tamaño del área infartada (pálido), el área del ventrículo izquierdo (VI) en situación de riesgo (rojo) y la zona del VI perfundida normalmente (azul) se esbozaron en cada sección mediante la identificación de su apariencia de color y sus fronteras de color. Las áreas fueron cuantificadas en ambos lados de cada sección y promediadas por un investigador. El volumen del infarto se calculó como % de la zona de riesgo (% ZR) para cada animal.

30 La FIGURA 31A muestra la evaluación de ocho ratones WT (+/+) y once ratones MASP-2 (-/-) para la determinación de su tamaño del infarto después de someterse a la técnica de oclusión y reperfusión de la arteria coronaria descrita anteriormente. La FIGURA 31A ilustra gráficamente el área en riesgo media (AAR, una medida de la zona afectada por isquemia) y los volúmenes de infarto (INF, una medida de daño al miocardio), como un porcentaje del volumen miocárdico total. Como se muestra en la FIGURA 31A, si bien no hay diferencia en el AAR entre los dos grupos, los volúmenes de INF se redujeron significativamente en los ratones MASP-2 (-/-) en comparación con sus compañeros de camada WT, lo que indica un efecto protector contra el daño del miocardio en ausencia de MASP-2 en este modelo de MIRP.

35 La FIGURA 31B ilustra gráficamente la relación entre el INF representado frente a la AAR como % del volumen miocárdico del ventrículo izquierdo (VI). Como se muestra en la FIGURA 31B, para cualquier AAR dada, los animales MASP-2 (-/-) mostraron una reducción altamente significativa del tamaño de su infarto en comparación con sus compañeros de camada WT.

40 Las FIGURAS 31C y 31D muestran los resultados del infarto de miocardio en los corazones perfundidos con tampón de ratones WT (+/+) y MASP-2 (-/-) preparados de acuerdo con el *modelo de corazón de ratón aislado-perfundido de Langendorff*, en el que la isquemia global y la reperfusión se llevaron a cabo en ausencia de suero. Como se muestra en las FIGURAS 31C y 31D, no se observó ninguna diferencia en el volumen del infarto resultante (INF) entre los corazones de los ratones MASP-2 (-/-) y WT (+/+), lo que sugiere que la diferencia en los tamaños de infarto mostrada en las FIGURAS 31A y 31B son causadas por factores plasmáticos, y no por una menor susceptibilidad del tejido miocárdico de los ratones MASP-2 (-/-) al daño isquémico.

45 Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que la deficiencia de MASP-2 reduce significativamente el daño miocárdico tras la reperfusión de un corazón isquémico en el Modelo murino de isquemia/Reperfusión miocárdica, y apoyan el uso de inhibidores de la MASP-2 para tratar y prevenir la lesión por isquemia/reperfusión.

EJEMPLO 35

50 Este EJEMPLO describe el análisis de ratones MASP-2 (-/-) en un Modelo Murino de Trasplante Renal.

Antecedentes/Fundamento:

El papel de MASP-2 en el resultado funcional de un trasplante de riñón se evaluó utilizando un modelo de ratón.

Métodos:

El resultado funcional del trasplante renal se evaluó utilizando un único isoinjerto renal en ratones receptores

uninefrectomizados, con seis receptores de trasplante WT (+/+) (B6), y seis receptores de trasplante MASP-2 (-/-). Para evaluar la función del riñón trasplantado, el riñón nativo restante se eliminó del receptor 5 días después del trasplante, y la función renal se evaluó 24 horas más tarde mediante la medida de los niveles de nitrógeno ureico en sangre (NUS).

- 5 **Resultados:**
- La FIGURA 32 ilustra gráficamente los niveles de nitrógeno ureico en sangre (NUS) de los riñones a los 6 días del trasplante de riñón en los receptores WT (+/+) y los receptores MASP-2 (-/-). Como se muestra en la FIGURA 32, se observaron niveles de NUS fuertemente elevados en los receptores de trasplante WT (+/+) (B6) (los niveles normales de NUS en ratones son <5 mM), lo que indica fallo renal. Por el contrario, los ratones receptores de isoinjerto MASP-2 (-/-) mostraron niveles de NUS sustancialmente más bajos, lo que sugiere una función renal mejorada. Se observa que estos resultados se obtuvieron utilizando injertos de donantes de riñón WT (+/+), lo que sugiere que la ausencia de una vía de las lectinas funcional en el receptor del trasplante por sí sola es suficiente para conseguir un beneficio terapéutico.
- 10 Tomados en conjunto, estos resultados indican que la inhibición transitoria de la vía de las lectinas a través de la inhibición de MASP-2 proporciona un método para reducir la morbilidad y la función retardada del injerto en el trasplante renal, y que es probable que este enfoque sea útil en otros entornos de trasplante.

EJEMPLO 36

- 20 Este EJEMPLO demuestra que los ratones MASP-2 (-/-) son resistentes a choque séptico en un Modelo Murino de Peritonitis Séptica Polimicrobiana.

Antecedentes/Fundamento:

- Para evaluar los efectos potenciales de MASP-2 (-/-) en la infección, se evaluó un modelo de ligadura y punción cecal (CLP), un modelo de peritonitis séptica polimicrobiana. Se piensa que este modelo imita lo más exactamente posible el curso de la peritonitis séptica en seres humanos. El modelo de ligadura y punción cecal (CLP) es un modelo en el que el ciego se liga y perfora con una aguja, lo que lleva a una fuga continua de las bacterias a la cavidad abdominal que llega a la sangre a través del drenaje linfático y a continuación se distribuye a todos los órganos abdominales, lo que lleva a fallo multiorgánico y choque séptico (Eskandari et al., *J Immunol* 148(9):2724-2730 (1992)). El modelo CLP imita el curso de la sepsis observada en los pacientes e induce una respuesta hiperinflamatoria temprana seguida de una fase hipo-inflamatoria pronunciada. Durante esta fase, los animales son muy sensibles a problemas bacterianos (Wichterman et al., *J. Surg. Res.* 29(2):189-201 (1980)).

Métodos:

- La mortalidad de la infección polimicrobiana utilizando el modelo de ligadura y punción cecal (CLP) se midió en ratones WT (+/+) (n = 18) y MASP-2 (-/-) (n = 16) como se describe en el EJEMPLO 23. Descrito brevemente, se anestesiaron los ratones con deficiencia de MASP-2 y sus compañeros de camada de tipo salvaje y el ciego se exteriorizó y se ligó 30% por encima del extremo distal. Después de eso, el ciego se perforó una vez con una aguja de 0,4 mm de diámetro. A continuación, el ciego se repuso a la cavidad abdominal y la piel se cerró con grapas. La supervivencia de los ratones sometidos a CLP se controló durante un período de 14 días después de la CLP. Se recogió un lavado peritoneal en ratones 16 horas después de CLP para medir la carga bacteriana. Las diluciones en serie del lavado peritoneal se prepararon en PBS y se inocularon en placas de Mueller Hinton con posterior incubación a 37°C en condiciones anaerobias durante 24 horas después de lo cual se determinó la carga bacteriana.

La respuesta de citoquinas TNF-alfa a la infección bacteriana también se midió en ratones WT (+/+) y MASP-2 (-/-) 16 horas después de CLP en los pulmones y los bazo a través de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). También se cuantificó el nivel en suero de TNF-alfa 16 horas después de CLP en los ratones WT (+/+) y MASP-2 (-/-) mediante ELISA de tipo sándwich.

- 45 **Resultados:**

- La FIGURA 33 ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de los animales tratados mediante CLP como una función de los días después del procedimiento de CLP. Como se muestra en la FIGURA 33, la deficiencia de la vía de las lectinas en los ratones MASP-2 (-/-) no aumenta la mortalidad de los ratones después de la infección polimicrobiana utilizando el modelo de ligadura y punción cecal en comparación con los ratones WT (+/+). Sin embargo, como se muestra en la FIGURA 34, los ratones MASP-2 (-/-) mostraron una carga bacteriana significativamente mayor (aproximadamente un aumento de 1000 veces en el número de bacterias) en el lavado peritoneal después de la CLP en comparación con sus compañeros de camada WT (+/+). Estos resultados indican que los ratones con deficiencia de MASP-2 (-/-) son resistentes al choque séptico. La reducción del aclaramiento de bacterias en ratones con deficiencia de MASP-2 en este modelo puede ser debida a una alteración de la fagocitosis mediada por C3b, puesto que se demostró que el depósito de C3 es dependiente de MASP-2.

Se determinó que la respuesta de citoquinas TNF-alfa a la infección bacteriana no fue elevada en los ratones MASP-2

(-/-) en comparación con los controles WT (+/+) (datos no mostrados). También se determinó que había una concentración en suero significativamente mayor de TNF-alfa en ratones WT (+/+) 16 horas después de la CLP en contraste con los ratones MASP-2 (-/-), donde el nivel en suero de TNF-alfa se mantuvo casi inalterado. Estos resultados sugieren que la respuesta inflamatoria intensa a las condiciones sépticas se atemperó en ratones MASP-2 (-/-) y permitió que los animales sobrevivieran en presencia de recuentos bacterianos más altos.

En conjunto, estos resultados demuestran los efectos deletéreos potenciales de la activación del complemento por la vía de las lectinas en el caso de la septicemia y el aumento de la mortalidad en pacientes con sepsis desmesurada. Estos resultados demuestran adicionalmente que la deficiencia de MASP-2 modula la respuesta inmunitaria inflamatoria y reduce los niveles de expresión de mediadores de la inflamación durante la sepsis. Por lo tanto, se cree que la inhibición de MASP-2 (-/-) mediante la administración de anticuerpos monoclonales inhibidores contra MASP-2 sería eficaz para reducir la respuesta inflamatoria en un sujeto afectado de choque séptico.

EJEMPLO 37

Este EJEMPLO describe el análisis de ratones MASP-2 (-/-) en un Modelo Murino de Infectividad Intranasal.

Antecedentes/Fundamento:

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno bacteriano humano oportunista Gram negativo que causa una amplia gama de infecciones, especialmente en individuos inmunocomprometidos. Es una fuente importante de infecciones nosocomiales adquiridas, en particular neumonía adquirida en el hospital. También es responsable de la morbilidad y mortalidad significativas en pacientes con fibrosis quística (FQ). La infección pulmonar por *P. aeruginosa* se caracteriza por un fuerte reclutamiento de neutrófilos e inflamación pulmonar significativa que dan como resultado daño tisular extenso (Palanki M. S. et al., *J. Med. Chem* 51:1546-1559 (2008)).

En este EJEMPLO, se llevó a cabo un estudio para determinar si la supresión de la vía de las lectinas en ratones MASP-2 (-/-) aumenta la susceptibilidad de los ratones a infecciones bacterianas.

Métodos:

Se sensibilizaron veintidós ratones WT (+/+), veintidós ratones MASP-2 (-/-), y once ratones C3 (-/-) con administración intranasal de la cepa bacteriana de *P. aeruginosa*. Los ratones fueron controlados durante los seis días posteriores a la infección y se construyeron gráficos de Kaplan-Mayer que muestran el porcentaje de supervivencia.

Resultados:

La FIGURA 35 es un gráfico de Kaplan-Mayer del porcentaje de supervivencia de los ratones WT (+/+), MASP-2 (-/-) o C3 (-/-) seis días después de la infección. Como se muestra en la FIGURA 35, no se observaron diferencias en los ratones MASP-2 (-/-) en comparación con los ratones WT (+/+). Sin embargo, la eliminación de la vía clásica (C1q) en los ratones C3 (-/-) dio como resultado una susceptibilidad severa a la infección bacteriana. Estos resultados demuestran que la inhibición de MASP-2 no aumenta la susceptibilidad a la infección bacteriana, lo que indica que es posible reducir las complicaciones inflamatorias no deseables en los pacientes de trauma mediante la inhibición de MASP-2, sin comprometer la capacidad del paciente para combatir las infecciones utilizando la vía clásica del complemento.

EJEMPLO 38

Este EJEMPLO describe el análisis farmacodinámico de anticuerpos Fab2 anti-MASP-2 de alta afinidad representativos que fueron identificados como se describe en el EJEMPLO 24.

Antecedentes/Fundamento:

Como se ha descrito en el EJEMPLO 24, con el fin de identificar anticuerpos de alta afinidad que bloquean la vía de las lectinas en rata, se utilizó proteína MASP-2 de rata para seleccionar una biblioteca de presentación en fagos. Esta biblioteca se diseñó para proporcionar una alta diversidad inmunológica y se construyó utilizando secuencias de genes de inmunoglobulina completamente humanos. Como se muestra en el EJEMPLO 24, se identificaron aproximadamente 250 clones de fagos individuales que se unían con alta afinidad a la proteína MASP-2 de rata mediante escrutinio ELISA. La secuenciación de estos clones identificó 50 fagos que codificaban anticuerpos contra MASP-2 únicos. La proteína Fab2 se expresó a partir de estos clones, se purificó y se analizó para determinar la afinidad de unión a MASP-2 y la inhibición funcional de la vía del complemento de las lectinas.

Como se muestra en la TABLA 6 del Ejemplo 24, se identificaron 17 Fab2 anti-MASP-2 con actividad de bloqueo funcional como resultado de este análisis (una tasa de éxito de 34% para el bloqueo de anticuerpos). La inhibición funcional de la vía del complemento de las lectinas por los Fab2 resultó evidente a nivel del depósito de C4, que es una medida directa de la escisión de C4 por MASP-2. Es importante destacar que la inhibición fue igualmente evidente cuando se evaluó la actividad de la convertasa de C3, lo que demuestra el bloqueo funcional de la vía del complemento de las lectinas. Los 17 Fab2 de bloqueo de MASP-2 identificados como se describe en el EJEMPLO

24 inhiben potentemente la formación de la convertasa de C3 con valores de CI_{50} iguales o inferiores a 10 nm. Ocho de los 17 Fab2 identificados tienen valores de CI_{50} en el rango sub-nanomolar. Además, los 17 Fab2 de bloqueo de MASP-2 produjeron inhibición esencialmente completa de la formación de la convertasa de C3 en el análisis de convertasa de C3 de la vía de las lectinas, como se muestra en las FIGURAS 11A-C, y se resume en la TABLA 6 del EJEMPLO 24. Por otra parte, cada uno de los 17 Fab2 de bloqueo anti-MASP-2 mostrados en la TABLA 6 inhiben potentemente la generación de C3b (> 95%), lo que demuestra la especificidad de este análisis para la convertasa de C3 de la vía de las lectinas.

se obtuvieron variantes de isotipo de anticuerpos completos IgG2c de rata e IgG2a de ratón a partir de Fab2 Núm. 11. Este ejemplo describe la caracterización *in vivo* de estos isotipos para los parámetros farmacodinámicos.

10 **Métodos:**

Como se ha descrito en el EJEMPLO 24, se utilizó la proteína MASP-2 de rata para desplazar una biblioteca de presentación en fagos de Fab, a partir de la cual se identificó Fab2 Núm. 11. Las variantes de isotipo de anticuerpos completos IgG2c de rata e IgG2a de ratón se obtuvieron a partir de Fab2 Núm. 11. Los isotipos de anticuerpos completos IgG2c de rata e IgG2a de ratón se caracterizaron *in vivo* para determinar los parámetros farmacodinámicos de la siguiente manera.

15 **Estudio *in vivo* en ratones:**

Se llevó a cabo un estudio farmacodinámico en ratones para investigar el efecto de la dosificación de anticuerpos anti-MASP-2 en la actividad de la vía de las lectinas en plasma *in vivo*. En este estudio, se midió el depósito de C4 *ex vivo* en un análisis de la vía de las lectinas en varios puntos temporales tras la administración subcutánea (sc) y la administración intraperitoneal (ip) de 0,3 mg/kg o 1,0 mg/kg del MoAb anti-MASP-2 de ratón (isotipo de anticuerpo completo IgG2a de ratón derivado de Fab2 Núm. 11).

La FIGURA 36 ilustra gráficamente el depósito de C4b específico de la vía de las lectinas, medido *ex vivo* en muestras de suero sin diluir tomadas de ratones (n = 3 ratones/grupo) en diferentes puntos temporales después de la administración subcutánea de 0,3 mg/kg o 1,0 mg/kg del MoAb anti-MASP-2 de ratón. Las muestras de suero de ratones recogidas antes de la dosificación de los anticuerpos sirvieron como controles negativos (actividad 100%), mientras que el suero complementado *in vitro* con 100 nM del mismo anticuerpo anti-MASP-2 de bloqueo se utilizó como control positivo (actividad de 0%).

Los resultados mostrados en la FIGURA 36 demuestran una inhibición rápida y completa del depósito de C4b después de la administración subcutánea de dosis de 1,0 mg/kg de MoAb anti-MASP-2 de ratón. Se observó una inhibición parcial del depósito de C4b después de la administración subcutánea de dosis de 0,3 mg/kg de MoAb anti-MASP-2 de ratón.

Se siguió el curso temporal de la recuperación de la vía de las lectinas durante tres semanas después de una única administración ip de MoAb anti-MASP-2 de ratón a 0,6 mg/kg en ratones. Como se muestra en la FIGURA 37, se produjo una caída aguda de la actividad de la vía de las lectinas después de la dosificación del anticuerpo seguida de la completa inhibición de la vía de las lectinas que se prolongó durante aproximadamente 7 días después de la administración ip. Se observó la restauración lenta de la actividad de la vía de las lectinas a lo largo de la segunda y tercera semanas, con la completa restauración de la vía de las lectinas en los ratones 17 días después de la administración de MoAb anti-MASP-2.

Estos resultados demuestran que el MoAb anti-MASP-2 de ratón derivado del Fab2 Núm. 11 inhibe la vía de las lectinas de los ratones de una manera sensible a la dosis cuando se administra sistémicamente.

20 **EJEMPLO 39**

Este EJEMPLO describe el análisis de Moab anti-MASP-2 de ratón derivado de Fab2 Núm. 11 para determinar la eficacia en un modelo de ratón para la degeneración macular relacionada con la edad.

25 **Antecedentes/Fundamento:**

Como se ha descrito en el EJEMPLO 24, se utilizó proteína MASP-2 de rata para seleccionar una biblioteca de presentación de fagos de Fab, a partir de la cual se identificó Fab2 Núm. 11 como un anticuerpo funcionalmente activo. Se generaron anticuerpos completos de los isotipos IgG2c de rata e IgG2a de ratón a partir de Fab2 Núm. 11. El anticuerpo anti-MASP-2 completo del isotipo IgG2a de ratón se caracterizó por parámetros farmacodinámicos como se describe en el EJEMPLO 38. En este ejemplo, el anticuerpo anti-MASP-2 de ratón completo derivado de Fab2 Núm. 11 se analizó en el modelo de ratón de degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), descrito por P. S. Bora et al., *J Immunol* 174:491-497 (2005).

30 **Métodos:**

El isotipo de anticuerpo anti-MASP-2 completo IgG2a de ratón derivado del Fab2 Núm. 11 como se describe en el EJEMPLO 38, se sometió a ensayo en el modelo de ratón de degeneración macular relacionada con la edad

(DMRE) como se describe en el EJEMPLO 28 con las siguientes modificaciones.

Administración de los MoAb anti-MASP-2 de ratón

Se inyectaron dos dosis diferentes (0,3 mg/kg y 1,0 mg/kg) de MoAb anti-MASP-2 de ratón junto con un tratamiento con MoAb de control de isotipo ip en ratones WT (+/+) (n = 8 ratones por grupo) 16 horas antes de la inducción de la NVC

Inducción de neovascularización coroidea (NVC)

La inducción de neovascularización coroidea (NVC) y la medición del volumen de NVC se llevó a cabo utilizando la fotocoagulación con láser como se describe en el EJEMPLO 28.

Resultados:

La FIGURA 38 ilustra gráficamente el área de NVC medida a los 7 días de la lesión por láser en ratones tratados con MoAb de control de isotipo, o MoAb anti-MASP-2 de ratón (0,3 mg/kg y 1,0 mg/kg). Como se muestra en la FIGURA 38, en los ratones tratados previamente con 1,0 mg/kg de MoAb anti-MASP-2, se observó una reducción de aproximadamente 50% estadísticamente significativa ($p < 0,01$) en la NVC siete días después del tratamiento con láser. Como se muestra adicionalmente en la FIGURA 38, se observó que la dosis de 0,3 mg/kg de MoAb anti-MASP-2 no fue eficaz en la reducción de la NVC. Se observa que la dosis de 0,3 mg/kg de MoAb anti-MASP-2 ha demostrado tener una inhibición parcial y transitoria del depósito de C4b después de la administración subcutánea, como se describe en el EJEMPLO 38 y se muestra en la FIGURA 36.

Los resultados descritos en este EJEMPLO demuestran que el bloqueo de MASP-2 con un inhibidor, tal como MoAb anti-MASP-2, tiene un efecto preventivo y/o terapéutico en el tratamiento de la degeneración macular. Se observa que estos resultados son compatibles con los resultados observados en el estudio llevado a cabo en los ratones MASP-2 (-/-), descrito en el EJEMPLO 28, en el que se observó una reducción de 30% en la NVC 7 días después del tratamiento con láser en los ratones MASP-2 (-/-) en comparación con los ratones de control de tipo salvaje. Además, los resultados en este EJEMPLO demuestran adicionalmente que el anticuerpo anti-MASP-2 suministrado sistémicamente proporciona beneficio terapéutico local en el ojo, destacando así el potencial de una ruta sistémica de administración para el tratamiento de pacientes con DMRE. En resumen, estos resultados proporcionan evidencia que apoya el uso de MoAb contra MASP-2 en el tratamiento de la DMRE.

EJEMPLO 40

Este EJEMPLO demuestra que los ratones con deficiencia de MASP-2 están protegidos de la mortalidad inducida por *Neisseria meningitidis* después de la infección con *N. meningitidis* y tienen un aclaramiento mejorado de bacteriemia en comparación con los ratones de control de tipo salvaje.

Fundamento: *Neisseria meningitidis* es una bacteria diplocócica gram-negativa heterotrófica conocida por su papel en la meningitis y otras formas de enfermedad meningocócica como meningococemia. *N. meningitidis* es una causa importante de morbilidad y mortalidad en la infancia. Las complicaciones graves incluyen la septicemia, el síndrome de Waterhouse-Friderichsen, la insuficiencia suprarrenal y la coagulación intravascular diseminada (CID). Véase, p. ej., Rintala E. et al., *Critical Care Medicine* 28(7):2373-2378 (2000). En este ejemplo, el papel de la vía de las lectinas fue analizado en ratones MASP-2 (-/-) y WT (+/+) con el fin de abordar si los ratones con deficiencia de MASP-2 serían susceptibles de mortalidad inducida por *N. meningitidis*.

Métodos:

Se generaron ratones con el gen de MASP-2 desactivado ("KO") como se describe en el EJEMPLO 27. A ratones (n = 10) MASP-2 KO de 10 semanas de edad y a ratones (n = 10) C57/B6 de tipo salvaje se les inoculó mediante inyección intravenosa, una dosis de 5×10^8 ufc/100 μ l, 2×10^8 ufc/100 μ l o 3×10^7 ufc/100 μ l del serogrupo A Z2491 de *Neisseria meningitidis* en 400 mg/kg de hierro dextrano. La supervivencia de los ratones después de la infección se controló durante un período de tiempo de 72 horas. Se tomaron muestras de sangre de los ratones a intervalos de una hora después de la infección y se analizaron para determinar el nivel en suero (log ufc/ml) de *N. meningitidis* con el fin de verificar la infección y determinar la tasa de aclaramiento de las bacterias desde el suero.

Resultados:

La FIGURA 39A ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones MASP-2 KO y WT después de la administración de una dosis infecciosa de 5×10^8 ufc de *N. meningitidis*/100 μ l. Como se muestra en la FIGURA 39A, después de la infección con la dosis más alta de 5×10^8 ufc de *N. meningitidis*/100 μ l, 100% de los ratones MASP-2 KO sobrevivió a lo largo del período de 72 horas después de la infección. En contraste, sólo 20% de los ratones WT todavía estaban vivos 24 horas después de la infección. Estos resultados demuestran que los ratones con deficiencia de MASP-2 están protegidos de la mortalidad inducida por *N. meningitidis*.

La FIGURA 39B ilustra gráficamente el log de ufc/ml de *N. meningitidis* recuperado en diferentes puntos temporales en muestras de sangre tomadas de los ratones MASP-2 KO y WT infectados con 5×10^8 ufc de *N. meningitidis*/100

µl. Como se muestra en la FIGURA 39B, en los ratones WT el nivel de *N. meningitidis* en la sangre alcanzó un pico de aproximadamente 6,5 log ufc/ml a las 24 horas de la infección y cayó a cero 48 horas después de la infección. Por el contrario, en los ratones MASP-2 KO, el nivel de *N. meningitidis* alcanzó un pico de aproximadamente 3,5 log ufc/ml a las 6 horas después de la infección y cayó a cero 36 horas después de la infección.

5 La FIGURA 40A ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones MASP-2 KO y WT después de la infección con 2×10^8 ufc de *N. meningitidis*/100 µl. Como se muestra en la FIGURA 40A, después de la infección con 2×10^8 ufc de *N. meningitidis*/100 µl, 100% de los ratones MASP-2 KO sobrevivió a lo largo del período de 72 horas después de la infección. En contraste, sólo 80% de los ratones WT todavía estaban vivos 24 horas después de la infección. En consonancia con los resultados mostrados en la FIGURA 39A, estos resultados demuestran
10 adicionalmente que los ratones con deficiencia de MASP-2 están protegidos de la mortalidad inducida por *N. meningitidis*.

La FIGURA 40B ilustra gráficamente el log ufc/ml de *N. meningitidis* recuperado en diferentes puntos temporales en muestras de sangre tomadas de los ratones WT infectados con 2×10^8 ufc de *N. meningitidis*/100 µl. Como se muestra en la FIGURA 40B, el nivel de *N. meningitidis* en la sangre de los ratones WT infectados con 2×10^8 ufc alcanzó un máximo de aproximadamente 4 log ufc/ml a las 12 horas de la infección y cayó a cero 24 horas después de la infección. La FIGURA 40C ilustra gráficamente el log ufc/ml de *N. meningitidis* recuperado en diferentes puntos temporales en muestras de sangre tomadas de los ratones MASP-2 KO infectados con 2×10^8 ufc de *N. meningitidis*/100 µl. Como se muestra en la FIGURA 40C, el nivel de *N. meningitidis* en la sangre de ratones MASP-2 KO infectados con 2×10^8 ufc alcanzó un nivel máximo de aproximadamente 3,5 log ufc/ml a las 2 horas de la infección y cayó a cero a las 3 horas de la infección. En consonancia con los resultados mostrados en la FIGURA
15 39B, estos resultados demuestran que aunque los ratones MASP-2 KO fueron infectados con la misma dosis de *N. meningitidis* que los ratones WT, los ratones MASP-2 KO tienen un aclaramiento de bacteriemia mejorado en comparación con WT.
20

El porcentaje de supervivencia de los ratones MASP-2 KO y WT después de la infección con la dosis más baja de 3×10^7 ufc de *N. meningitidis*/100 µl fue de 100% en el período de tiempo 72 horas (datos no mostrados).
25

Discusión

Estos resultados muestran que los ratones con deficiencia de MASP-2 están protegidos de la mortalidad inducida por *N. meningitidis* y tienen un aclaramiento de bacteriemia mejorado en comparación con los ratones WT. Por lo tanto, en vista de estos resultados, se esperaría que la aplicación terapéutica de inhibidores de MASP-2, tales como MoAb contra MASP-2, fuera eficaz para tratar, prevenir o mitigar los efectos de la infección con bacterias *N. meningitidis* (es decir, sepsis y CID). Además, estos resultados indican que la aplicación terapéutica de los inhibidores de MASP-2, tales como MoAb contra MASP-2 no predispondría a un sujeto a un mayor riesgo de
30 contraer infecciones por *N. meningitidis*.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Omeros Corporation
Schwaeble, H.
5 Tedford, C.E.
Parent, J.B.
Dudler, T.
Demopolos, G.A.
- 10 <120> Métodos para el tratamiento de la coagulación intravascular diseminada mediante la inhibición de la activación del complemento dependiente de masp-2
- 15 <130> OMER-1-35668
<150> US 61/279,279
<151> 26-10-2009
- 20 <150> US 61/322,722
<151> 09-04-2010
<160> 65
- 25 <170> PatentIn versión 3.2
<210> 1
<211> 725
<212> ADN
<213> Homo sapien
- 30 <220>
<221> CDS
<222> (27)..(584)
- 35 <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

ES 2 617 920 T3

Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr
 110 115 120

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

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

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

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

tag cctcccctgg agctccggcc tgcccagcag gtcagaagcc agagccagcc 634

tgctggcctc agctccgggt tgggctgaga tggctgtgcc ccaactccca ttcaccacc 694

atggacccaa taataaacct ggccccaccc c 725

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

5

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 617 920 T3

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

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

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

Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
 180 185

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

10

<210> 4
 <211> 2460
 <212> ADN
 <213> Homo sapien

15

<220>
 <221> CDS

ES 2 617 920 T3

<222> (22)..(2082)

<400> 4

ggccagctgg acgggcacac c atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt ctg	51
Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu	
1 5 10	
tgt ggc tcg gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct gtg	99
Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val	
15 20 25	
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	
30 35 40	
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	
45 50 55	
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	
60 65 70	
gac ttc gtc aag ctg agc tcg ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg tgc	291
Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys	
75 80 85 90	
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	
95 100 105	
tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac tcc	387
Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser	
110 115 120	
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	
125 130 135	
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	
140 145 150	
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	
155 160 165 170	
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	
175 180 185	
cag gtc ttc acc cag agy 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	
190 195 200	

ES 2 617 920 T3

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	
205 210 215	
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	
220 225 230	
aca cac cct gaa acc ctg tgt ccc tac gac ttt ctc aag att caa aca	771
Thr His Pro Glu Thr Leu Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr	
235 240 245 250	
gac aga gaa gaa cat ggc cca ttc tgt ggg aag aca ttg ccc cac agg	819
Asp Arg Glu Glu His Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg	
255 260 265	
att gaa aca aaa agc aac acg gtg acc atc acc ttt gtc aca gat gaa	867
Ile Glu Thr Lys Ser Asn Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu	
270 275 280	
tca gga gac cac aca ggc tgg aag atc cac tac acg agc aca gcg cag	915
Ser Gly Asp His Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln	
285 290 295	
cct tgc cct tat ccg atg gcg cca cct aat ggc cac gtt tca cct gtg	963
Pro Cys Pro Tyr Pro Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val	
300 305 310	
caa gcc aaa tac atc ctg aaa gac agc ttc tcc atc ttt tgc gag act	1011
Gln Ala Lys Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr	
315 320 325 330	
ggc tat gag ctt ctg caa ggt cac ttg ccc ctg aaa tcc ttt act gca	1059
Gly Tyr Glu Leu Leu Gln Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala	
335 340 345	
gtt tgt cag aaa gat gga tct tgg gac cgg cca atg ccc gcg tgc agc	1107
Val Cys Gln Lys Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser	
350 355 360	
att gtt gac tgt ggc cct cct gat gat cta ccc agt ggc cga gtg gag	1155
Ile Val Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu	
365 370 375	
tac atc aca ggt cct gga gtg acc acc tac aaa gct gtg att cag tac	1203
Tyr Ile Thr Gly Pro Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr	
380 385 390	
agc tgt gaa gag acc ttc tac aca atg aaa gtg aat gat ggt aaa tat	1251
Ser Cys Glu Glu Thr Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr	
395 400 405 410	
gtg tgt gag gct gat gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa aaa tca	1299
Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser	
415 420 425	
ctc cca gtc tgt gag cct gtt tgt gga cta tca gcc cgc aca aca gga	1347
Leu Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly	
430 435 440	
ggg cgt ata tat gga ggg caa aag gca aaa cct ggt gat ttt cct tgg	1395
Gly Arg Ile Tyr Gly Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp	
445 450 455	
caa gtc ctg ata tta ggt gga acc aca gca gca ggt gca ctt tta tat	1443

ES 2 617 920 T3

Gln Val Leu Ile Leu Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr
460 465 470

gac aac tgg gtc cta aca gct gct cat gcc gtc tat gag caa aaa cat 1491
Asp Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His
475 480 485 490

gat gca tcc gcc ctg gac att cga atg ggc acc ctg aaa aga cta tca 1539
Asp Ala Ser Ala Leu Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser
495 500 505

cct cat tat aca caa gcc tgg tct gaa gct gtt ttt ata cat gaa ggt 1587
Pro His Tyr Thr Gln Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly
510 515 520

tat act cat gat gct ggc ttt gac aat gac ata gca ctg att aaa ttg 1635
Tyr Thr His Asp Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu
525 530 535

aat aac aaa gtt gta atc aat agc aac atc acg cct att tgt ctg cca 1683
Asn Asn Lys Val Val Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro
540 545 550

aga aaa gaa gct gaa tcc ttt atg agg aca gat gac att gga act gca 1731
Arg Lys Glu Ala Glu Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala
555 560 565 570

tct gga tgg gga tta acc caa agg ggt ttt ctt gct aga aat cta atg 1779
Ser Gly Trp Gly Leu Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met
575 580 585

tat gtc gac ata ccg att gtt gac cat caa aaa tgt act gct gca tat 1827
Tyr Val Asp Ile Pro Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr
590 595 600

gaa aag cca ccc tat cca agg gga agt gta act gct aac atg ctt tgt 1875
Glu Lys Pro Pro Tyr Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys
605 610 615

gct ggc tta gaa agt ggg ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga 1923
Ala Gly Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly
620 625 630

ggg gca ctg gtg ttt cta gat agt gaa aca gag agg tgg ttt gtg gga 1971
Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly
635 640 645 650

gga ata gtg tcc tgg ggt tcc atg aat tgt ggg gaa gca ggt cag tat 2019
Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr
655 660 665

gga gtc tac aca aaa gtt att aac tat att ccc tgg atc gag aac ata 2067
Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile
670 675 680

att agt gat ttt taa cttgcgtgct tgcagtcgaag gattcttcat ttttagaaat 2122
Ile Ser Asp Phe
685

gcctgtgaag accttggcag cgacgtggct cgagaagcat tcatcattac tgtggacatg 2182

gcagttgttg ctccacccaa aaaaacagac tccaggtgag gctgctgtca tttctccact 2242

tgccagttta attccagcct taccattga ctcaagggga cataaaccac gagagtgaca 2302

gtcatctttg cccaccagc gtaatgtcac tgctcaaatt acatttcatt accttaaaaa 2362

gccagtctct tttcatactg gctggtggca tttctgtaaa ctgcctgtcc atgctctttg 2422

tttttaaaact tgttcttatt gaaaaaaaa aaaaaaaaa 2460

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

ES 2 617 920 T3

<400> 5

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val
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

ES 2 617 920 T3

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 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

ES 2 617 920 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<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

10

ES 2 617 920 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 617 920 T3

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
 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
 385 390 395 400

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
 465 470 475 480

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

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

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

ES 2 617 920 T3

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

Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu
545 550 555 560

Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro
565 570 575

Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr
580 585 590

Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser
595 600 605

Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe
610 615 620

Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp
625 630 635 640

Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys
645 650 655

Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe
660 665 670

- <210> 7
- <211> 4900
- <212> ADN
- <213> Homo sapien

5

<400> 7
cctgtcctgc ctgcctggaa ctctgagcag gctggagtca tggagtcgat tcccagaatc 60
ccagagtcag ggaggctggg ggcaggggca ggtcactgga caaacagatc aaagtgaga 120
ccagcgtagg actgcagacc aggccaggcc agctggacgg gcacaccatg aggtaggtgg 180
gcgccacagc ctccctgcag ggtgtggggt gggagcacag gcctggcct caccgccct 240
gccctgccc taggctgctg accctcctgg gccttctgtg tggctcggtg gccacccct 300
taggcccga gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc atccccggc tttccagggg 360
agtatgcaa tgaccaggag cggcgtgga cctgactgc accccccggc taccgcctgc 420
gcctctactt caccacttc gacctggagc tctcccact ctgaggtac gacttcgtca 480
aggtgccgtc agacgggagg gctggggtt ctcagggctg gggggtccc aaggagtagc 540
cagggttcag ggacacctg gagcagggc caggcttggc caggaggag atcaggcctg 600
ggtcttgcct tcactccctg tgacacctga cccacagct gagctcgggg gccaaagtgc 660
tggccacgct gtgcgggag gagagcacag acacggagcg ggcccctggc aaggacactt 720

10

ES 2 617 920 T3

tctactcgcct gggctccagc ctggacatta ccttccgctc cgactactcc aacgagaagc 780
 cgttcacggg gttcagggcc ttctatgcag ccgaggggtga gccaaagagg gtccctgcaac 840
 atctcagttc gcgcagctgg ctgtggggtt aactctgtct taggccaggc agccctgcct 900
 tcagtttccc cacctttccc agggcagggg agaggcctct ggccctgacat catccacaat 960
 gcaaagacca aaacagccgt gacctccatt cacatgggct gagtgccaac tctgagccag 1020
 ggatctgagg acagcatcgc ctcaagtgac gcagggactg gccgggcccg gcagctcacg 1080
 cctgtaattc cagcactttg ggaggccgag gctggcttga taatttgagg gtcaggagtt 1140
 caaggccagc cagggcaaca cgggtgaaact ctatctccac taaaactaca aaaattagct 1200
 gggcgtgggt gtgcccacct ggaatcccag ctactagggg ggctgaggca ggagaattgc 1260
 ttgaacctgc gaggtggagg ctgcagtga cagagattgc accactacac tccacctggg 1320
 cgacagacta gactccgtct caaaaaaaca aaaacaaaaa ccacgcaggc ccgagggccc 1380
 attacaagc tgacaaagtg ggccctgcc a ggggagcgc tgcaggatgt ttgattttca 1440
 gatcccagtc cctgcagaga ccaactgtgt gacctctggc aagtggctca atttctctgc 1500
 tccttagaag ctgctgcaag ggttcagcgc tgtagccccg cccctgggt ttgattgact 1560
 cccctcatta gctgggtgac ctccggccga cactgaaact cccactggtt taacagaggt 1620
 gatgtttgca tctttctccc agcctgctg ggagcttga gcgaccctag gcctgtaagg 1680
 tgattggccc ggcaccagtc ccgcacccta gacaggacct aggcctcctc tgagggtccac 1740
 tctgaggtea tggatctcct gggagagatc caggctggat cccgcctctt tccctcctga 1800
 cggcctgcct ggcctgcct ctccccaga cattgacgag tgccaggtgg ccccgggaga 1860
 ggcgccacc tgccaccacc actgccacaa ccacctgggc ggttttctact gctcctgccg 1920
 cgcaggctac gtcctgcacc gtaacaagcg cacctgctca ggtgagggag gctgcctggg 1980
 ccccaacgca ccctctcctg ggatacccgg ggctcctcag ggccattgct gctctgccca 2040
 ggggtgcgga gggcctgggc ctggacactg ggtgcttcta ggccctgctg cctccagctc 2100
 ccctctcag ccctgcttcc cctctcagca gccaggctca tcagtgccac cctgccctag 2160
 cactgagact aattctaaca tcccactgtg tacctggttc cacctgggct ctgggaaccc 2220
 ctcatgtagc cacgggagag tgggggtatc tacctcgtt ccttggactg ggttcctggt 2280
 cctgcactg ggggacgggc cagtgetctg gggcgtgggc agccccacc tgtggcctg 2340
 accctgctcc cccgactcgg tttctcctct cggggtctct ccttgcctct ctgatctctc 2400
 ttccagagca gagcctctag cctcccctgg agctccggct gccagcagg tcagaagcca 2460
 gagccaggct gctggcctca gctccgggtt gggctgagat gctgtgcccc aactcccatt 2520
 caccacat ggacccaata ataaacctgg cccacccca cctgctgcog cgtgtctctg 2580
 ggggtgggagg gtcgggaggc ggtggggcgc gctcctctct gcctaccctc ctccagcct 2640

ES 2 617 920 T3

catgaacccc aggtctgtgg gaggctcctc catggggcca cacggctcctt ggctcacc 2700
 cctgttttga agatggggca ctgaggccgg agaggggtaa ggctcgcctc gagtccaggt 2760
 ccccagaggc tgagcccaga gtaatcttga accacccccca ttcagggtct ggctggagg 2820
 agcctgacct acagaggaga cacctggga gatattcatt gaggggtaat ctggtcccc 2880
 gcaaatccag gggatgattc cactgccccca taggcacagc cacgtggaag aaggcaggca 2940
 atgttggggc tcctcacttc ctagaggcct cacaactcaa atgccccca ctgcagctgg 3000
 ggggtgggtg gtggtatggg atggggacca agccttcctt gaaggataga gccagccca 3060
 acaccccggc ccgtggcagc agcatcacgt gttccagcga ggaaggagag caccagactc 3120
 agtcatgatc actgttgctt tgaacttcca agaacagccc cagggcaagg gtcaaaacag 3180
 gggaaagggg gtgatgagag atccttcttc cggatgttcc tccaggaacc agggggctgg 3240
 ctggtccttg ctgggttcgg gtaggagacc catgatgaat aaacttggga atcactgggg 3300
 tggctgtaag ggaatttagg ggagctccga aggggccctt aggctcagag agatgctcct 3360
 ctcttttccc gaattcccag ggaccacagga gagtgtccct tcttcctctt cctgtgtgtc 3420
 catccacccc cggccccgcg cctggcagag ctgggtggaac tcagtgtctc agccctacc 3480
 ctggggttgc gactctggct caggacacca ccacgctccc tgggggtgtg agtgagggcc 3540
 tgtgcctcc atccogagtg ctgctgttt cagctaaagc ctcaaagcaa gagaaacccc 3600
 ctctctaagc gggccctcag ccacgggtg ggtcgtttgg tttctgggta ggctcaggg 3660
 gctggccacc tgcagggccc agcccaaccc agggatgcag atgtcccagc cacatccctg 3720
 tcccagtttc ctgctcccca aggcacccac cctgctgttg gtgcgagggc tgatagaggg 3780
 cacgccaagt cactcccctg cccttccttc cttccagccc tgtgctccgg ccaggtcttc 3840
 acccagaggt ctggggagct cagcagccct gaataccac ggccgtatcc caaactctcc 3900
 agttgcactt acagcatcag cctggaggag gggttcagtg tcattctgga ctttgtggag 3960
 tccttcgatg tggagacaca ccctgaaacc ctgtgtccct acgactttct caaggtctgg 4020
 ctctggggc cctcatcttg tcccagatcc tccccctca gccagctgc accccctact 4080
 tcctgcagca tggccccac cacgttcccg tcaccctcgg tgaccccacc tcttcaggtg 4140
 ctctatggag gtcaaggctg gggcttcgag tacaagtgtg ggaggcagag tggggagggg 4200
 caccocaatc catggcctgg gttggcctca ttggctgtcc ctgaaatgct gaggaggtgg 4260
 gttacttccc tccgccaggg ccagaccag gcagctgtc cccagcttcc atgagcttct 4320
 ttctcagatt caaacagaca gagaagaaca tggccattc tgtgggaaga cattgcccc 4380
 caggattgaa acaaaaagca acacgggtgac catcaccttt gtcacagatg aatcaggaga 4440
 ccacacaggc tggagatcc actacagag cacagtgagc aagtgggctc agatccttgg 4500
 tggaaagcga gagctgcctc tctctggagt gcaaggagct gtagagtgta gggctcttct 4560
 gggcaggact aggaaggac accaggttta gtggtgctga ggtctgagc agcagcttct 4620
 aaggggaagc acccgtgcc tcctcagcag caccagcat cttcaccact cattcttcaa 4680
 ccaccattc acccatcact catcttttac ccaccaccc tttgccactc atccttctgt 4740
 ccctcatcct tccaaccatt catcaatcac ccaccatcc atcctttgcc acacaacct 4800
 ccaccattc ttctacctac ccctctatc catccatcct totatcagca tcctctacc 4860
 accatcctt cgttcgggtca tccatcatca tccatccatc 4900

ES 2 617 920 T3

<211> 136
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

5 <400> 8
 Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
 1 5 10 15
 Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
 20 25 30
 Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
 35 40 45
 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

10 <400> 9
 Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
 1 5 10 15

15

ES 2 617 920 T3

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
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

10

ES 2 617 920 T3

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

<210> 12
<211> 242
<212> PRT
<213> Homo sapien

5

<400> 12
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

10

ES 2 617 920 T3

	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>															
10	<223> Péptido sintético															
	<400> 13															
	Gly	Lys	Asp	Ser	Cys	Arg	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Ala	Leu	Val	Phe	Leu
	1				5					10					15	
	<210> 14															
15	<211> 15															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
	<220>															
20	<223> Péptido sintético															
	<400> 14															
	Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Val	Phe	Gly	Arg	Leu	
	1				5					10					15	
25	<210> 15															
	<211> 43															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
30	<220>															
	<223> Péptido sintético															
	<400> 15															
	Thr	Ala	Pro	Pro	Gly	Tyr	Arg	Leu	Arg	Leu	Tyr	Phe	Thr	His	Phe	Asp
	1				5					10					15	
35	<210> 16															
	<211> 8															
40	<212> PRT															
	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Cys	Gly	Gln					
			35					40								

<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

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

10 <210> 17
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <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

20 <210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Péptido sintético

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

30 <210> 19
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 19
Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys
40 1 5 10 15

Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val
20 25

45 <210> 20
<211> 960
<212> ADN
<213> Homo sapien

50 <220>
<221> CDS
<222> (51)..(797)

<400> 20

ES 2 617 920 T3

attaactgag	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						
5 10 15						
tac tca gaa act gtg acc tgt gag gat gcc caa aag acc tgc cct gca	152					
Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys Pro Ala						
20 25 30						
gtg att gcc tgt agc tct cca ggc atc aac ggc ttc cca ggc aaa gat	200					
Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly Lys Asp						
35 40 45 50						
ggg cgt gat ggc acc aag gga gaa aag ggg gaa cca ggc caa ggg ctc	248					
Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln Gly Leu						
55 60 65						
aga ggc tta cag ggc ccc cct gga aag ttg ggg cct cca gga aat cca	296					
Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly Asn Pro						
70 75 80						
ggg cct tct ggg tca cca gga cca aag ggc caa aaa gga gac cct gga	344					
Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp Pro Gly						
85 90 95						
aaa agt ccg gat ggt gat agt agc ctg gct gcc tca gaa aga aaa gct	392					
Lys Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg Lys Ala						
100 105 110						
ctg caa aca gaa atg gca cgt atc aaa aag tgg ctc acc ttc tct ctg	440					
Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe Ser Leu						
115 120 125 130						
ggc aaa caa gtt ggg aac aag ttc ttc ctg acc aat ggt gaa ata atg	488					
Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu Ile Met						
135 140 145						
acc ttt gaa aaa gtg aag gcc ttg tgt gtc aag ttc cag gcc tct gtg	536					
Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala Ser Val						
150 155 160						
gcc acc ccc agg aat gct gca gag aat gga gcc att cag aat ctc atc	584					
Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn Leu Ile						
165 170 175						

ES 2 617 920 T3

aag gag gaa gcc ttc ctg ggc atc act gat gag aag aca gaa ggg cag 632
 Lys Glu Glu Ala Phe Leu Gly Ile Thr Asp Glu Lys Thr Glu Gly Gln
 180 185 190

ttt gtg gat ctg aca gga aat aga ctg acc tac aca aac tgg aac gag 680
 Phe Val Asp Leu Thr Gly Asn Arg Leu Thr Tyr Thr Asn Trp Asn Glu
 195 200 205 210

ggg gaa ccc aac aat gct ggt tct gat gaa gat tgt gta ttg cta ctg 728
 Gly Glu Pro Asn Asn Ala Gly Ser Asp Glu Asp Cys Val Leu Leu Leu
 215 220 225

aaa aat ggc cag tgg aat gac gtc ccc tgc tcc acc tcc cat ctg gcc 776
 Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro Cys Ser Thr Ser His Leu Ala
 230 235 240

gtc tgt gag ttc cct atc tga agggatcatat cactcaggcc ctccctgtct 827
 Val Cys Glu Phe Pro Ile
 245

ttttactgca acccacaggc ccacagtatg cttgaaaaga taaattatat caatttcctc 887

atatccagta ttgttccttt tgtgggcaat cactaaaaat gatcactaac agcaccaaca 947

aagcaataat agt 960

<210> 21
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 21
 Met Ser Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ser Met Val Ala
 1 5 10 15

Ala Ser Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys
 20 25 30

Pro Ala Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly
 35 40 45

Lys Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln
 50 55 60

Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly
 65 70 75 80

Asn Pro Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp
 85 90 95

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

Lys Ala Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe
 115 120 125

5

10

ES 2 617 920 T3

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

<210> 22

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia consenso de péptido sintético

10

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (1)..(1)

<223> Donde X en la posición 1 representa hidroxiprolina

15

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (4)..(4)

<223> Donde X en la posición 4 representa residuo hidrofóbico

20

<400> 22

Xaa Gly Lys Xaa Gly Pro

1

5

<210> 23

25 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Péptido sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (1)..(1)

35 <223> Donde X representa hidroxiprolina

<400> 23

Xaa Gly Lys Leu Gly

1

5

5 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Péptido sintético

 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (9)..(15)
 <223> Donde X en la posición 9 y 15 representar hidroxiprolina

 <400> 24
 Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly Lys Leu Gly Pro Xaa Gly
 1 5 10 15

 20 <210> 25
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Péptido sintético

 30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(27)
 <223> Donde X en las posiciones 3, 6, 15, 21, 24, 27 representa hidroxiprolina

 <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

 35 <210> 26
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Péptido sintético

 45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (41)..(41)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <222> (50)..(50)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen 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

Asp Xaa Gly Lys Ser
50

10

<210> 27

<211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

20 <222> (3)..(33)

<223> Donde X en las posiciones: 3, 6, 12, 18, 21, 30, 33 representa hidroxiprolina

<400> 27

Gly Ala Xaa Gly Ser Xaa Gly Glu Lys Gly Ala Xaa Gly Pro Gln Gly
1 5 10 15

25

Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Lys Met Gly Pro Lys Gly Glu Xaa Gly Asp
20 25 30

Xaa

<210> 28

<211> 45

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

35

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (3)..(45)

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

40 <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

ES 2 617 920 T3

<210> 29
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <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
 10 20
 <210> 30
 <211> 559
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapien
 <400> 30
 atgaggctgc tgaccctcct gggccttctg tgtggctcgg tggccacccc ctggggcccg 60
 aagtggcctg aacctgtggt cgggcgcctg gcatcccccg gctttccagg ggagtatgcc 120
 aatgaccagg agcggcgctg gaccctgact gcaccccccg gctaccgcct gcgcctctac 180
 ttcacccact tcgacctgga gctctcccac ctctgcgagt acgacttcgt caagctgagc 240
 tcgggggcca aggtgctggc cacgctgtgc ggcaggaga gcacagacac ggagcgggcc 300
 cctggcaagg acactttcta ctgctgggc tccagcctgg acattacctt ccgctccgac 360
 tactccaacg agaagccgtt cacggggttc gaggccttct atgcagccga ggacattgac 420
 gagtgccagg tggccccggg agaggcggcc acctgcgacc accactgcca caaccacctg 480
 ggcggtttct actgctcctg ccgcgcaggc tacgtcctgc accgtaacaa gcgcacctgc 540
 20 tcagccctgt gctccggcc 559
 <210> 31
 <211> 34
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo sintético
 30 <400> 31
 cgggcacacc atgaggctgc tgaccctcct gggc 34
 <210> 32
 <211> 33
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo sintético
 40 <400> 32
 gacattacct tccgctccga ctccaacgag aag 33
 <210> 33
 <211> 33
 <212> ADN
 45

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo sintético
 5 <400> 33
 agcagccctg aataccacg gccgtatccc aaa 33
 <210> 34
 10 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligo sintético
 <400> 34
 cgggatccat gaggctgctg accctc 26
 <210> 35
 20 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Oligo sintético
 <400> 35
 30 ggaattccta ggctgcata 19
 <210> 36
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligo sintético
 <400> 36
 40 ggaattccta caggcgct 19
 <210> 37
 <211> 19
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo sintético
 50 <400> 37
 ggaattccta gtagtgat 19
 <210> 38
 55 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> Oligo sintético
 <400> 38
 tgccggcgcgct gtagtgctg tcttt 25
 <210> 39
 65 <211> 23

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligo sintético

 <400> 39
 ggaattcact cgttattctc gga 23

 10 <210> 40
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligo sintético

 <400> 40
 20 tccgagaata acgagtg 17

 <210> 41
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Oligo sintético

 <400> 41
 30 cattgaaagc ttggggtag aagttgttc 29

 <210> 42
 <211> 27
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligo sintético

 <400> 42
 40 cgcgcccgca gctgctcaga gtgtaga 27

 <210> 43
 <211> 28
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligo sintético
 50
 <400> 43
 cggtaaagctt cactggctca gggaaata 28

 <210> 44
 55 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <223> Oligo sintético

 <400> 44
 aagaagcttg ccgccacat ggattggctg tggaact 37

 65 <210> 45
 <211> 31

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 5 <223> Oligo sintético

<400> 45
 cgggatcctc aaactttctt gtccaccttg g 31

10 <210> 46
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligo sintético

<400> 46
 aagaaagctt gccgccacca tgttctcact agctct 36

20 <210> 47
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligo sintético

<400> 47
 30 cgggatcctt ctcctctaa cactct 26

<210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

40 <400> 48
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 1 5

<210> 49
 <211> 4960
 45 <212> ADN
 <213> Homo Sapien

<400> 49
 ccggacgtgg tggcgcgatgc ctgtaatccc agctactcgg gaggctgagg caggagaatt 60
 gctcgaaccc cggaggcaga ggtttggtgg ctcacacctg taatcccagc actttgcgag 120
 gctgaggcag gtgcatcgct ttggctcagg agttcaagac cagcctgggc aacacagggg 180
 gacccccatc tctacaaaaa acaaaaacaa atataaaggg gataaaaaaa aaaaaaagac 240
 aagacatgaa tccatgagga cagagtgtgg aagaggaagc agcagcctca aagttctgga 300
 agctggaaga acagataaac aggtgtgaaa taactgcctg gaaagcaact tctttttttt 360
 tttttttttt tttgaggtgg agtctcactc tgtcgtccag gctggagtgc agtggtgcca 420
 tctcggatca ctgcaacctc cgcctcccag gctcaagcaa ttctcctgcc tcagcctccc 480
 gagtagctgg gattataagt gcgcgctgcc acacctggat gatttttgta ttttagtag 540

ES 2 617 920 T3

agatgggatt tcaccatggt ggtcaggctg gtctcaaact cccaacctcg tgatccaccc 600
 accttggcct cccaaagtgc tgggattaca ggtataagcc accgagccca gccaaaagcg 660
 acttctaagc ctgcaaggga atcgggaatt ggtggcacca ggtccttctg acagggttta 720
 agaaattagc cagcctgagg ctgggcacgg tggctcacac ctgtaatccc agcacttttg 780
 gaggctaagg caggtggatc acctgagggc aggagttaa gaccagcctg accaacatgg 840
 agaaacccca tccctaccaa aaataaaaaa ttagccaggt gtggtggtgc tcgcctgtaa 900
 tcccagctac 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 tggagtcatg 1140
 gagtcgattc ccagaatccc agagtcaggg aggctggggg caggggcagg tcaactggaca 1200
 aacagatcaa aggtgagacc agcgtagggc tgcagaccag gccaggccag ctggacgggc 1260
 acaccatgag gtaggtgggc gccacagcc tccctgcagg gtgtgggggt ggagcacag 1320
 cctgggccct caccgccctt gccctgccc a taggtctgtg accctcctgg gccttctgtg 1380
 tggctcgggt gccaccccct tggggccgaa gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc 1440
 atccccggc tttccagggg agtatgcaa tgaccaggag cggcgctgga cctgactgc 1500
 accccccggc taccgcctgc gcctctactt caccacttc gaacctggag tctccacct 1560
 ctgcgagtac gacttcgtca aggtgcctc aggacgggag ggtgggggtt tctcagggtc 1620
 ggggggtccc caaggagtag ccagggttca gggacacctg ggagcagggg ccaggcttgg 1680
 ccaggagggg gatcaggcct gggctctgcc ttcactcct gtgacacctg accccacagc 1740
 tgagctcggg ggccaagggt ctggccacgc tgtgcgggca ggagagcaca gacacggagc 1800
 gggcccctgg caaggacact ttctactcgc tgggctccag cctggacatt accttccgct 1860
 ccgactactc caacgagaag cgtttcacgg ggttcgaggc cttctatgca gccgaggggt 1920
 agccaagagg ggtcctgcaa catctcagtc tgcgcagctg gctgtggggg taactctgtc 1980
 ttaggccagg cagccctgcc ttcagtttcc ccaccttcc cagggcaggg gagaggcctc 2040
 tggcctgaca tcatccacaa tgcaaagacc aaaacagccg tgacctccat tcaatgggc 2100
 tgagtccaa ctctgagcca gggatctgag gacagcatcg cctcaagtga cgcagggact 2160
 ggcggggcgc agcagctcac gcctgtaatt ccagcacttt gggaggcoga ggctggctga 2220
 tcatttgagg tcaggagttc aaggccagcc agggcaacac ggtgaaactc tatctccact 2280
 aaaactacaa aaattagctg ggcgtggtgg tgcgcacctg gaatcccagc tactagggag 2340
 gctgaggcag gagaattgct tgaacctgcg aggtggaggc tgcagtgaac agagattgca 2400
 ccactacact ccagcctggg cgacagagct agactccgtc tcaaaaaaca aaaaacaaaa 2460

ES 2 617 920 T3

acgacgcagg gcccgagggc cccatttaca gctgacaaaag tggggccctg ccagcgggag 2520
 cgctgccagg atgtttgatt tcagatccca gtccctgcag agaccaactg tgtgacctct 2580
 ggcaagtggc tcaatttctc tgctccttag gaagctgctg caagggttca gcgctgtagc 2640
 cccgccccct gggtttgatt gactcccctc attagctggg tgacctcggg ccggacactg 2700
 aaactcccac tggtttaaca gaggtgatgt ttgcatcttt ctcccagcgc tgctgggagc 2760
 ttgcagcgac cctaggcctg taaggtgatt ggcccggcac cagtcccgc aacctagacag 2820
 gacgaggcct cctctgaggt ccactctgag gtcatggatc tcctgggagg agtccaggct 2880
 ggatcccgcc tctttccctc ctgacggcct gcctggccct gcctctcccc cagacattga 2940
 cgagtgccag gtggccccgg gagaggcgcc cacctgcgac caccactgcc acaaccaact 3000
 gggcggtttc tactgctcct gccgcgcagg ctacgtcctg caccgtaaca agcgcacctg 3060
 ctgagccctg tgctccggcc aggtcttcac ccagaggtct ggggagctca gcagccctga 3120
 ataccacagg ccgtatccca aactctccag ttgcaactac agcatcagcc tggaggaggg 3180
 gttcagtgtc attctggact ttgtggagtc ctto gatgtg gagacacacc ctgaaacct 3240
 gtgtccctac gactttctca agattcaaac agacagagaa gaacatggcc cattctgtgg 3300
 gaagacattg cccacagga ttgaaacaaa aagcaacacg gtgaccatca cctttgtcac 3360
 agatgaatca ggagaccaca caggctgaa gatccactac acgagcacag cgcacgcttg 3420
 cccttatccg atggcgccac ctaatggcca cgtttcacct gtgcaagcca aatacatcct 3480
 gaaagacagc ttctccatct tttgcgagac tggctatgag cttctgcaag gtcacttgcc 3540
 cctgaaatcc tttactgcag tttgtcagaa agatggatct tgggaccggc caatgcccgc 3600
 gtgcagcatt gttgactgtg gccctcctga tgatctacct agtggccgag tggagtacat 3660
 cacaggtcct ggagtgacca cctacaaaagc tgtgattcag tacagctgtg aagagacctt 3720
 ctacacaatg aaagtgaatg atggtaaata tgtgtgtgag gctgatggat tctggacgag 3780
 ctccaaagga gaaaaatcac tcccagtctg tgagcctggt tgtggactat cagcccgcac 3840
 aacaggaggg cgtatatatg gagggcaaaa ggcaaaaacct ggtgatthtc cttggcaagt 3900
 cctgatatta ggtggaacca cagcagcagg tgcacttta tatgacaact gggtcctaac 3960
 agctgctcat gccgtctatg agcaaaaaa tgatgcatcc gcctggaca ttcgaatggg 4020
 caccctgaaa agactatcac ctcaattatac acaagcctgg tctgaagctg tttttataca 4080
 tgaaggttat actcatgatg ctggctttga caatgacata gcaactgatta aattgaataa 4140
 caaagttgta atcaatagca acatcacgcc tatttgtctg ccaagaaaag aagctgaatc 4200
 ctttatgagg acagatgaca ttggaactgc atctggatgg ggattaacct aaaggggttt 4260
 tcttgctaga aatctaattg atgtcgacat accgattggt gaccatcaaa aatgtactgc 4320
 tgcatatgaa aagccaccct atccaagggg aagtgtaact gctaacatgc tttgtgctgg 4380
 cttagaaagt gggggcaagg acagctgcag aggtgacagc ggaggggcac tgggttttct 4440

ES 2 617 920 T3

```

agatagtgaa acagagaggt ggtttgtggg aggaatagtg tcctgggggtt ccatgaattg 4500
tggggaagca ggtcagtatg gagtctacac aaaagttatt aactatattc cctggatcga 4560
gaacataatt agtgatTTTT aacttgctgtg tctgcagtca aggattcttc atttttagaa 4620
atgcctgtga agaccttggc agcgacgtgg ctcgagaagc attcatcatt actgtggaca 4680
tggcagttgt tgctccaccc aaaaaaacag actccagggtg aggctgctgt catttctcca 4740
cttgccagtt taattccagc cttaccatt gactcaaggg gacataaac acgagagtga 4800
cagtcattctt tgcccaccca gtgtaatgtc actgctcaaa ttacatttca ttacctaaa 4860
aagccagtct cttttcatac tggctgttgg catttctgta aactgectgt ccatgctctt 4920
tgTTTTTaaa cttgttctta ttgaaaaaaa aaaaaaaaaa 4960

```

<210> 50
 <211> 2090
 <212> ADN
 <213> MASP-2 CDS murina

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (33)..(2090)

10

```

<400> 50
ggcgtggac tgcagagcta tggTggcaca cc atg agg cta ctc atc ttc ctg 53
                               Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu
                               1                               5

ggt ctg ctg tgg agt ttg gtg gcc aca ctt ctg ggt tca aag tgg cct 101
Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro
    10                               15                               20

gaa cct gta ttc ggg cgc ctg gtg tcc cct ggc ttc cca gag aag tat 149
Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr
    25                               30                               35

gct gac cat caa gat cga tcc tgg aca ctg act gca ccc cct ggc tac 197
Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr
    40                               45                               50                               55

cgc ctg cgc ctc tac ttc acc cac ttt gac ctg gaa ctc tct tac cgc 245
Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser Tyr Arg
    60                               65                               70

tgc gag tat gac ttt gtc aag ttg agc tca ggg acc aag gtg ctg gcc 293
Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala
    75                               80                               85

aca ctg tgt ggg cag gag agt aca gac act gag cag gca cct ggc aat 341
Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn
    90                               95                               100

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

```

ES 2 617 920 T3

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 ctt							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 ggc 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	
act gac gag tgg ggg aac cac aca ggc tgg aag ata cac tac aca agc							917
Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser							
		280		285		290	295
aca gca cgg ccc tgc cct gat cca acg gcg cca cct aat ggc agc att							965
Thr Ala Arg Pro Cys Pro Asp Pro Thr Ala Pro Pro Asn Gly Ser Ile							
		300		305		310	
tca cct gtg caa gcc acg tat gtc ctg aag gac agg ttt tct gtc ttc							1013
Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe							
		315		320		325	
tgc aag aca ggc ttc gag ctt ctg caa ggt tct gtc ccc ctg aaa tca							1061
Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser							
		330		335		340	
ttc act gct gtc tgt cag aaa gat gga tct tgg gac cgg ccg atg cca							1109
Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro							
		345		350		355	
gag tgc agc att att gat tgt ggc cct ccc gat gac cta ccc aat ggc							1157
Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly							
		360		365		370	375
cat gtg gac tat atc aca ggc cct caa gtg act acc tac aaa gct gtg							1205
His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Gln Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val							
		380		385		390	

ES 2 617 920 T3

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 Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile Asn Gly Ser Ile Met Pro Val 540 545 550	1685
tgc cta ccg cga aaa gaa gct gca tcc tta atg aga aca gac ttc act Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr 555 560 565	1733
gga act gtg gct ggc tgg ggg tta acc cag aag ggg ctt ctt gct aga Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg 570 575 580	1781
aac cta atg ttt gtg gac ata cca att gct gac cac caa aaa tgt acc Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile Ala Asp His Gln Lys Cys Thr 585 590 595	1829
acc gtg tat gaa aag ctc tat cca gga gta aga gta agc gct aac atg Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro Gly Val Arg Val Ser Ala Asn Met 600 605 610 615	1877
ctc tgt gct ggc tta gag act ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp 620 625 630	1925
agt ggg ggg gca tta gtg ttt cta gat aat gag aca cag cga tgg ttt Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe 635 640 645	1973
gtg gga gga ata gtt tcc tgg ggt tcc att aat tgt ggg gcg gca ggc Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly 650 655 660	2021
cag tat ggg gtc tac aca aaa gtc atc aac tat att ccc tgg aat gag Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu 665 670 675	2069
aac ata ata agt aat ttc taa Asn Ile Ile Ser Asn Phe 680 685	2090

ES 2 617 920 T3

<210> 51

<211> 685

<212> PRT

5 <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

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

ES 2 617 920 T3

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

ES 2 617 920 T3

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

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 madura murina MASP-2

<400> 52

ES 2 617 920 T3

Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val
 1 5 10 15
 Ser Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp
 20 25 30
 Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His
 35 40 45
 Phe Asp Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr
 65 70 75 80
 Asp Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro
 85 90 95
 Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
 100 105 110
 Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg
 115 120 125
 Val Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr
 130 135 140
 Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln
 145 150 155 160
 Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly
 165 170 175
 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

ES 2 617 920 T3

	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
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
Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro	405		410		415
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
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

ES 2 617 920 T3

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 rata

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

<400> 53
 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

ES 2 617 920 T3

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
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

ES 2 617 920 T3

Pro Thr Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr	
305	310 315
gtc ctg aag gac agc ttt tct gtc ttc tgc aag act ggc ttc gag ctt	1011
Val Leu Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu	
320	325 330
ctg caa ggt tct gtc ccc ctg aag tca ttc act gct gtc tgt cag aaa	1059
Leu Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys	
335	340 345 350
gat gga tct tgg gac cgg ccg ata cca gag tgc agc att att gac tgt	1107
Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys	
	355 360 365
ggc cct ccc gat gac cta ccc aat ggc cac gtg gac tat atc aca ggc	1155
Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly	
	370 375 380
cct gaa gtg acc acc tac aaa gct gtg att cag tac agc tgt gaa gag	1203
Pro Glu Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu	
	385 390 395
act ttc tac aca atg agc agc aat ggt aaa tat gtg tgt gag gct gat	1251
Thr Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp	
	400 405 410
gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa aaa tcc ctc ccg gtt tgc aag	1299
Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Lys	
	415 420 425 430
cct gtc tgt gga ctg tcc aca cac act tca gga ggc cgt ata att gga	1347
Pro Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly	
	435 440 445
gga cag cct gca aag cct ggt gac ttt cct tgg caa gtc ttg tta ctg	1395
Gly Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu	
	450 455 460
ggt gaa act aca gca gca ggt gct ctt ata cat gac gac tgg gtc cta	1443
Gly Glu Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu	
	465 470 475
aca gcg gct cat gct gta tat ggg aaa aca gag gcg atg tcc tcc ctg	1491
Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu	
	480 485 490
gac atc cgc atg ggc atc ctc aaa agg ctc tcc ctc att tac act caa	1539
Asp Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln	
	495 500 505 510
gcc tgg cca gag gct gtc ttt atc cat gaa ggc tac act cac gga gct	1587
Ala Trp Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala	
	515 520 525
ggt ttt gac aat gat ata gca ctg att aaa ctc aag aac aaa gtc aca	1635
Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr	
	530 535 540
atc aac aga aac atc atg ccg att tgt cta cca aga aaa gaa gct gca	1683
Ile Asn Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala	
	545 550 555
tcc tta atg aaa aca gac ttc gtt gga act gtg gct ggc tgg ggg tta	1731
Ser Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu	

ES 2 617 920 T3

```

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

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

ggg 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

ggg 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

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
 <212> PRT
 <213> MASP-2 CDS rata

5

```

<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

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

```

10

ES 2 617 920 T3

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

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

ES 2 617 920 T3

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 madura de rata MASP-2

<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

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

5

10

ES 2 617 920 T3

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

<210> 56

<211> 28

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR MASP-2 Homo Sapien

10

<400> 56

atgaggctgc tgacctctct gggccttc 28

<210> 57

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de PCR MASP-2 Homo Sapien
 <400> 57
 gtgccctcc tgcgtcacct ctg 23
 10 <210> 58
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de PCR MASP-2 Homo Sapien
 <400> 58
 20 cagaggtgac gcaggagggg cac 23
 <210> 59
 <211> 27
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR MASP-2 Homo Sapien
 30 <400> 59
 ttaaaatcac taattatggt ctcgatc 27
 <210> 60
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR MASP-2 Murino
 40 <400> 60
 atgaggctac tcatcttctct gg 22
 <210> 61
 45 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Cebador de PCR MASP-2 Murino
 <400> 61
 ctgcagaggt gacgcagggg ggg 23
 55 <210> 62
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador de PCR MASP-2 Murino
 <400> 62
 65 cccccctgc gtcacctctg cag 23
 <210> 63

ES 2 617 920 T3

<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Cebador de PCR MASP-2 Murino

<400> 63
ttagaaatta cttattatgt tctcaatcc 29

10 <210> 64
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Oligonucleótido de rata MASP-2

<400> 64
20 gaggtgacgc aggaggggca ttagtgttt 29

<210> 65
<211> 37
<212> ADN
25 <213> Secuencia Artificial

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

30 <400> 65
ctagaaacac taatgccct cctgcgtcac ctctgca 37

35

REIVINDICACIONES

1. Un agente inhibidor de MASP-2 que es un anticuerpo contra MASP-2 o fragmento del mismo que se une a una porción del SEQ ID NO:6 para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece, o tiene riesgo de desarrollar, coagulación intravascular diseminada.
- 5 2. El agente de acuerdo con la reivindicación 1 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente inhibidor de MASP-2 se une específicamente al SEQ ID NO: 6 con una afinidad al menos 10 veces mayor de aquella con la que se une a un antígeno diferente en el sistema del complemento.
3. El agente de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-MASP-2 o fragmento del mismo es monoclonal, o un anticuerpo recombinante, o es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano, o en donde el anticuerpo tiene una función efectora reducida.
- 10 4. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición se formula en una forma de dosificación de acción rápida para el suministro sistémico.
5. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la coagulación intravascular diseminada es secundaria a sepsis, trauma, infección, cáncer, complicaciones obstétricas, enfermedad hepática, reacción tóxica severa, choque, golpe de calor, rechazo de trasplante, reacción a transfusión, cirugía, aneurisma vascular, insuficiencia hepática, tratamiento de cáncer mediante quimioterapia o terapia de radiación, quemadura, o exposición a radiación accidental.
- 15 6. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la infección es una infección bacteriana.
- 20 7. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la composición no aumenta la susceptibilidad del sujeto a la infección por *Neisseria meningitidis*.
8. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el trauma es un trauma neurológico.
9. El agente de acuerdo con la reivindicación 1 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto exhibe al menos uno de los siguientes (i) activación de C3 del complemento por encima de 30% de la reserva vascular, (ii) disminución o conversión del nivel de C5, (iii) vasodilatación, y/o (iv) pérdida de fluido en los tejidos.
- 25 10. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece, o tiene riesgo de desarrollar coagulación intravascular diseminada, en donde la composición comprende un agente inhibidor de MASP-2 que es un anticuerpo contra MASP-2 o fragmento del mismo que se une a una porción del SEQ ID NO:6 y un portador farmacéuticamente aceptable en donde la composición se formula en una forma de dosificación de acción rápida para su suministro sistémico.
- 30

Vía de las Lectinas

Vía Clásica

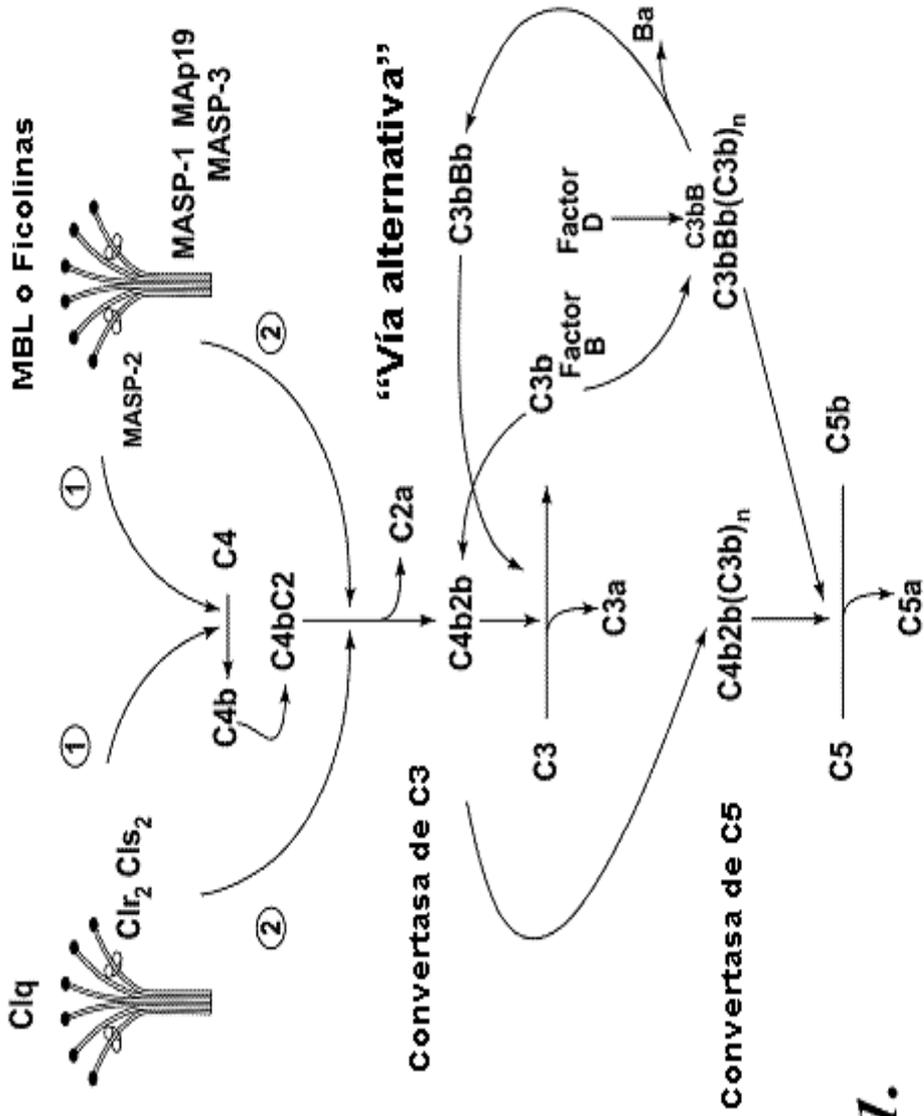


Fig.1.

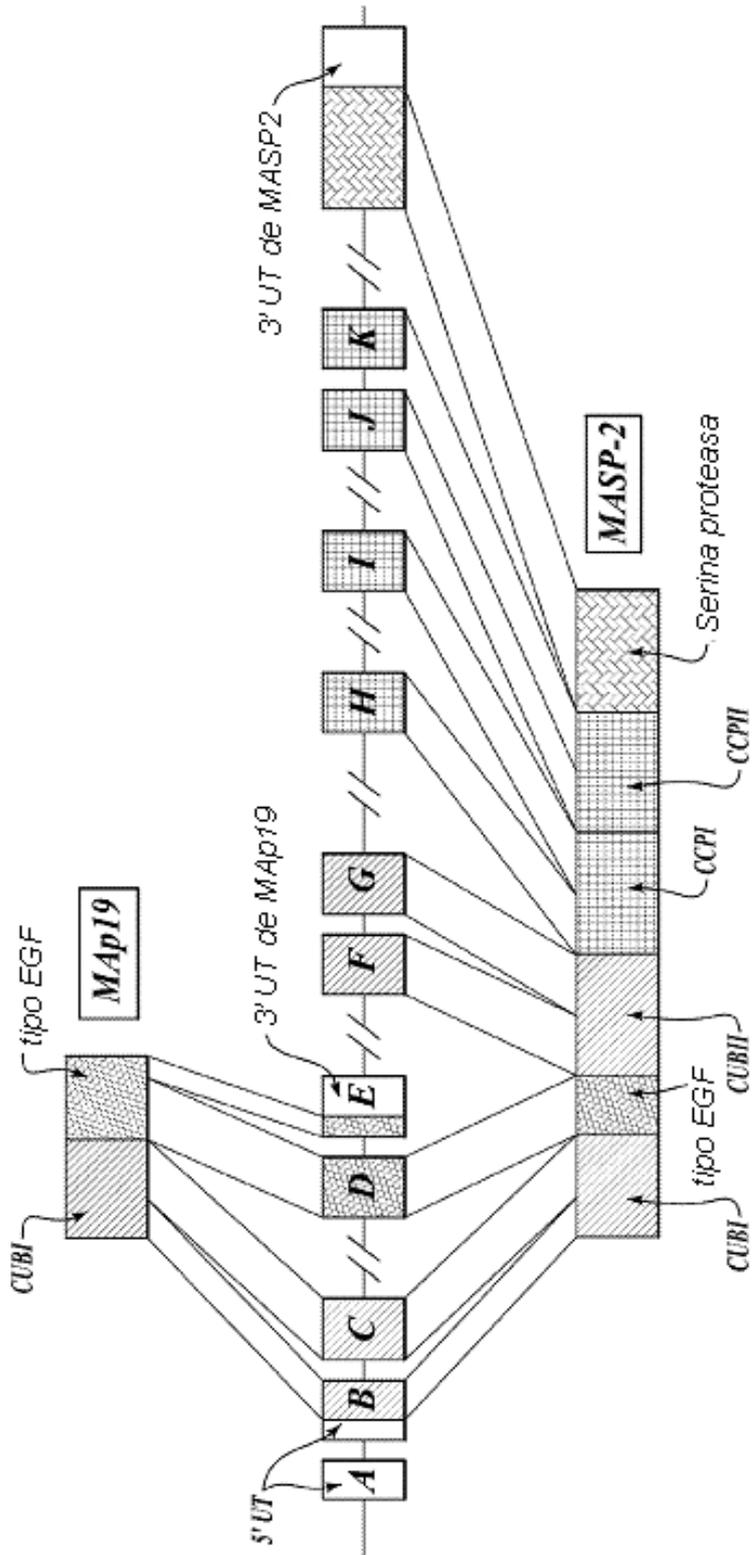


Fig. 2.

Clr/Clr/MASP-1/MASP-2/MASP-3

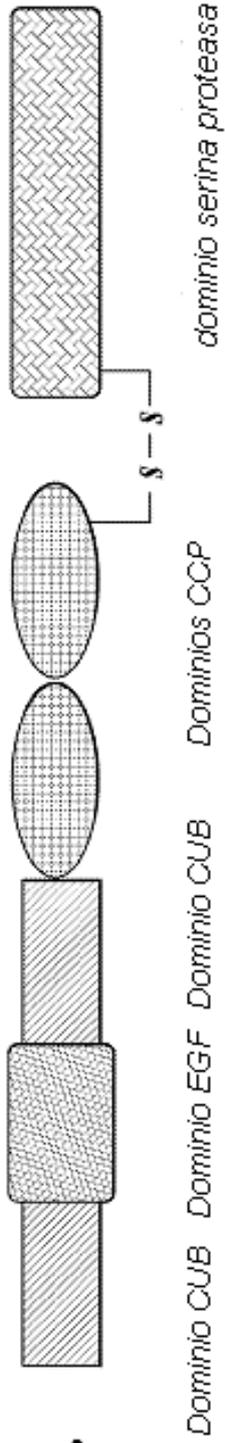
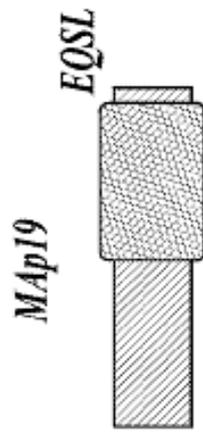


Fig.3A.



Dominio CUB Dominio EGF

Fig.3B.

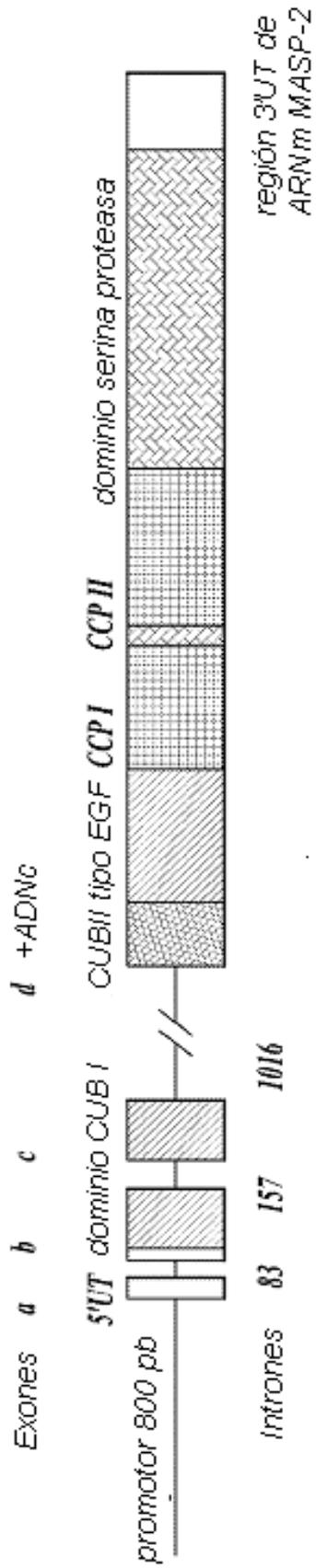


Fig.5.

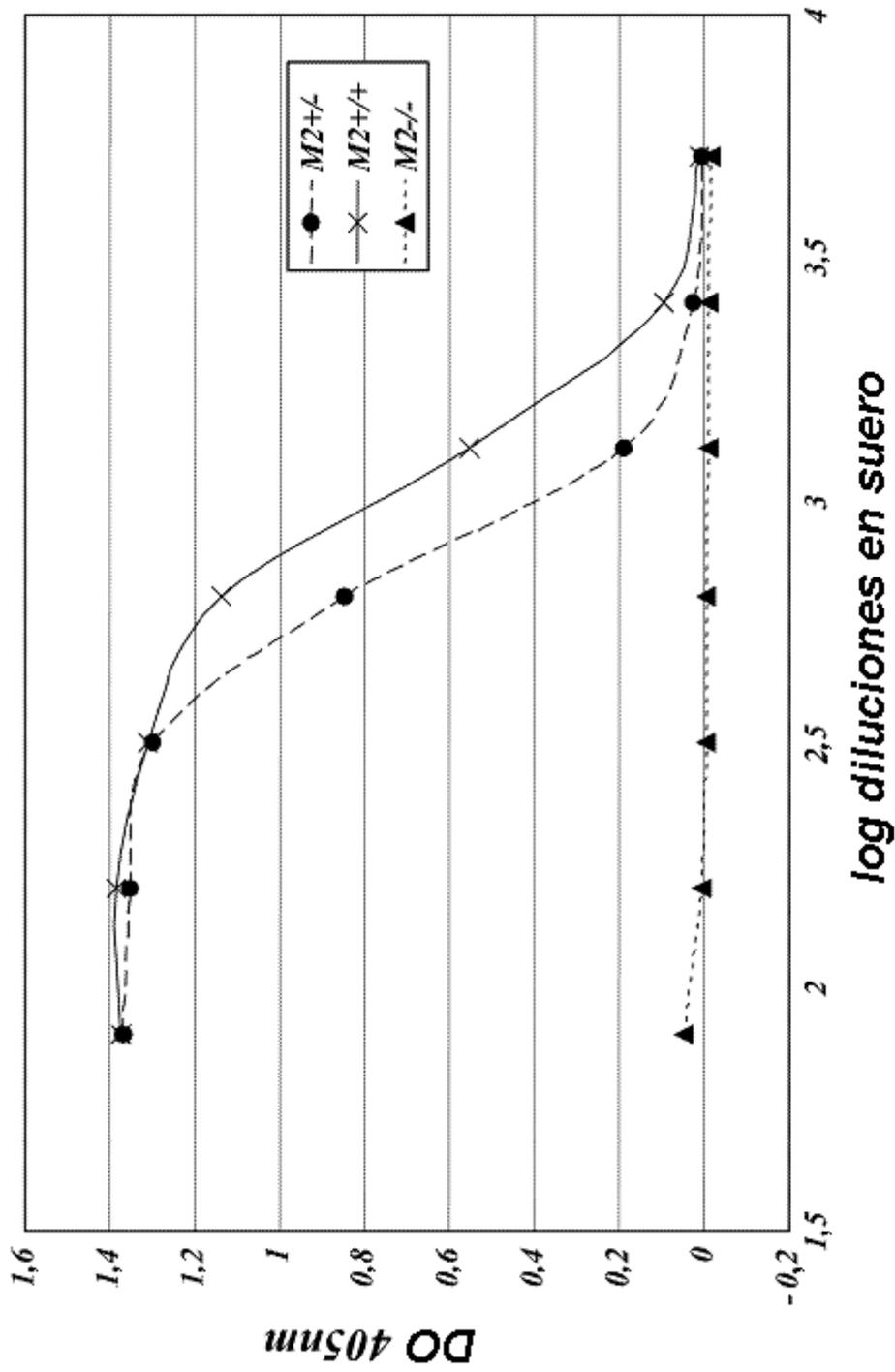


Fig. 6A.

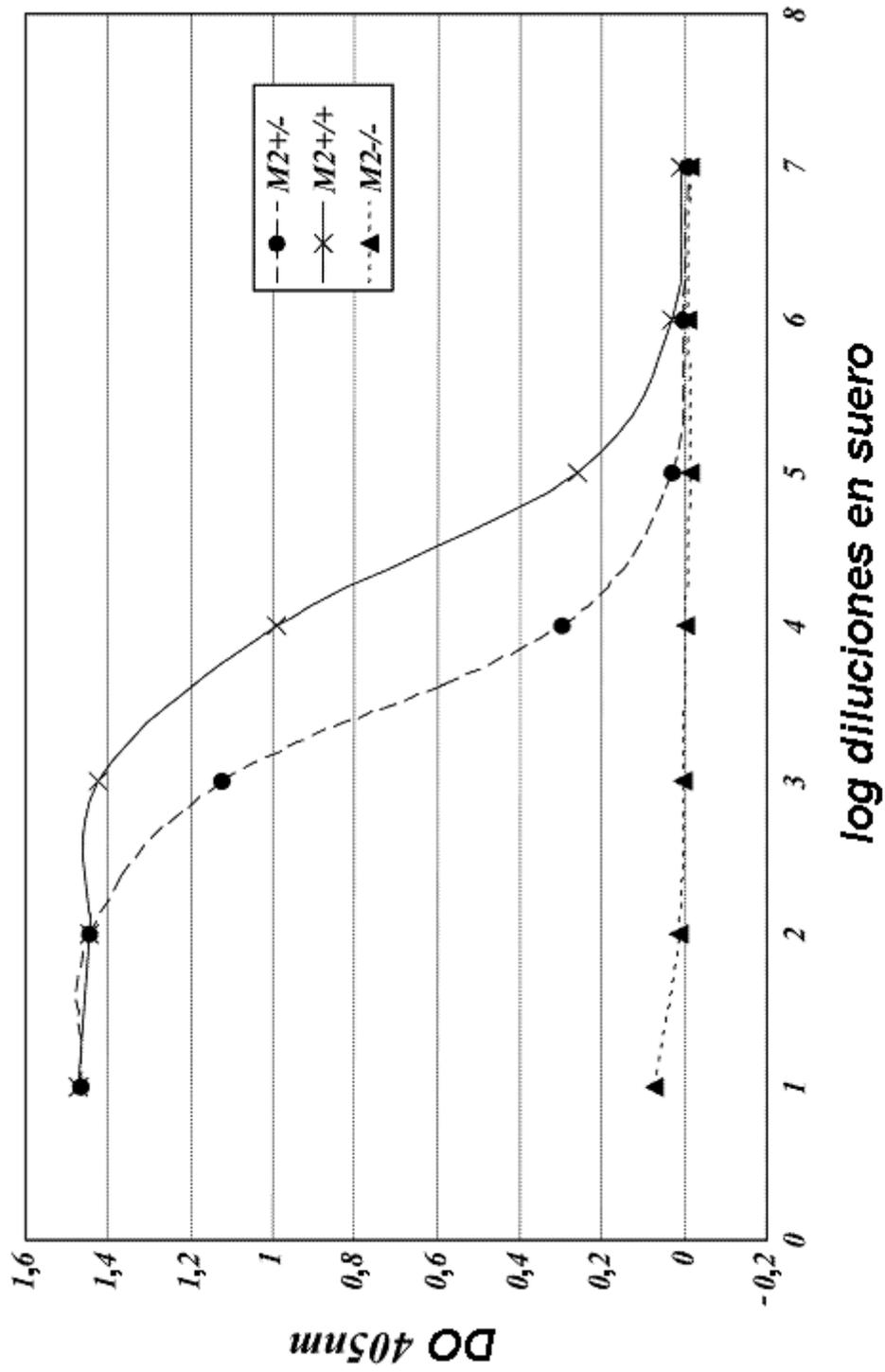


Fig.6B.

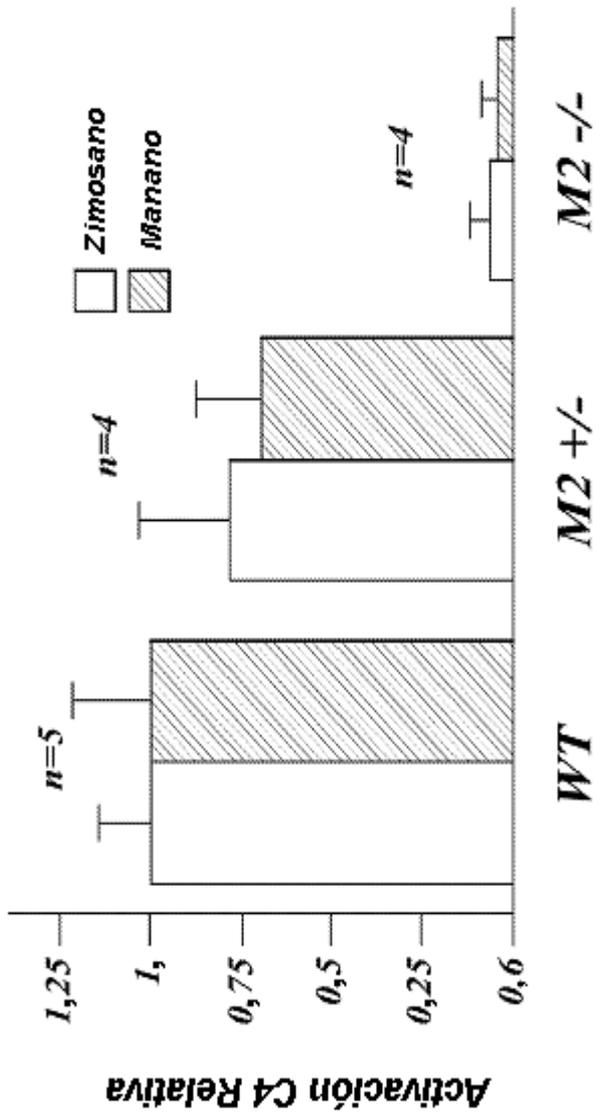


Fig. 6C.

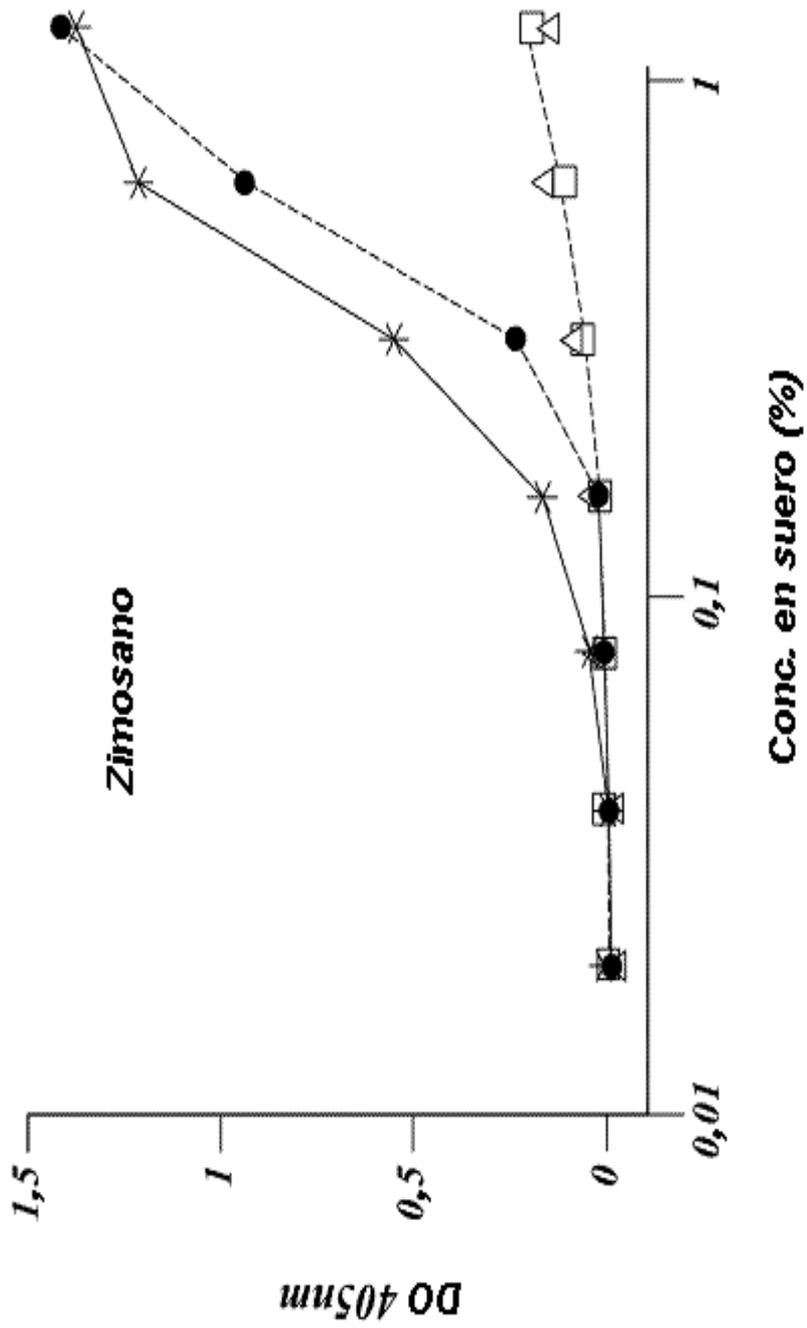


Fig. 7B.

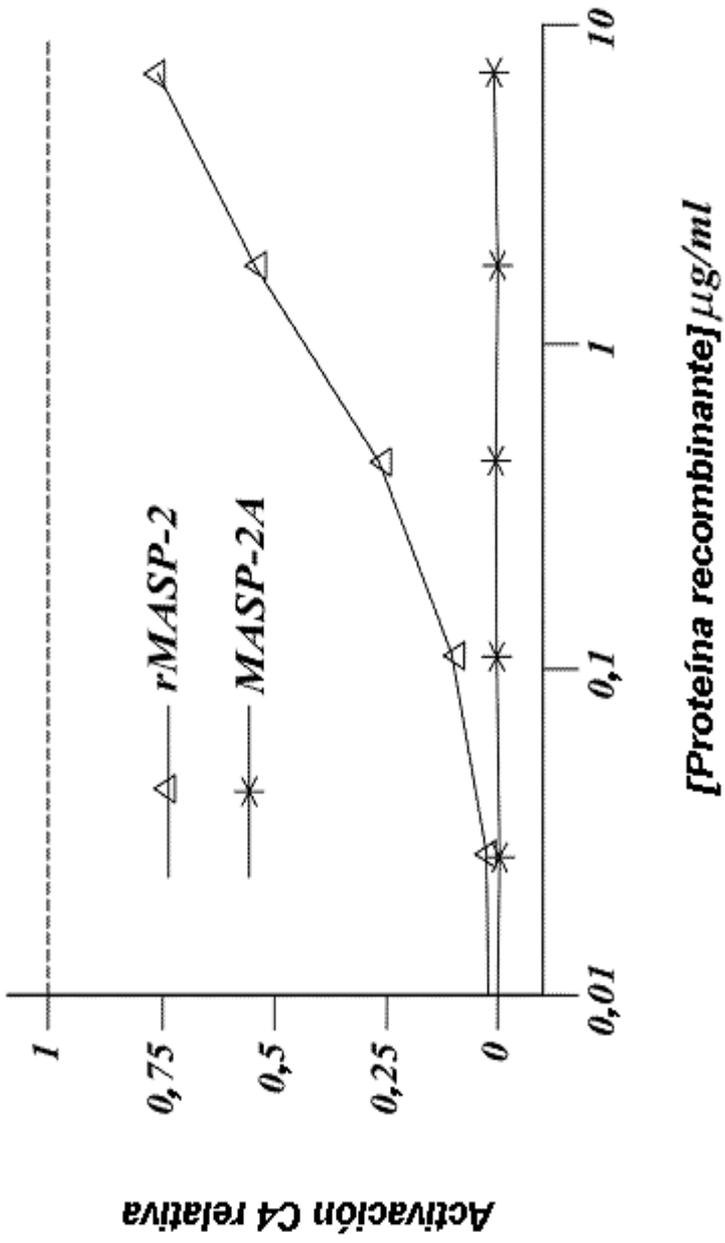


Fig. 8.

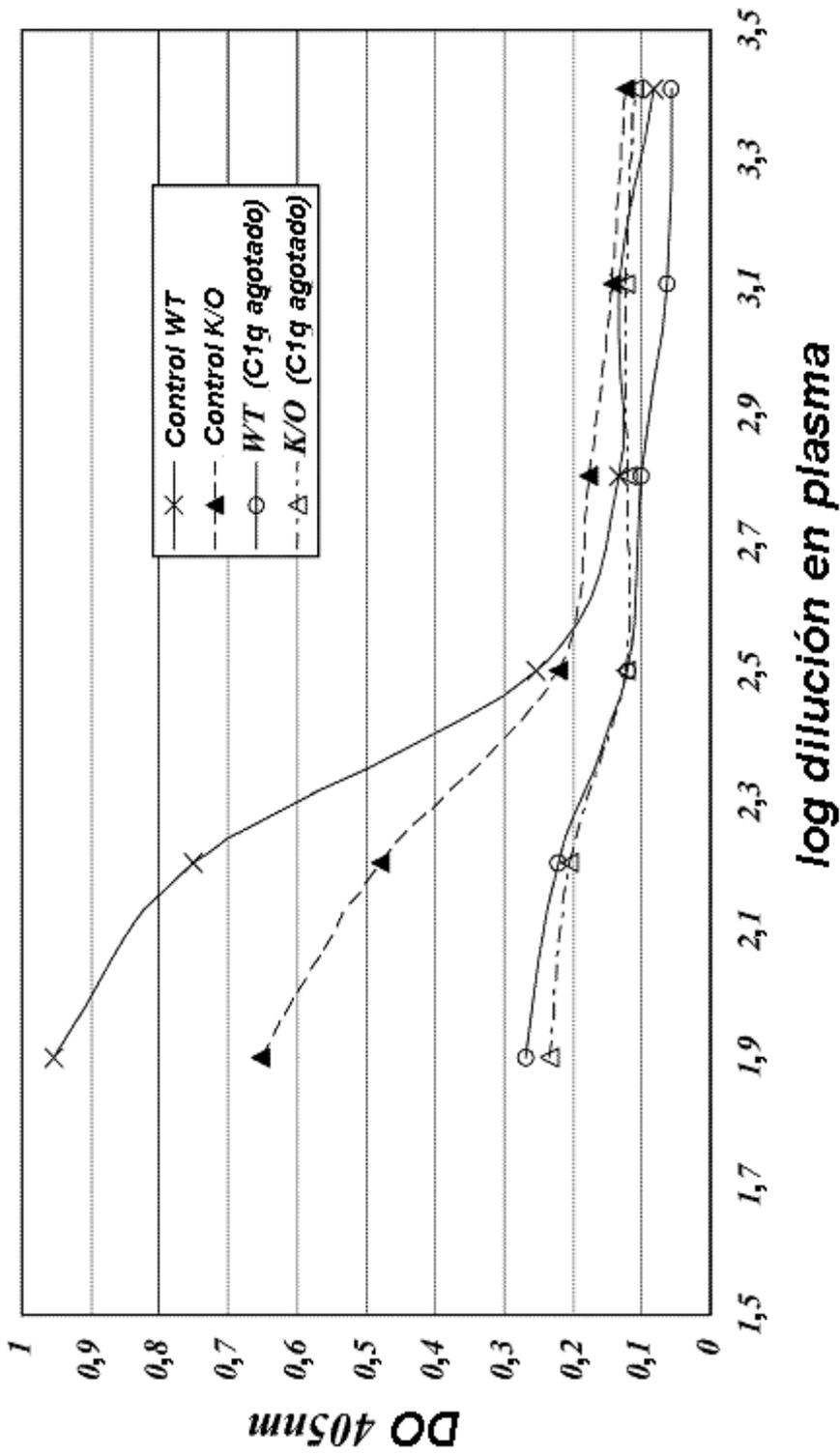


Fig. 9.

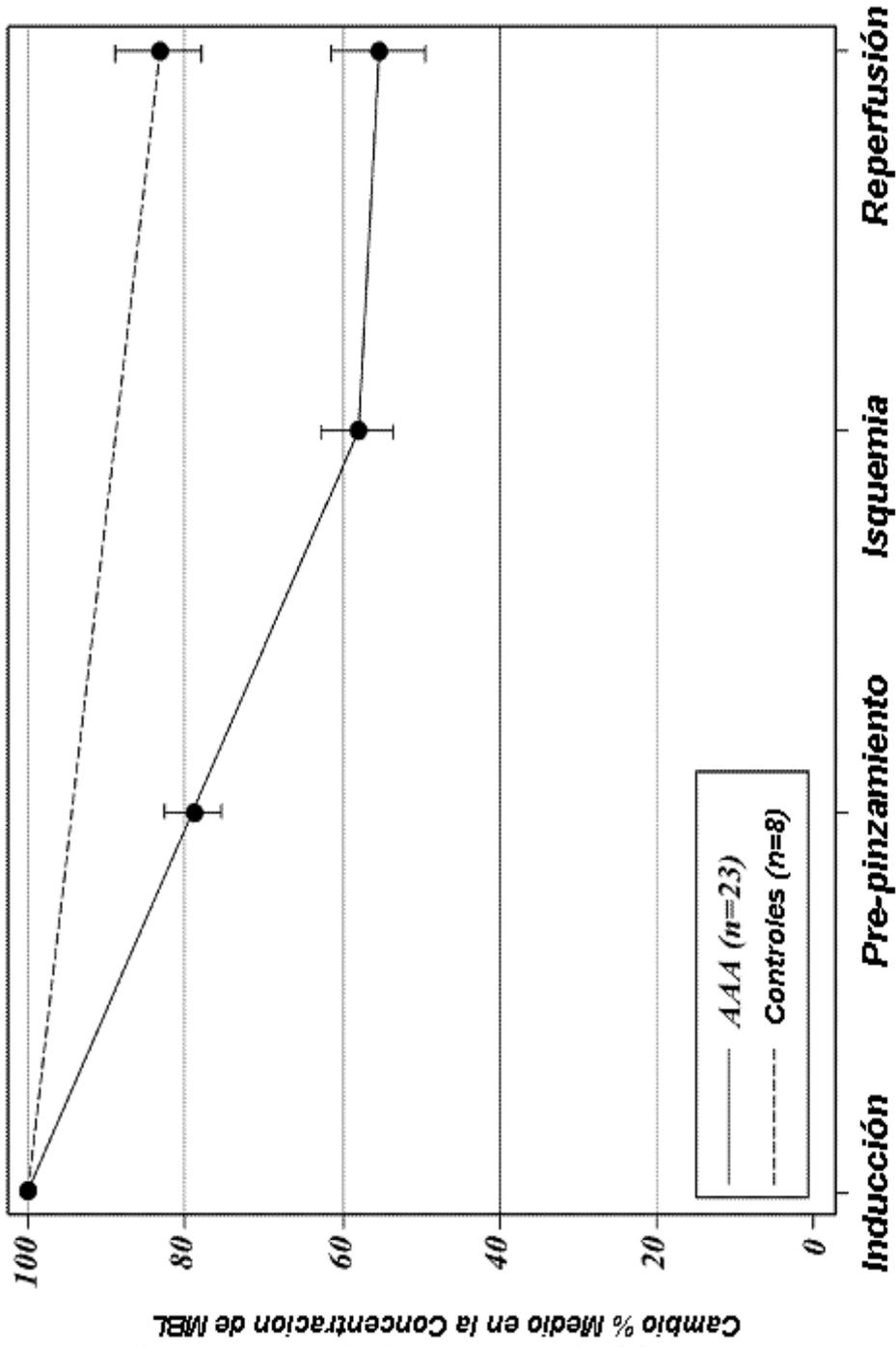


Fig.10.

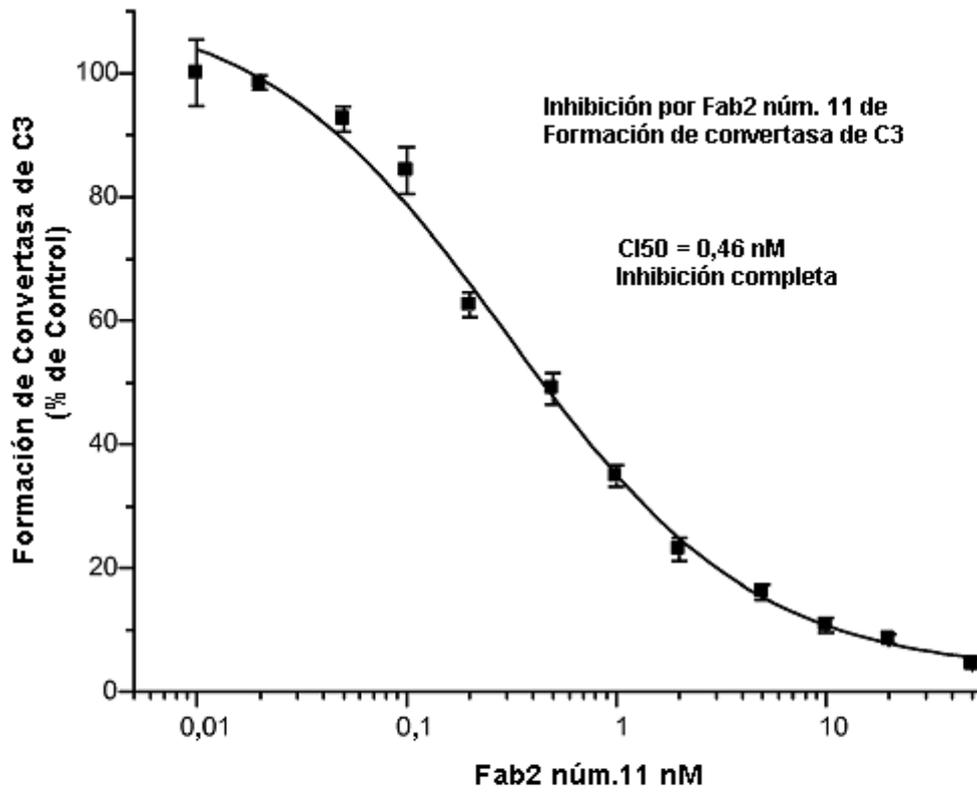


Fig.11A.

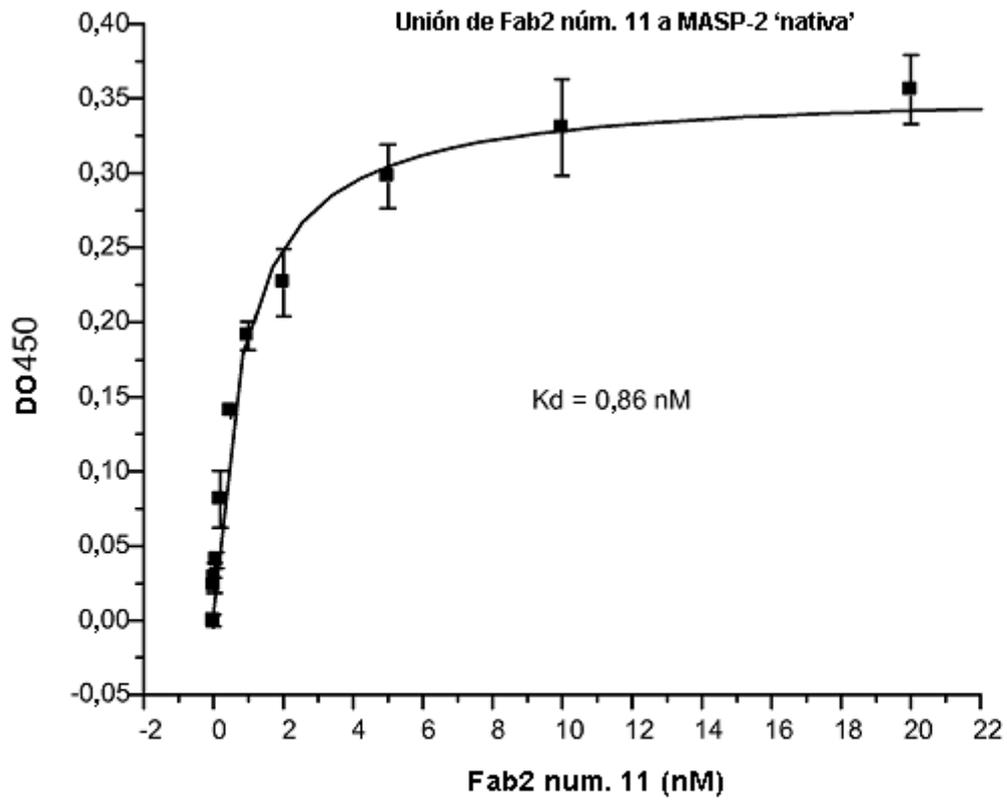


Fig.11B.

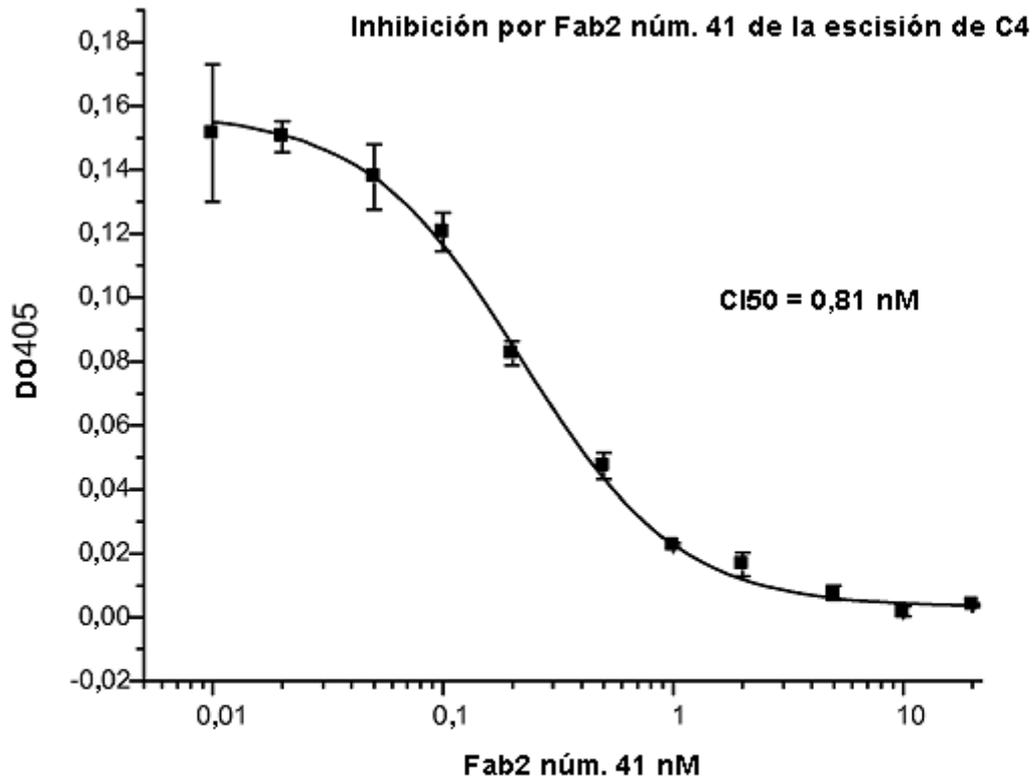


Fig.11C.

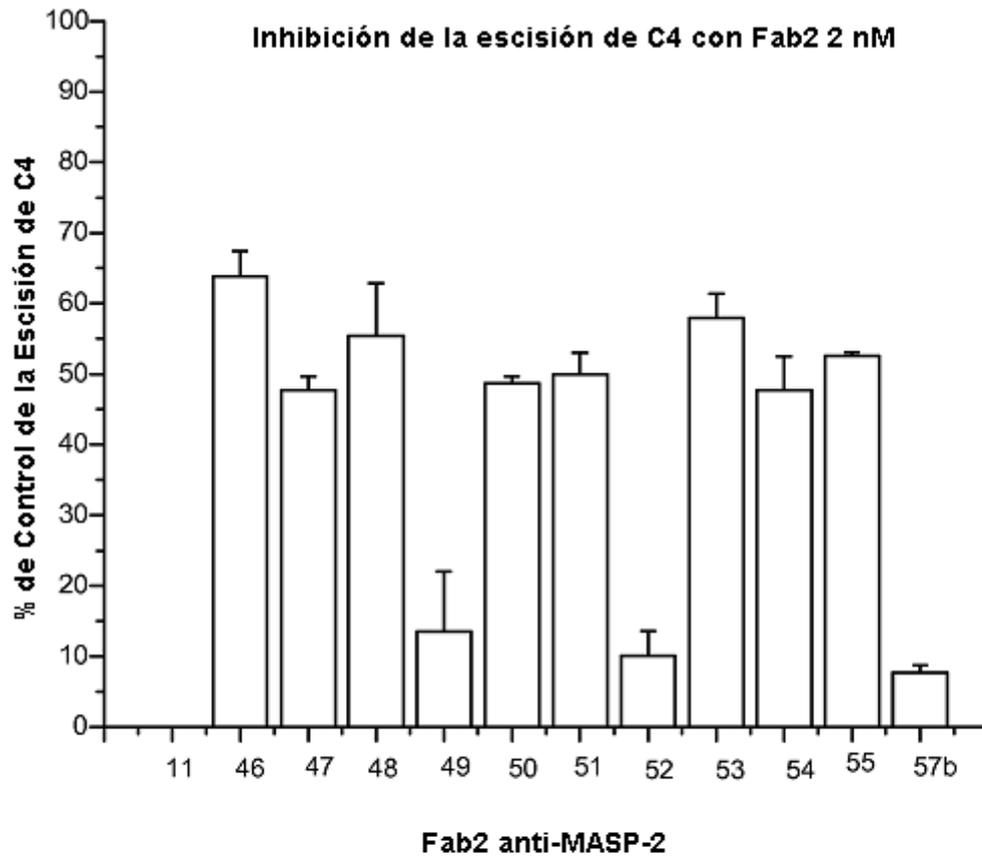


Fig.12.

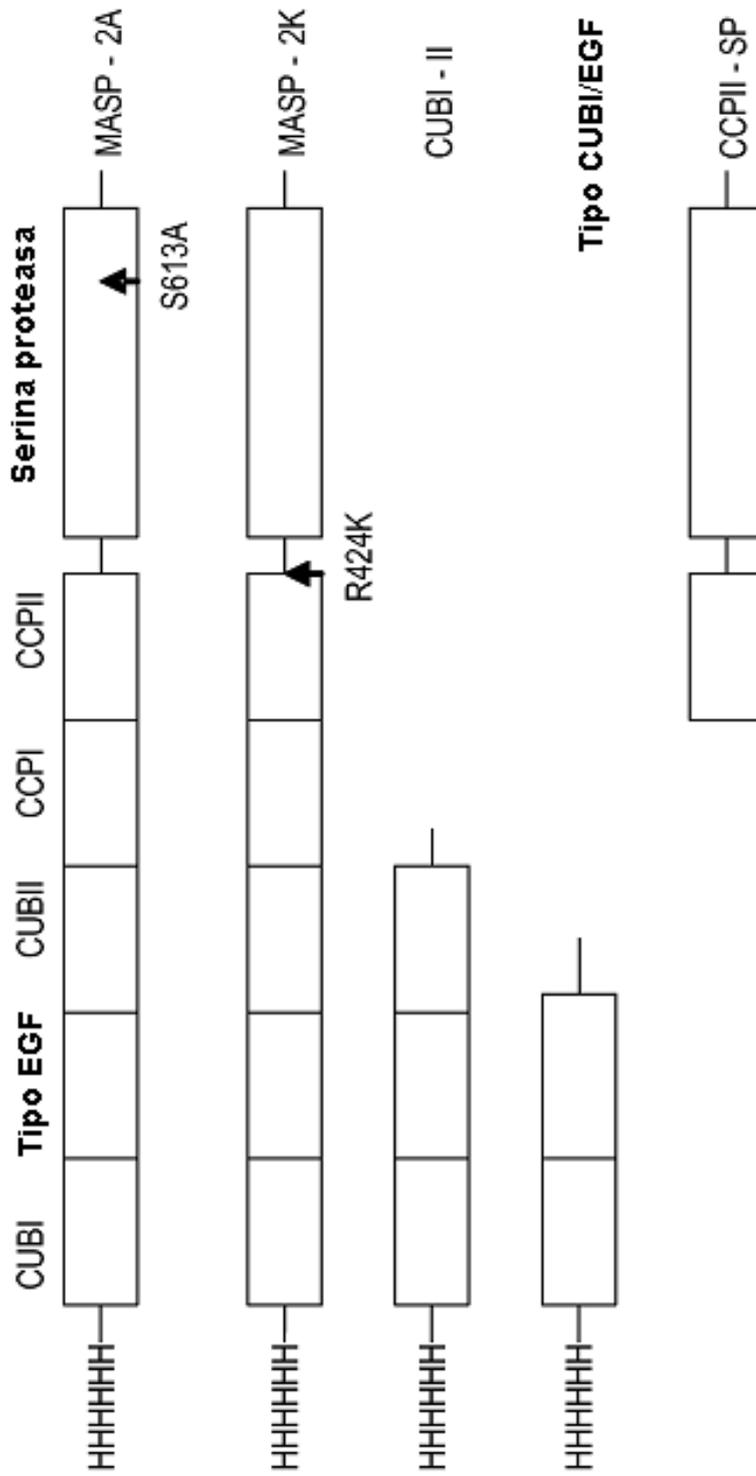


Fig.13.

Unión de Ab AbD núm. 40 y núm. 60 a polipéptidos
MASP2 de rata

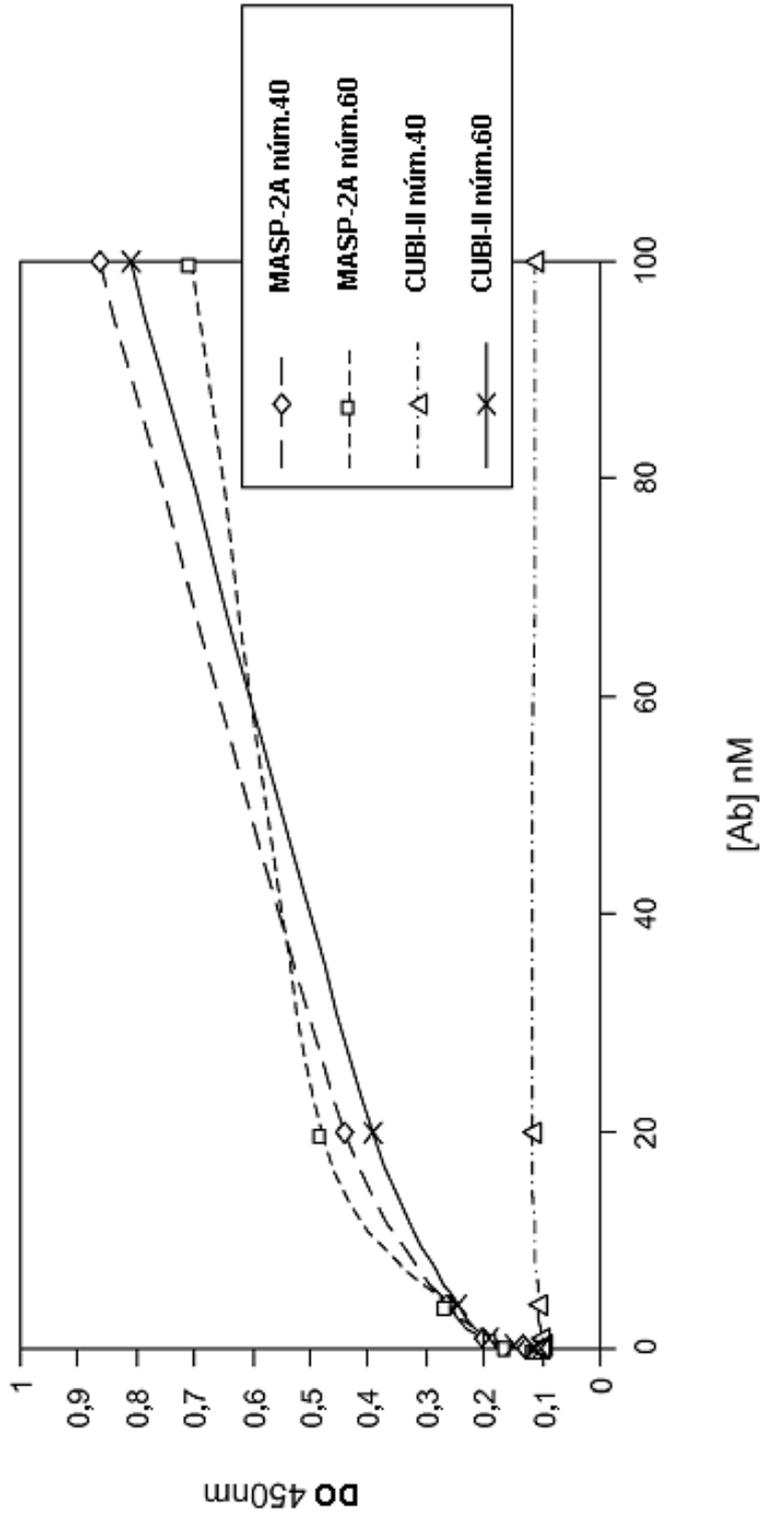


Fig.14.

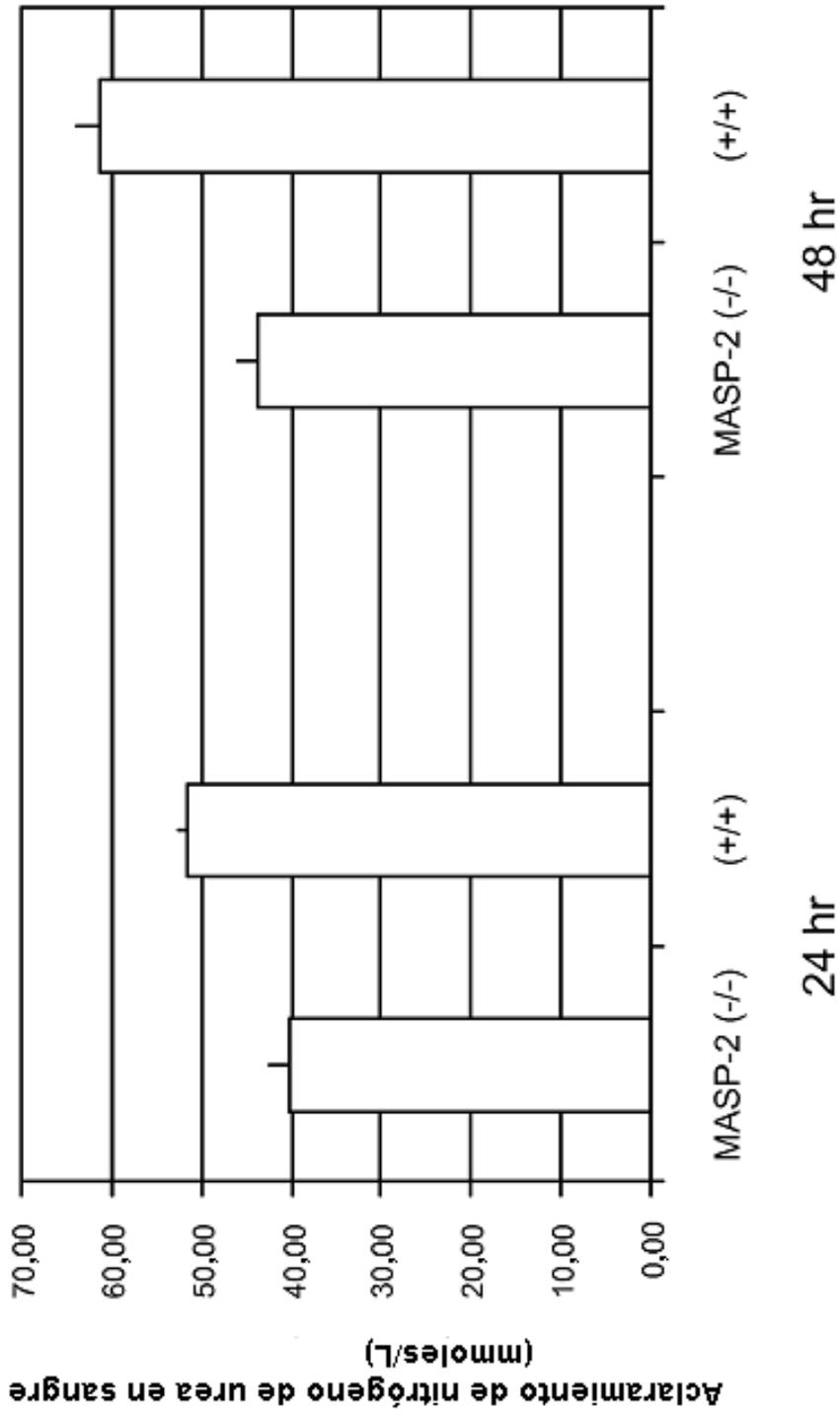


Fig.15.

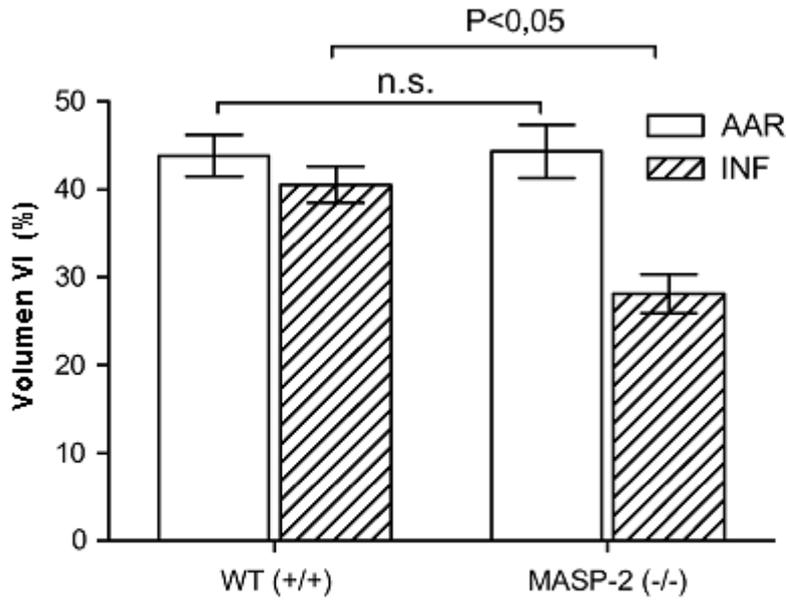


Fig.16A.

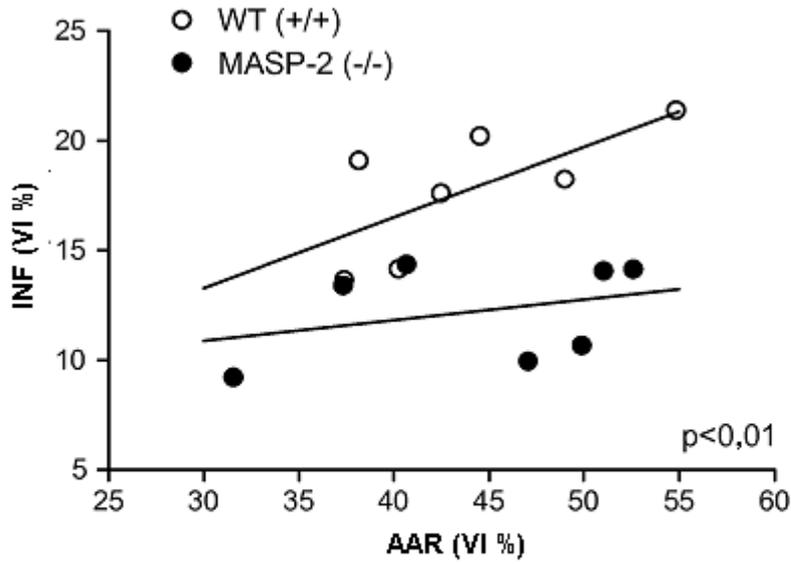


Fig.16B.

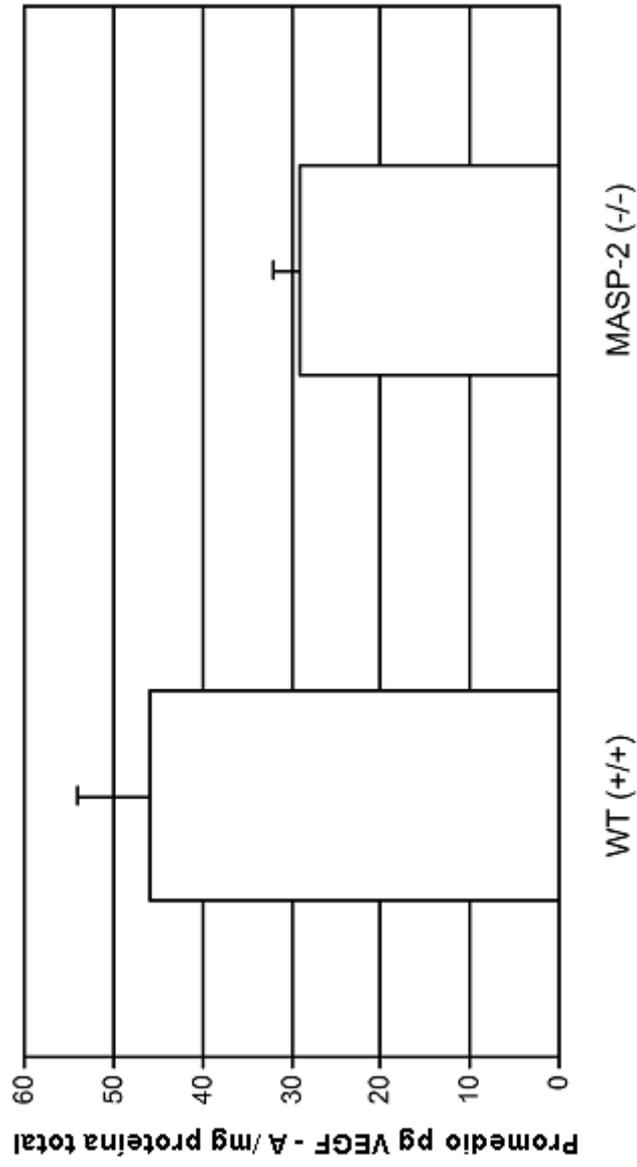


Fig.17A.

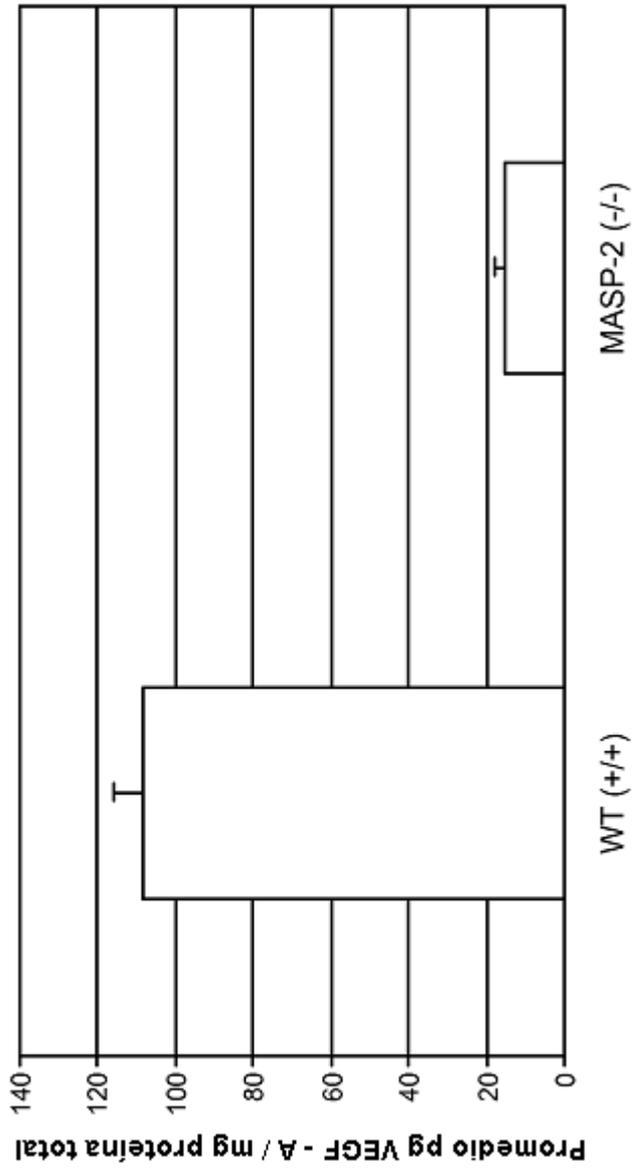


Fig. 17B.

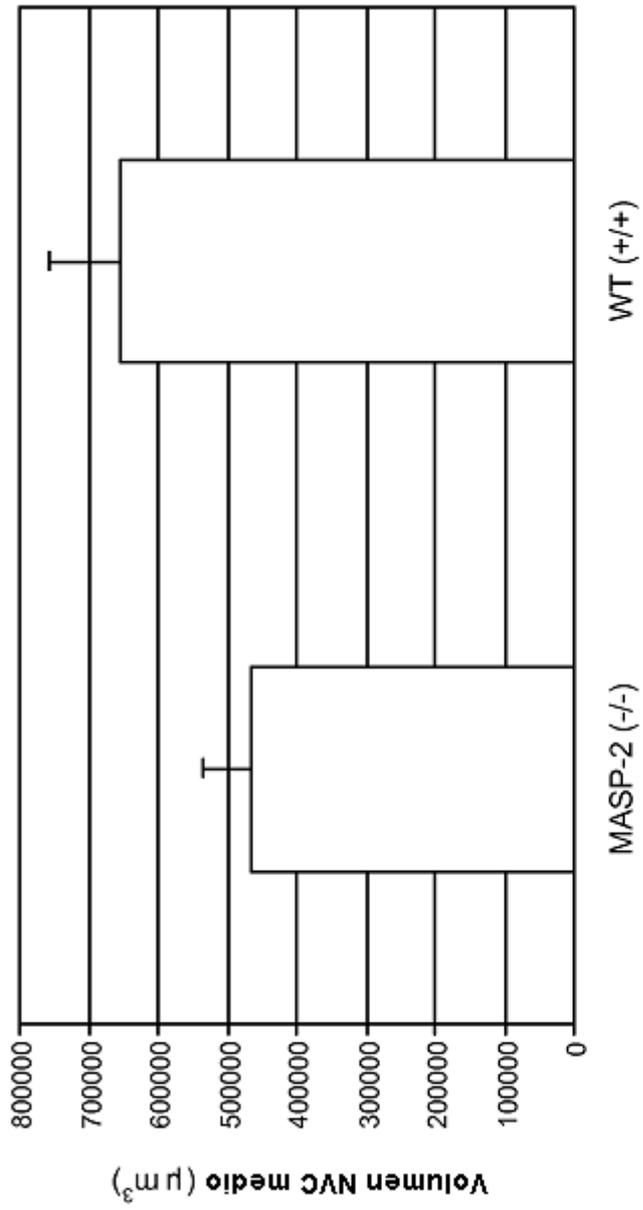


Fig.18.

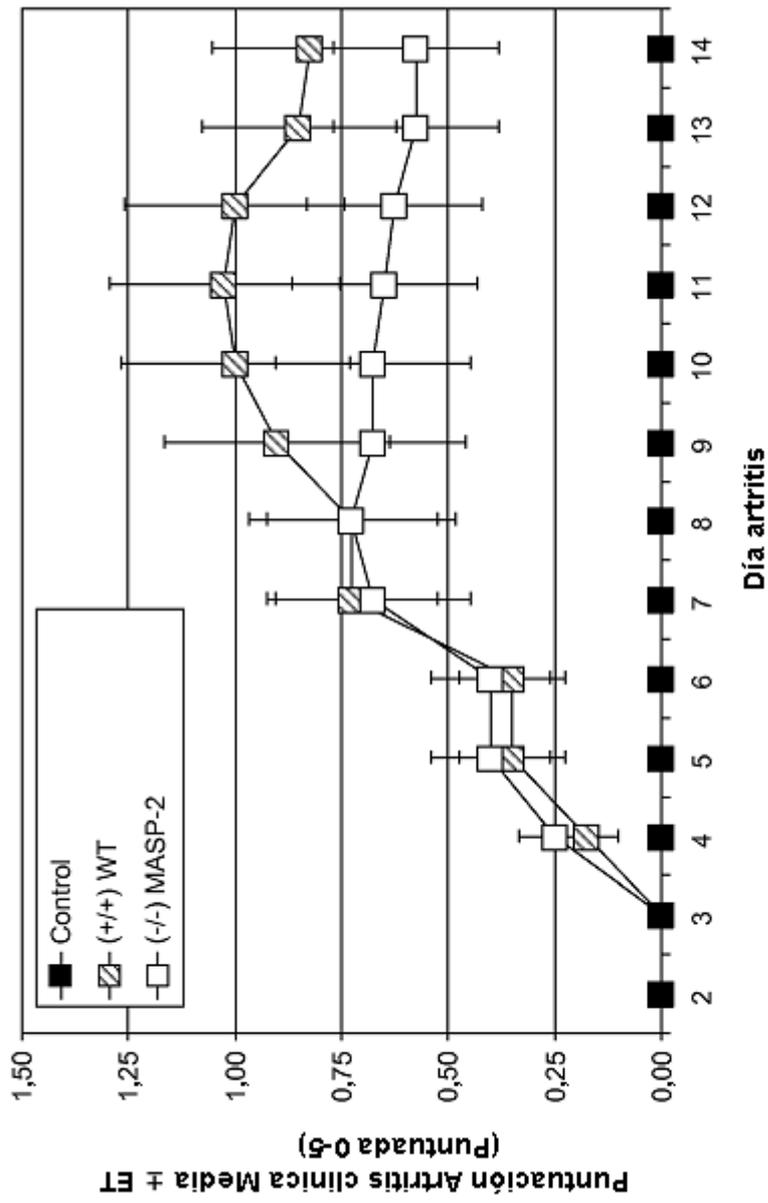


Fig.19.

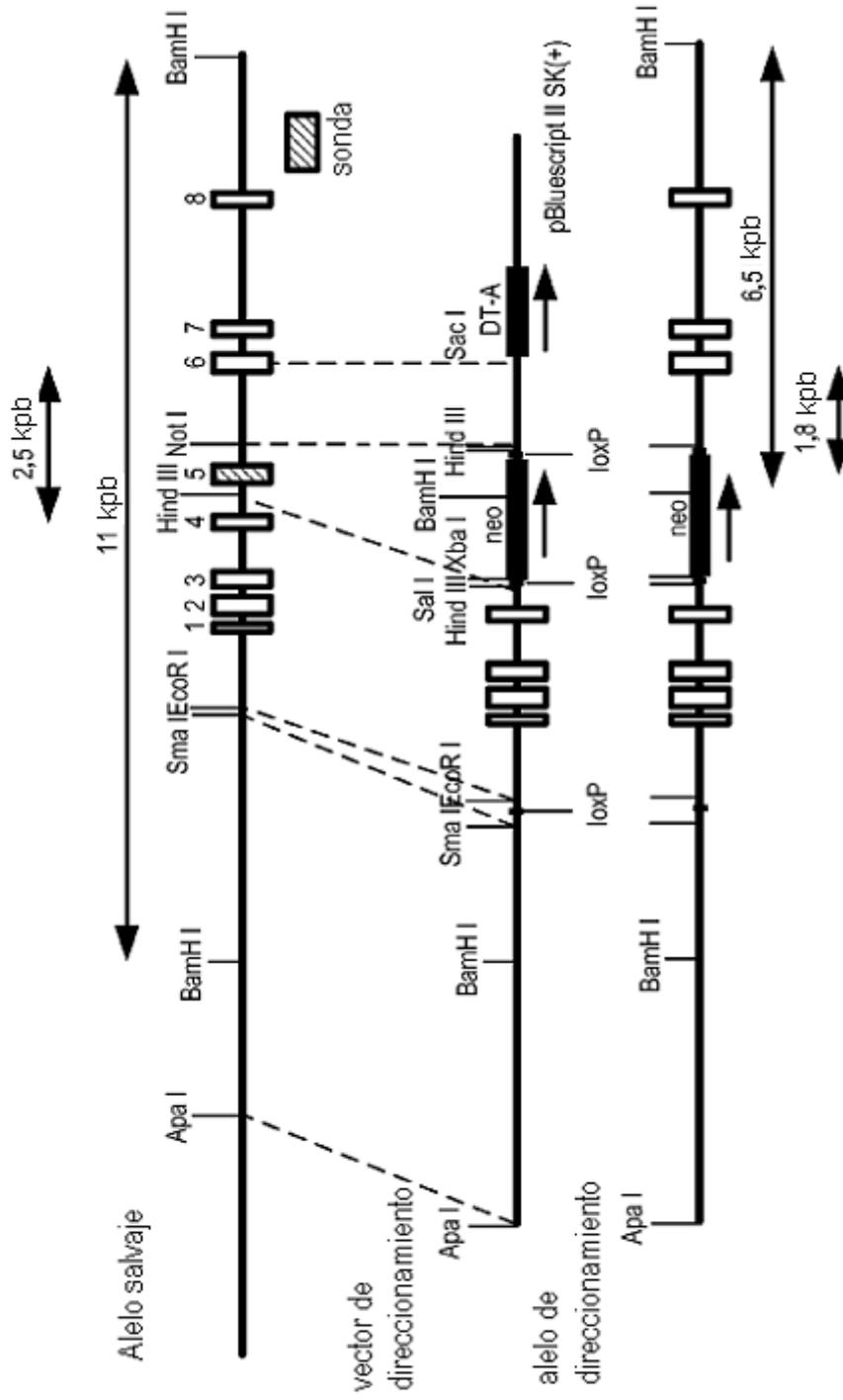


Fig.20A.

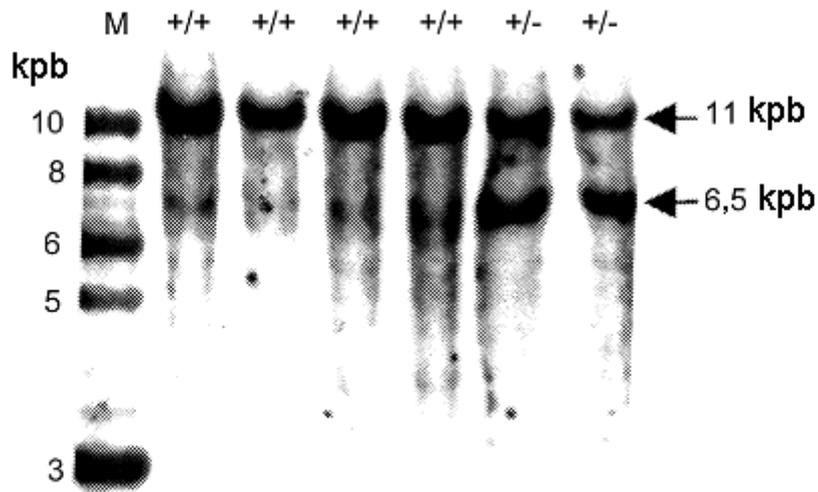


Fig.20B.

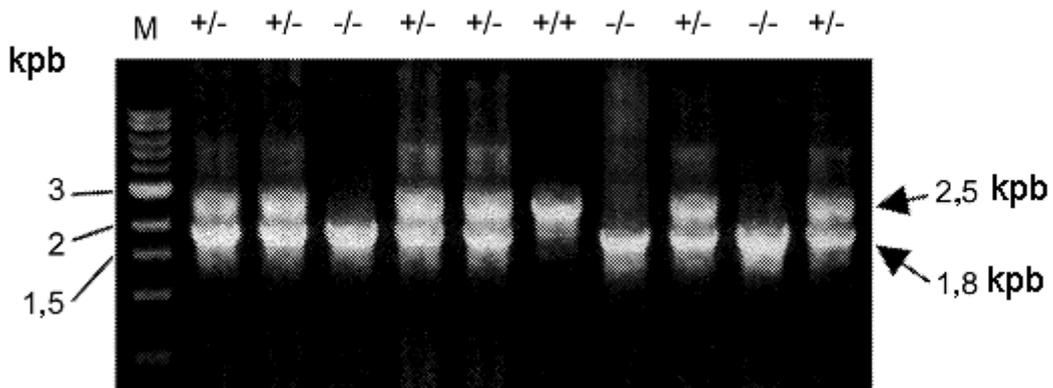


Fig.20C.

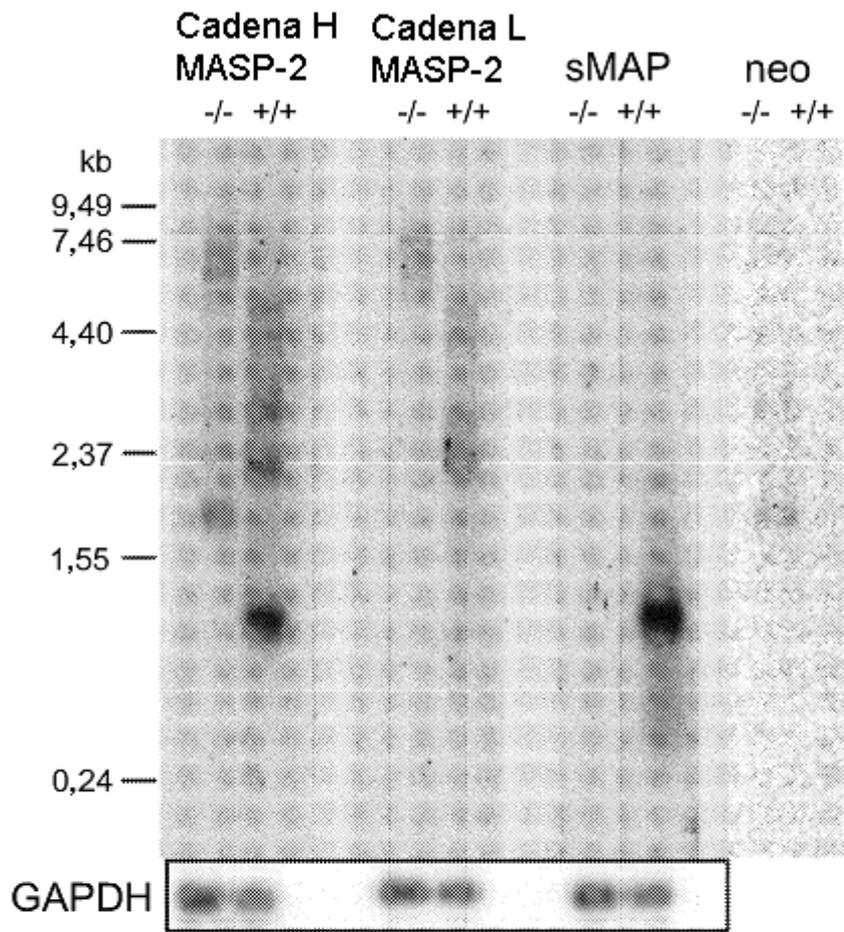


Fig.21A.

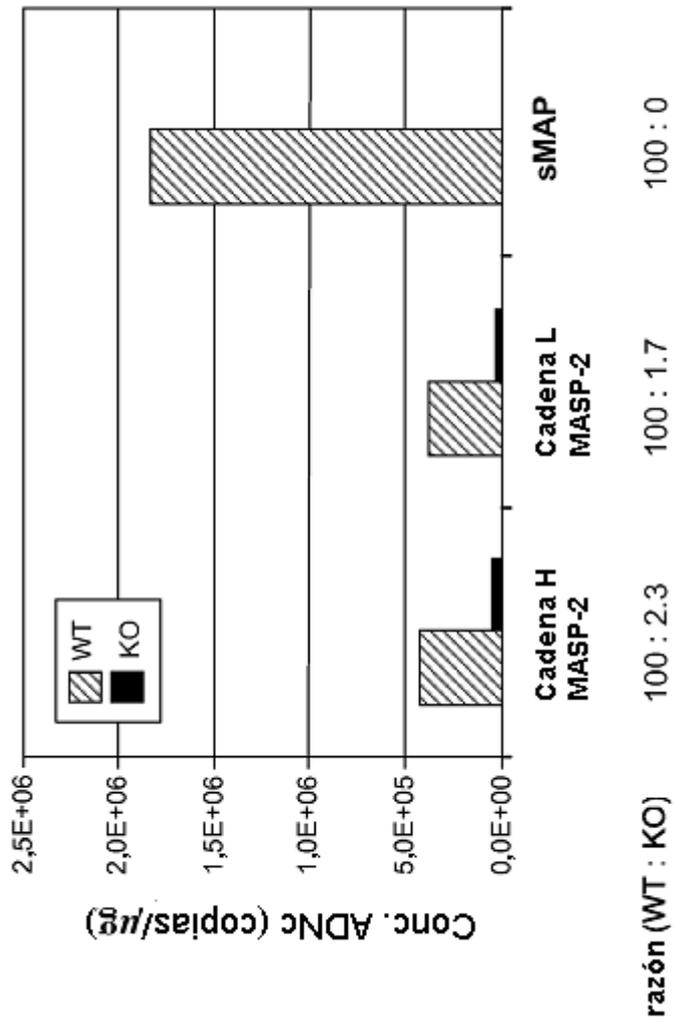


Fig.21B.

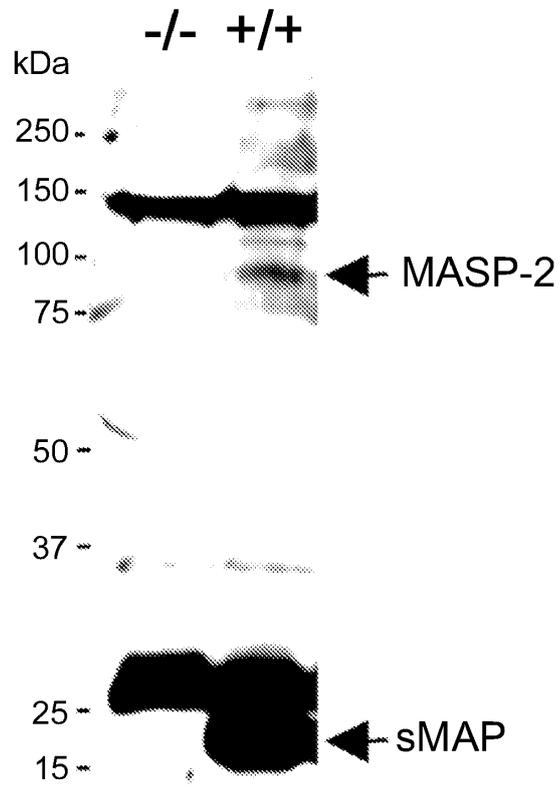


Fig.22A.

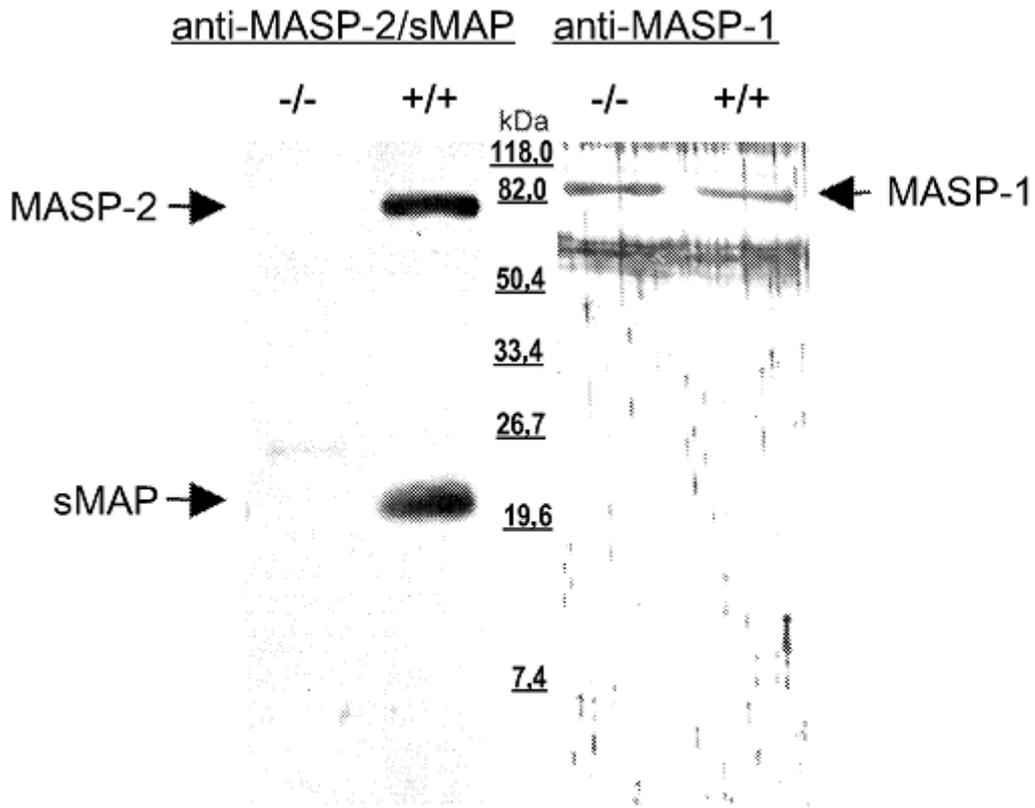


Fig.22B.

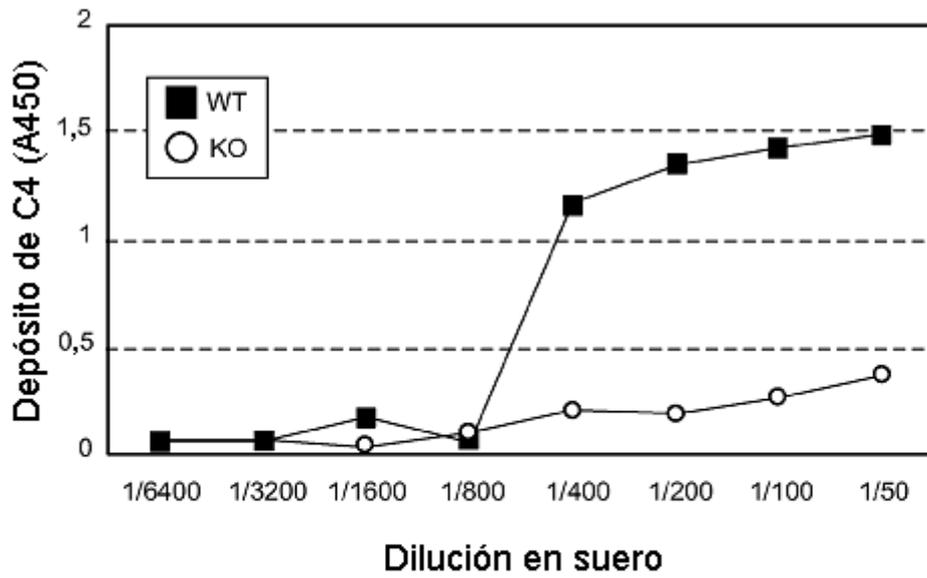


Fig.23A.

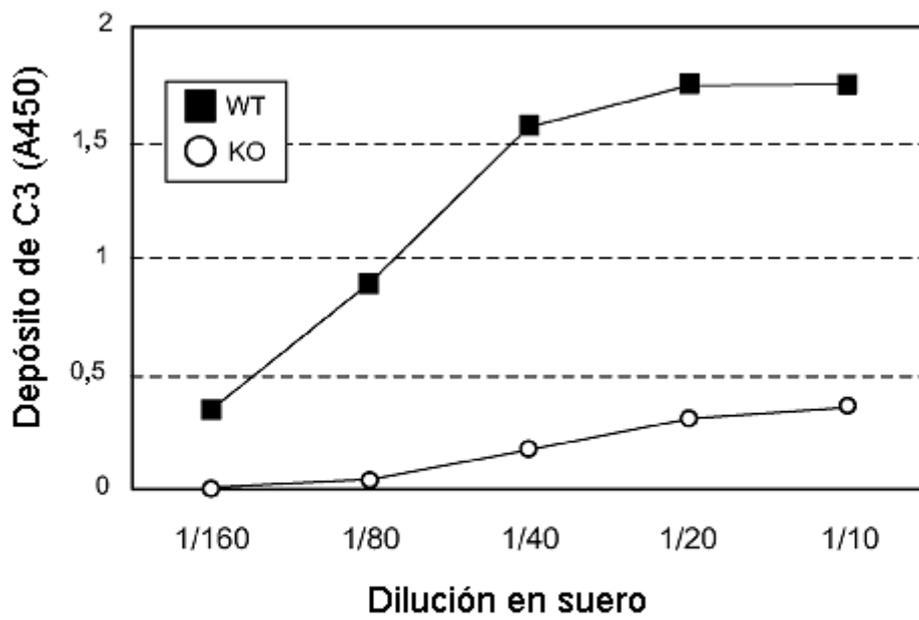


Fig.23B.

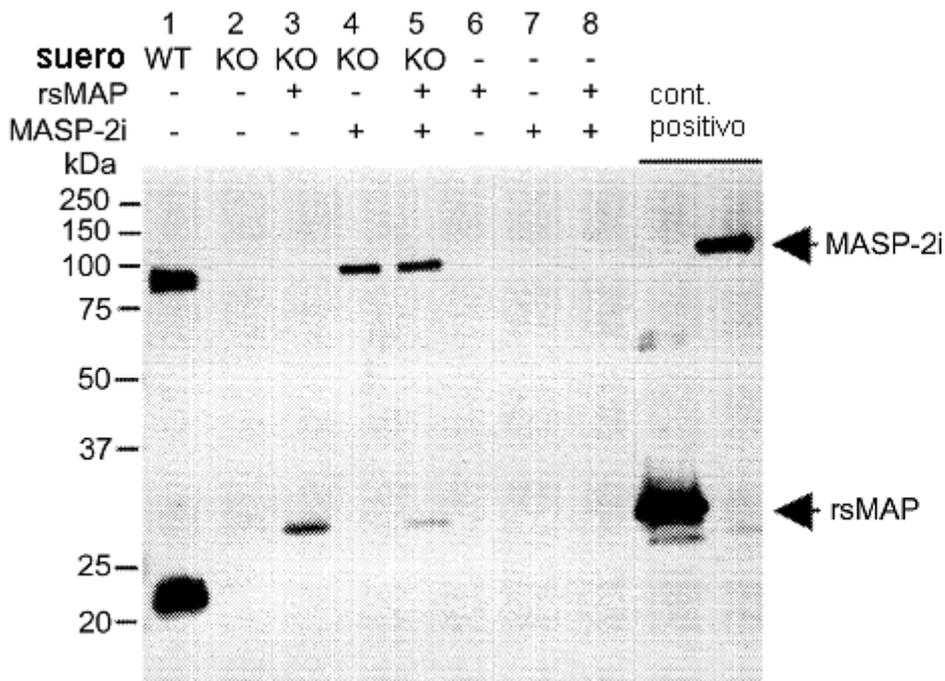


Fig.24A.

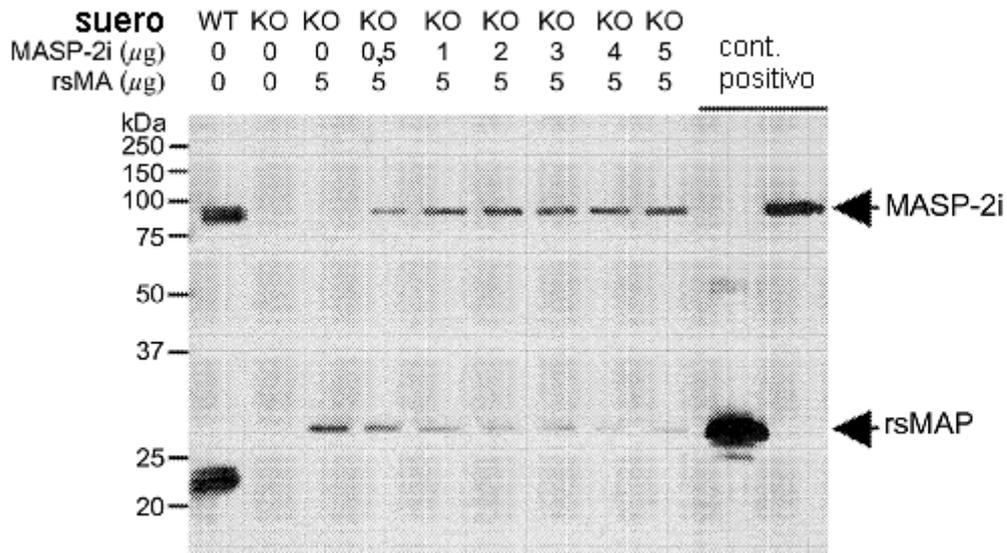


Fig.24B.

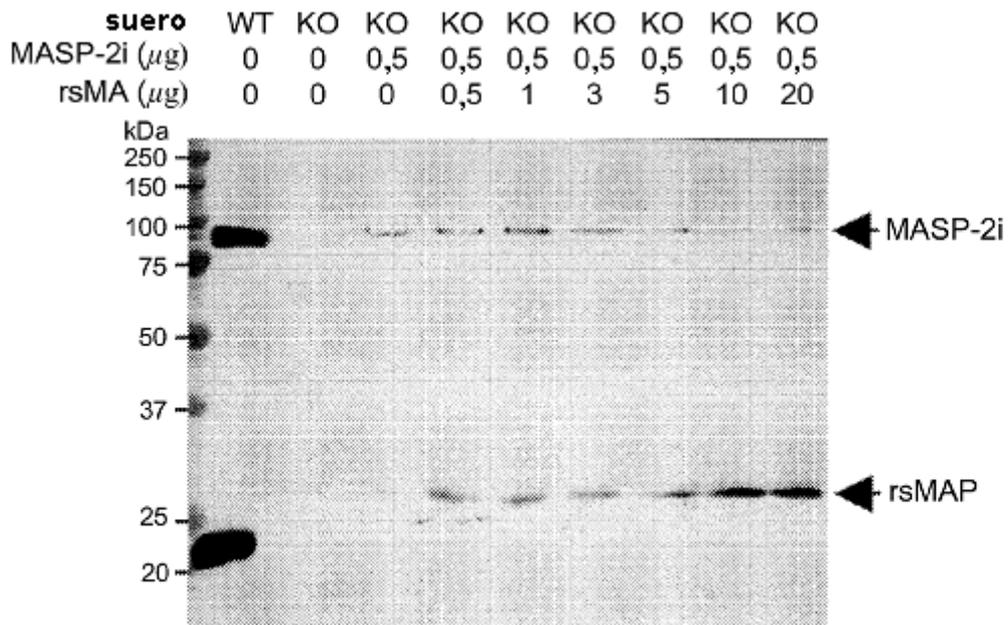


Fig.24C.

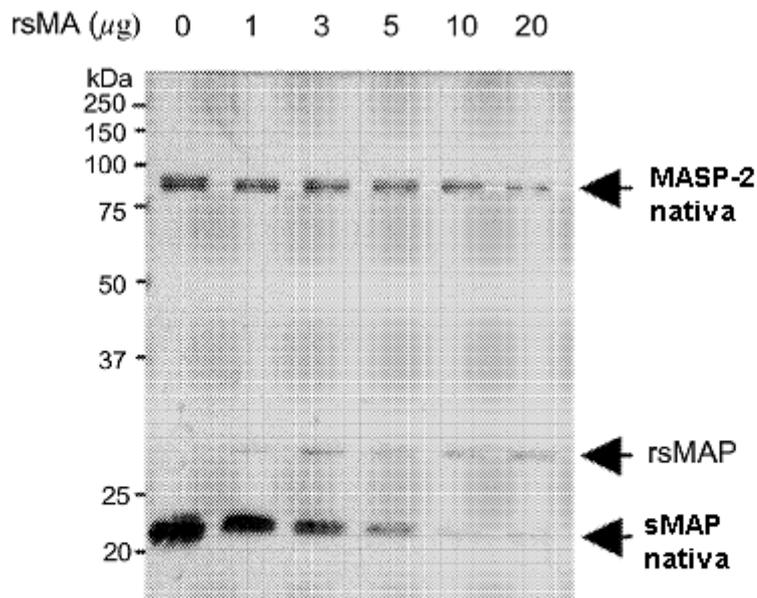


Fig.24D.

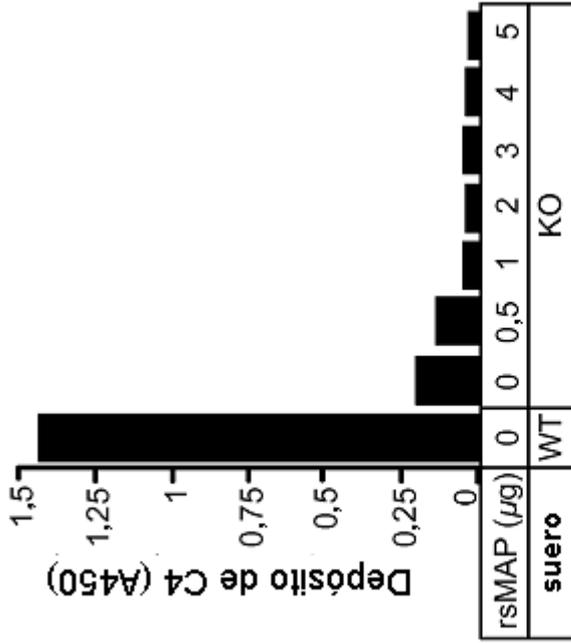


Fig.25A.

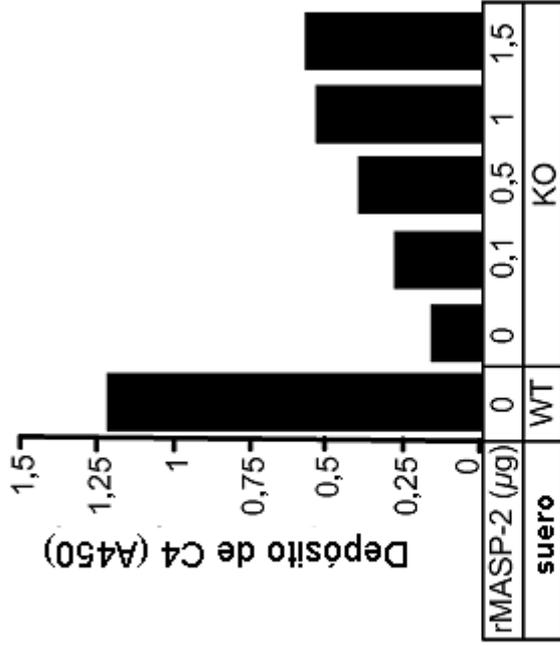


Fig.25B.

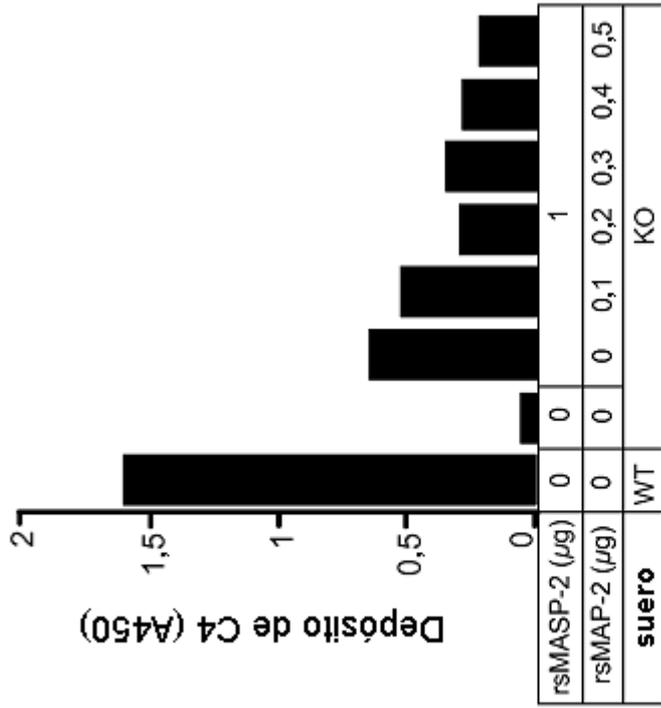


Fig.26A.

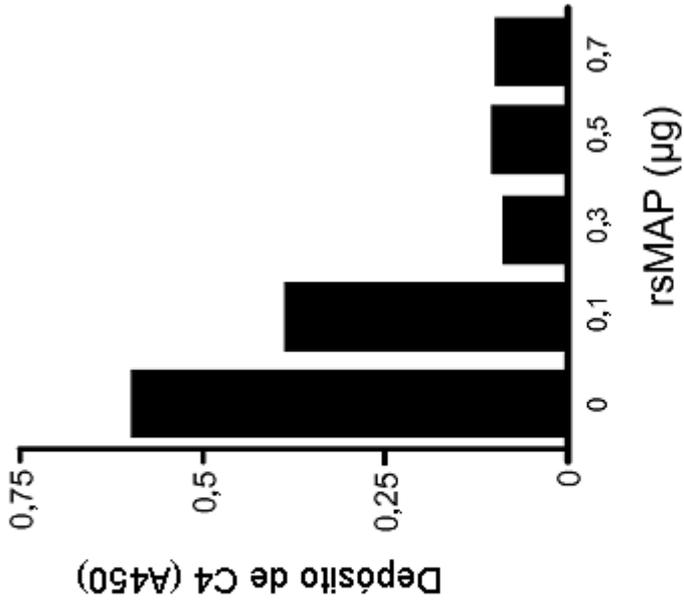


Fig.26B.

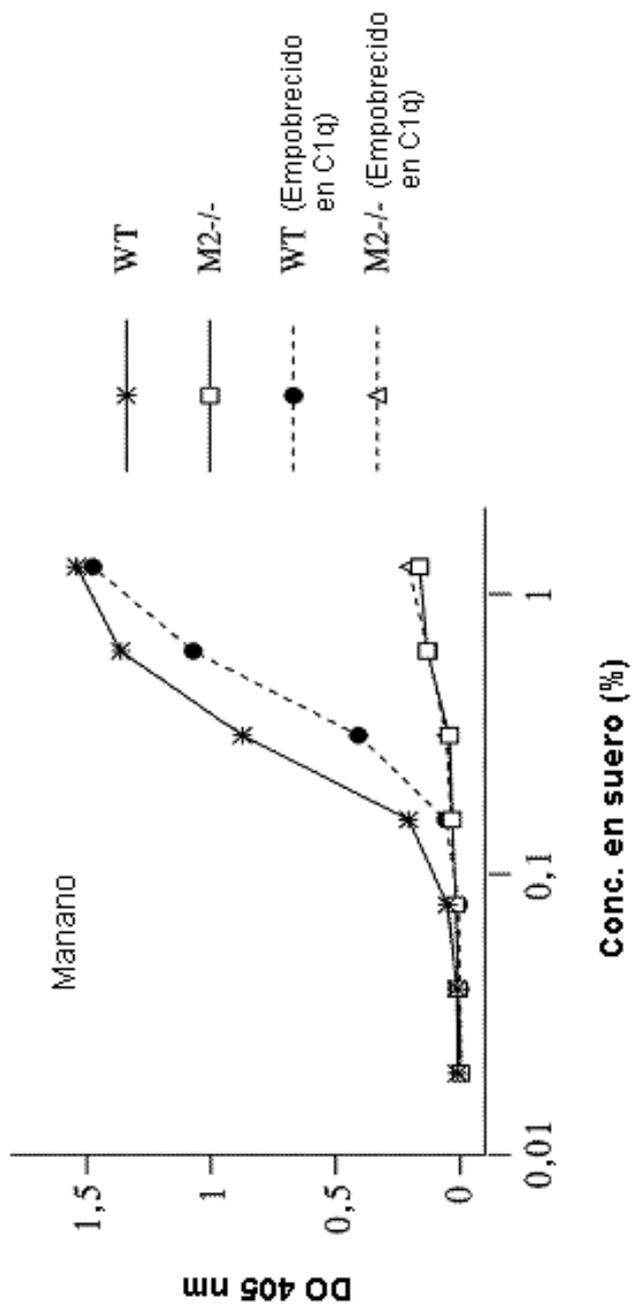


Fig.27A.

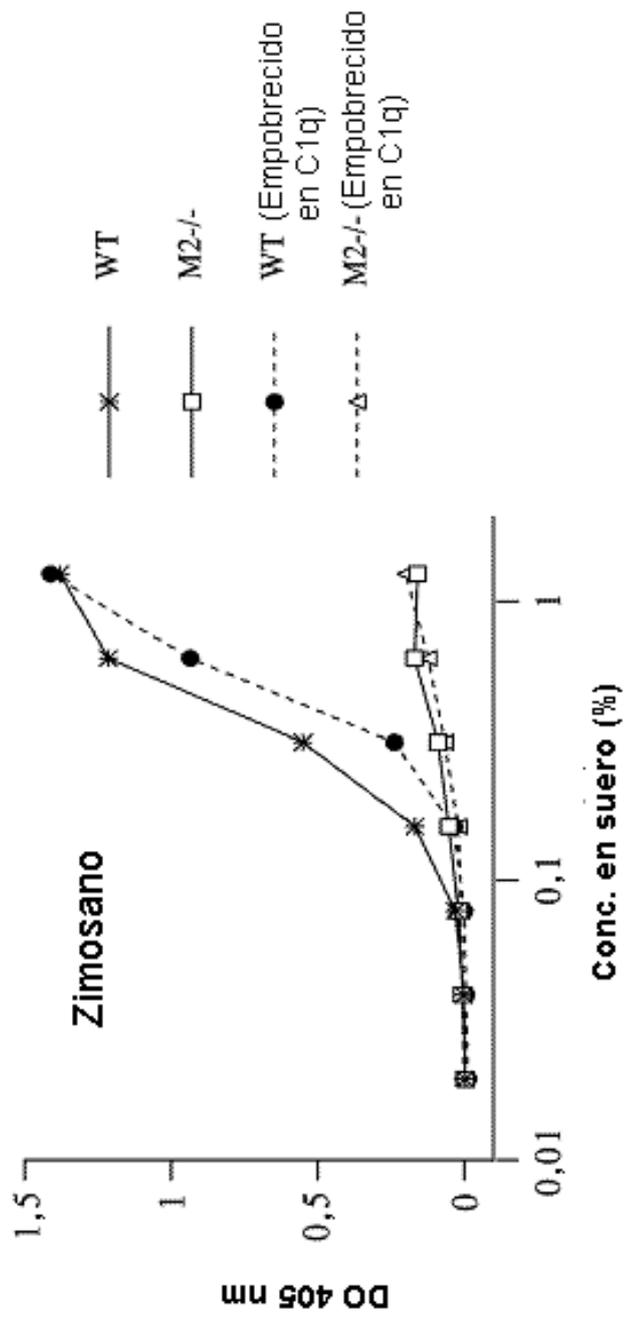


Fig.27B.

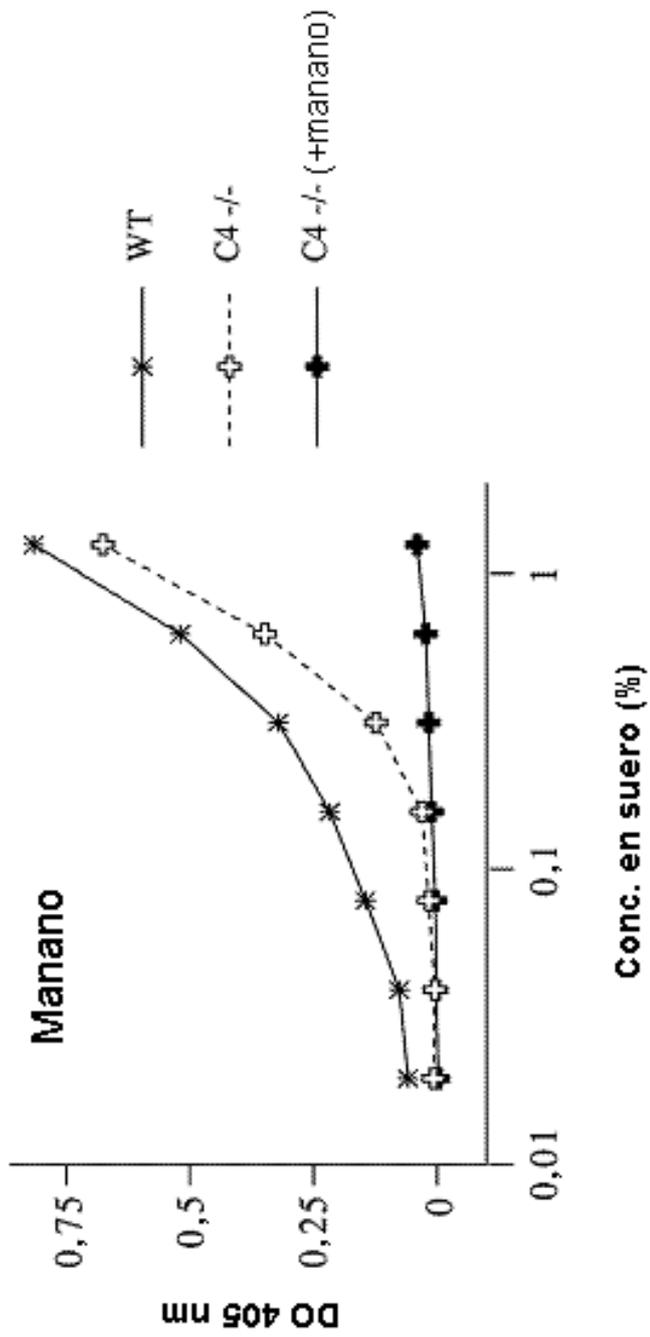


Fig.27C.

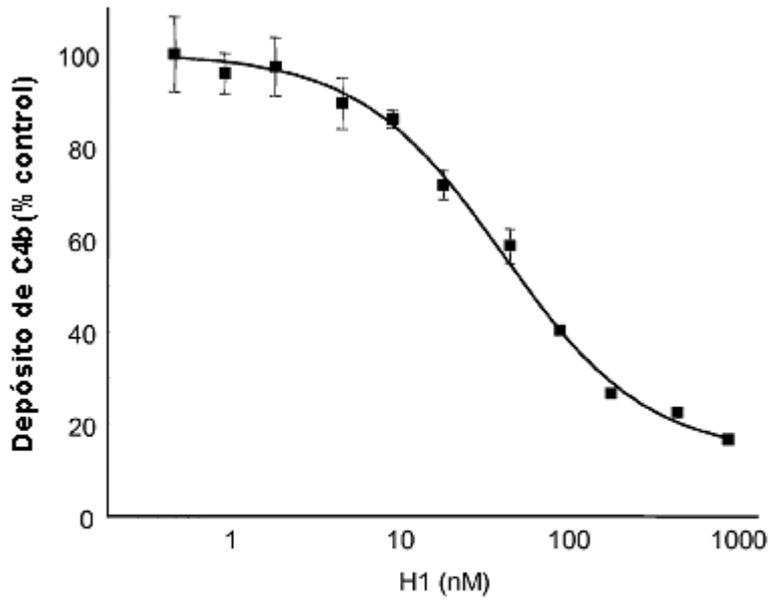


Fig.28A.

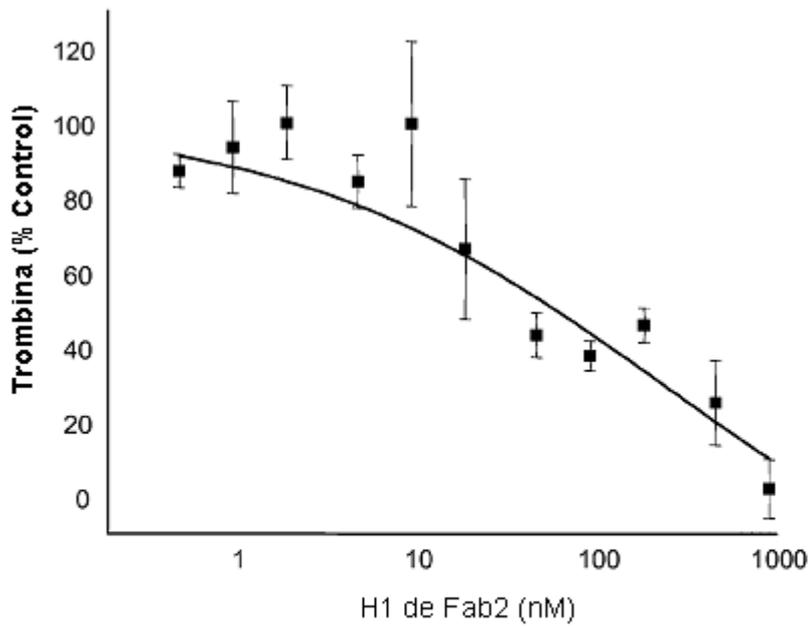


Fig.28B.

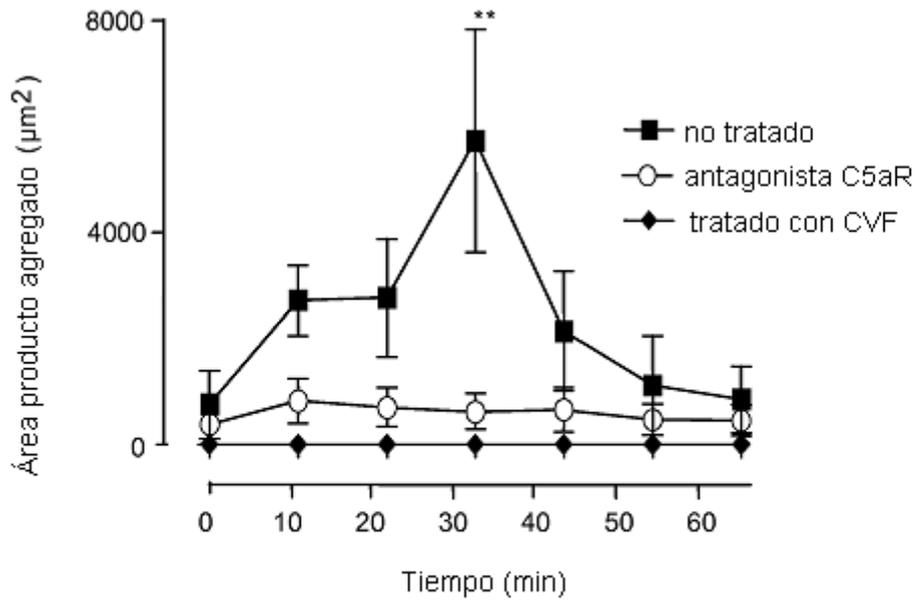


Fig.29A.

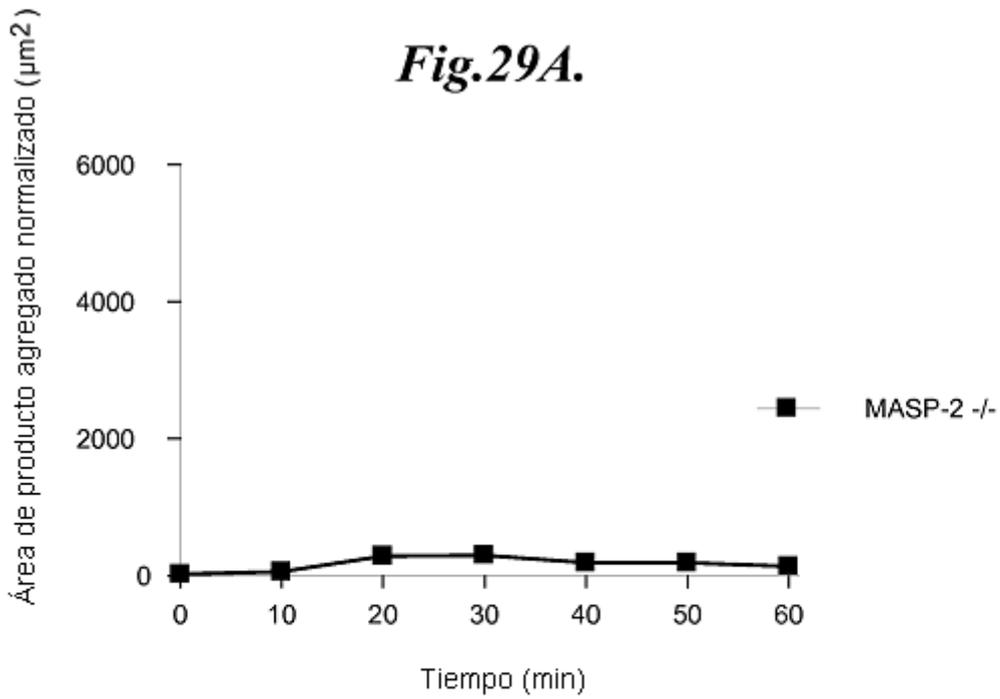


Fig.29B.

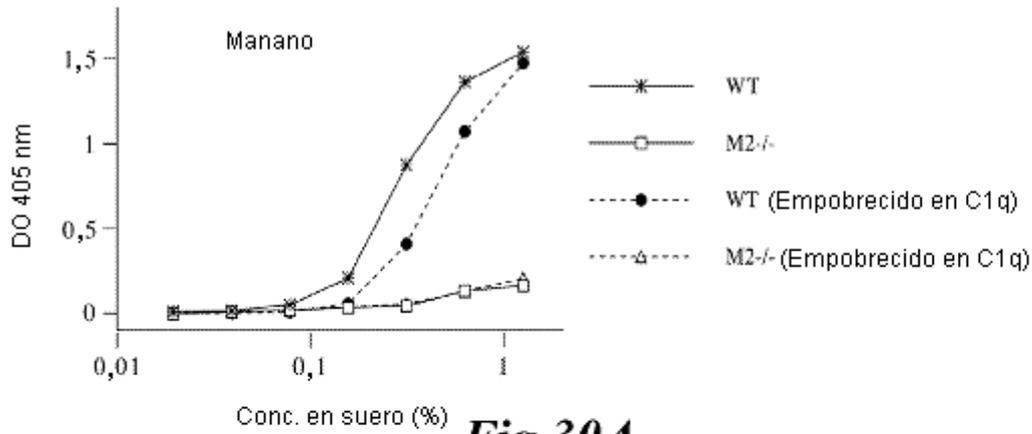


Fig.30A.

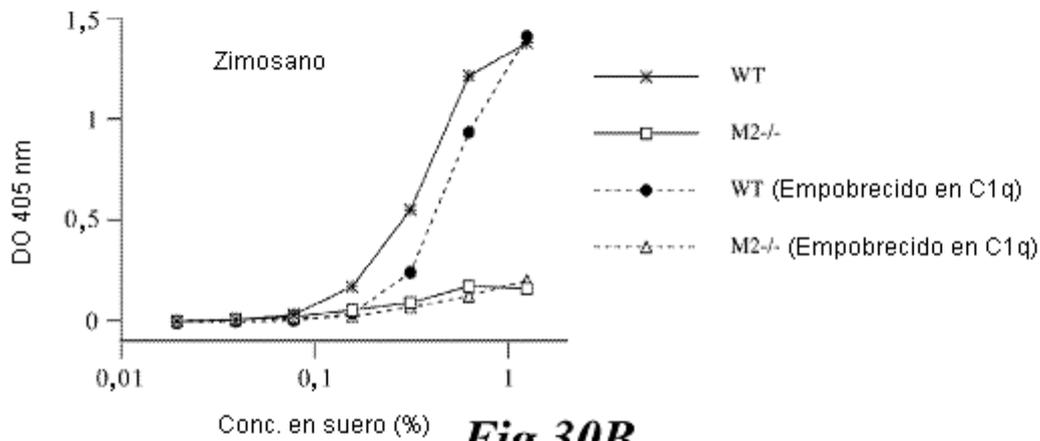


Fig.30B.

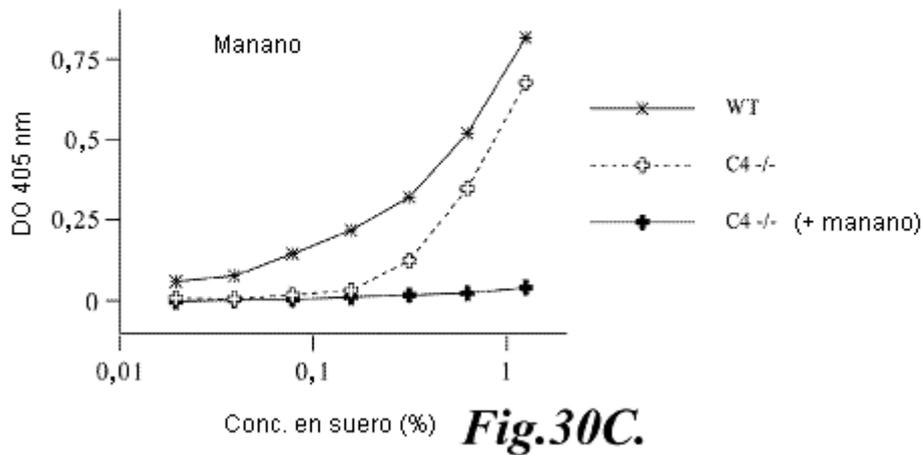


Fig.30C.

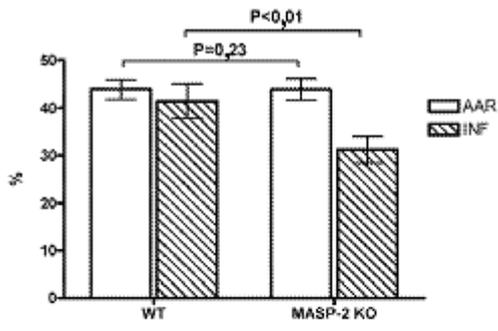


Fig.31A.

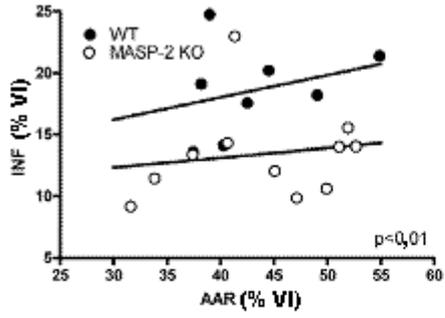


Fig.31B.

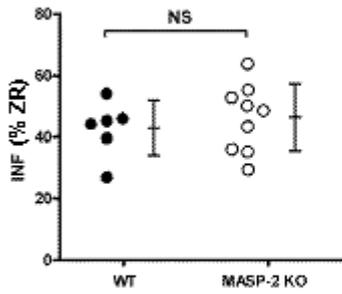


Fig.31C.

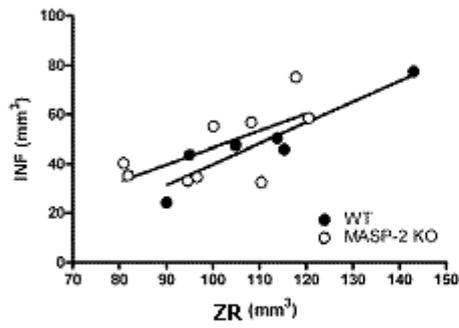


Fig.31D.

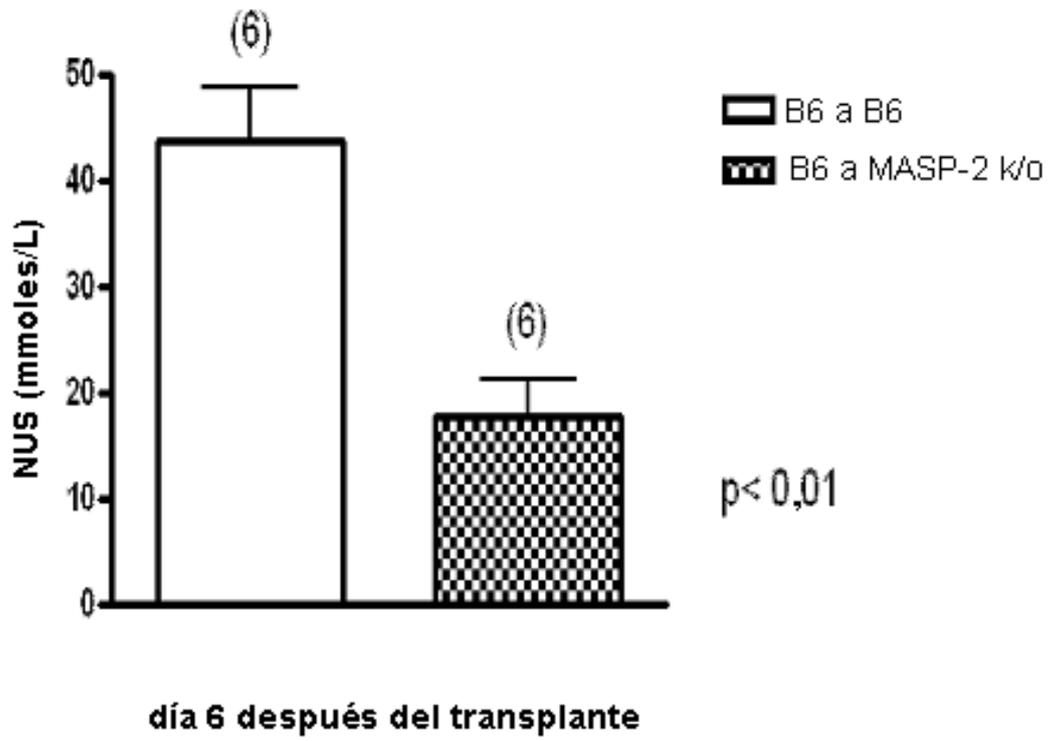


Fig.32.

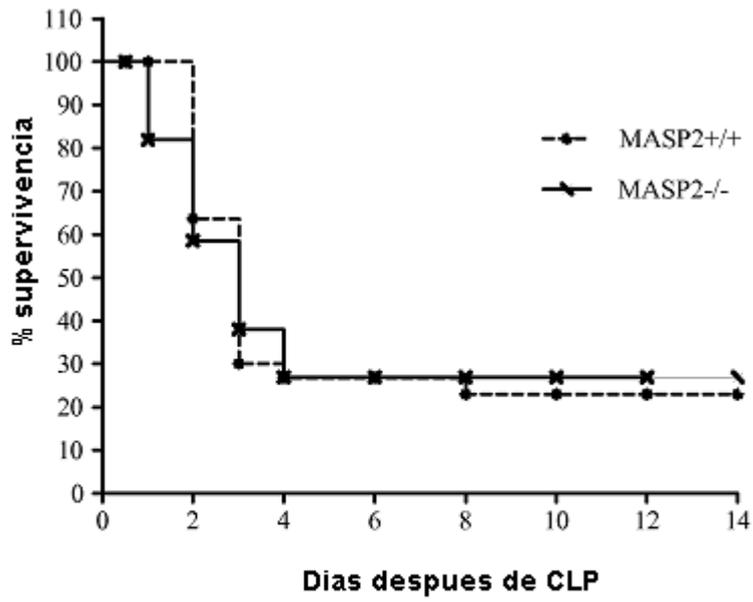


Fig.33.

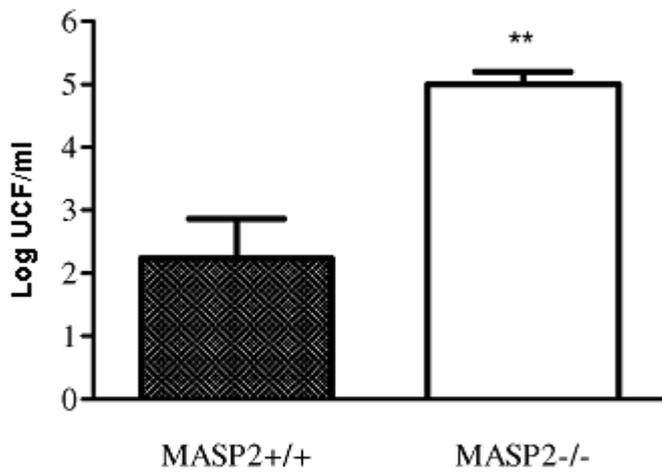


Fig.34.

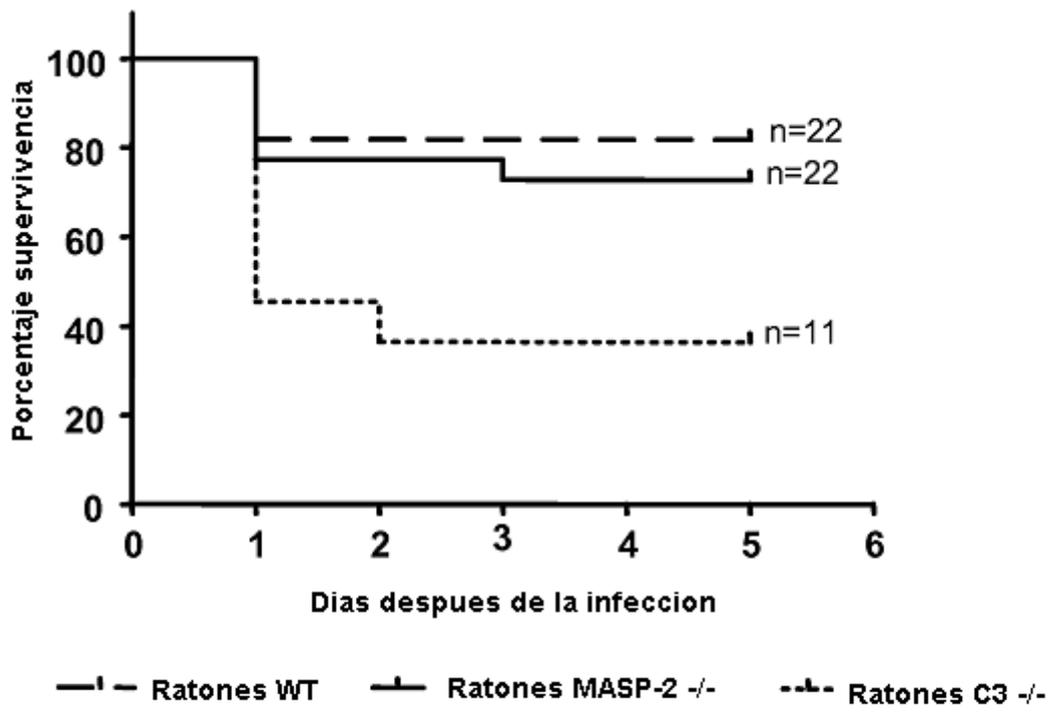


Fig.35.

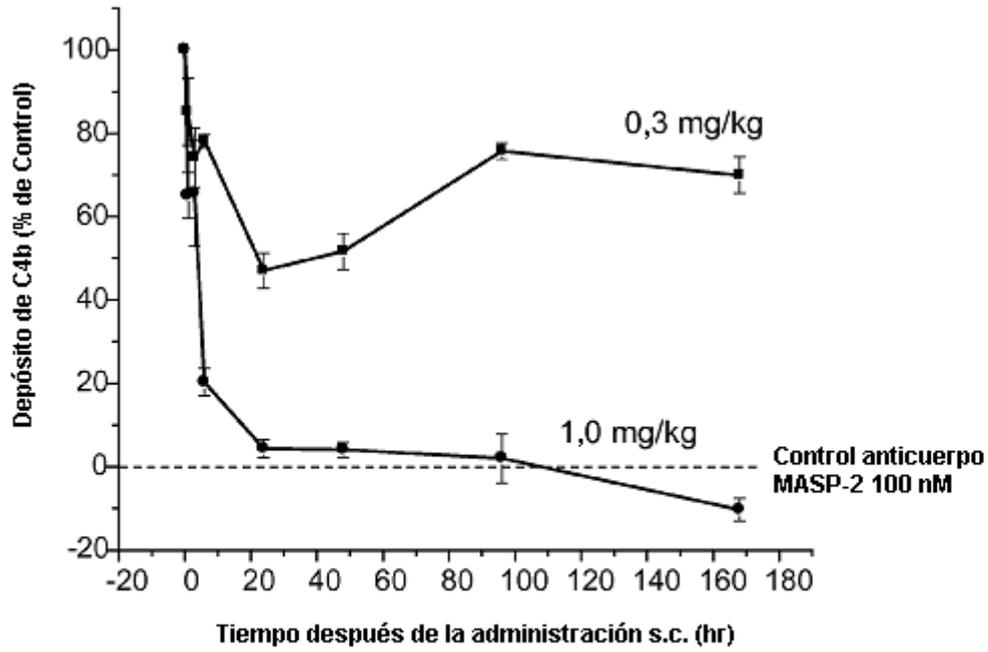


Fig.36.

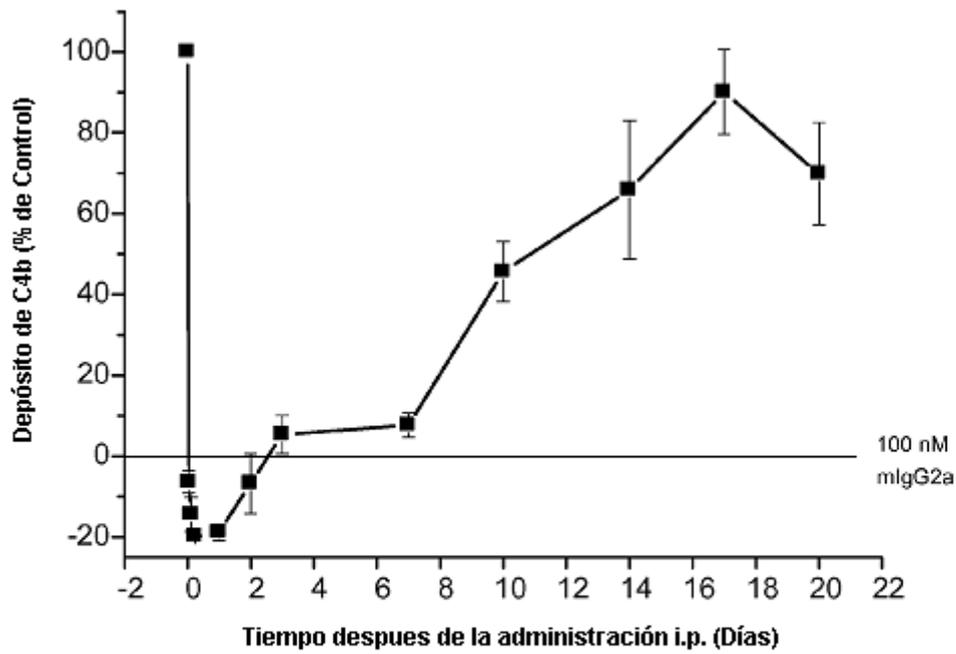


Fig.37.

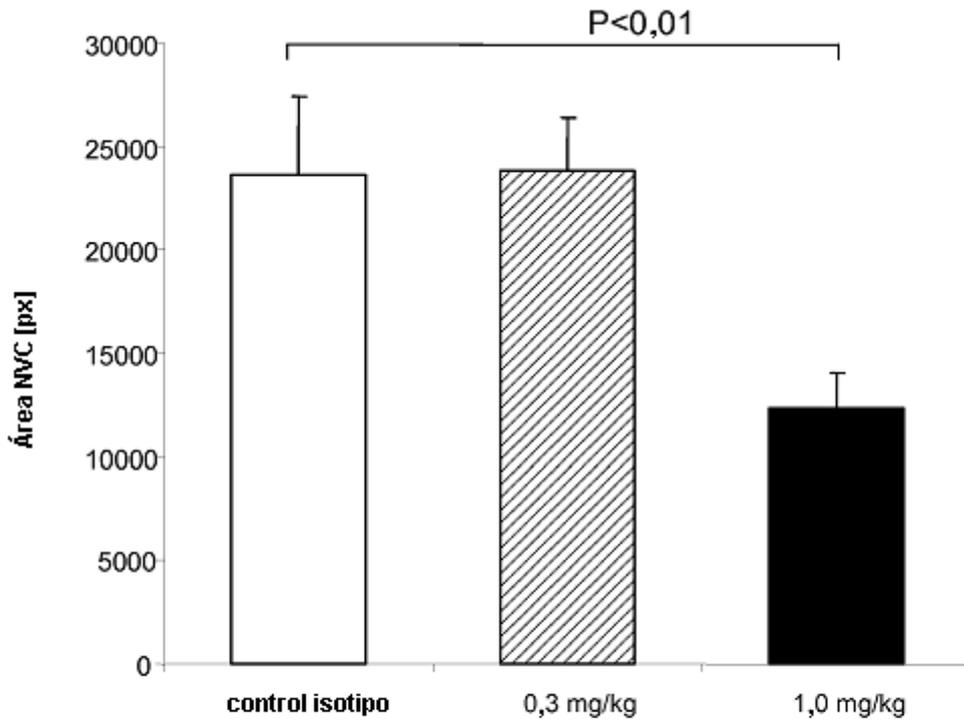


Fig.38.

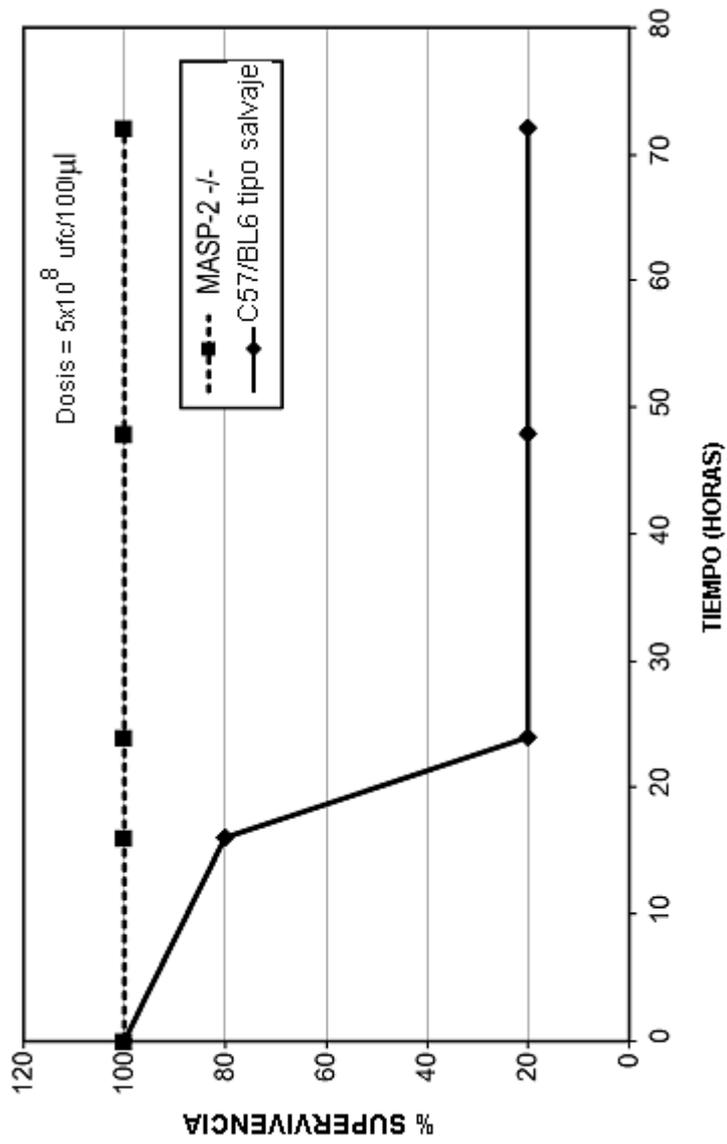


Fig. 39A.

ufc de *M. meningitidis* recuperadas en diferentes puntos temporales en sangre de ratones de tipo salvaje y MASP-2 ^{-/-} después de la inyección con 5×10^8 ufc/100 μ l de *M. meningitidis*

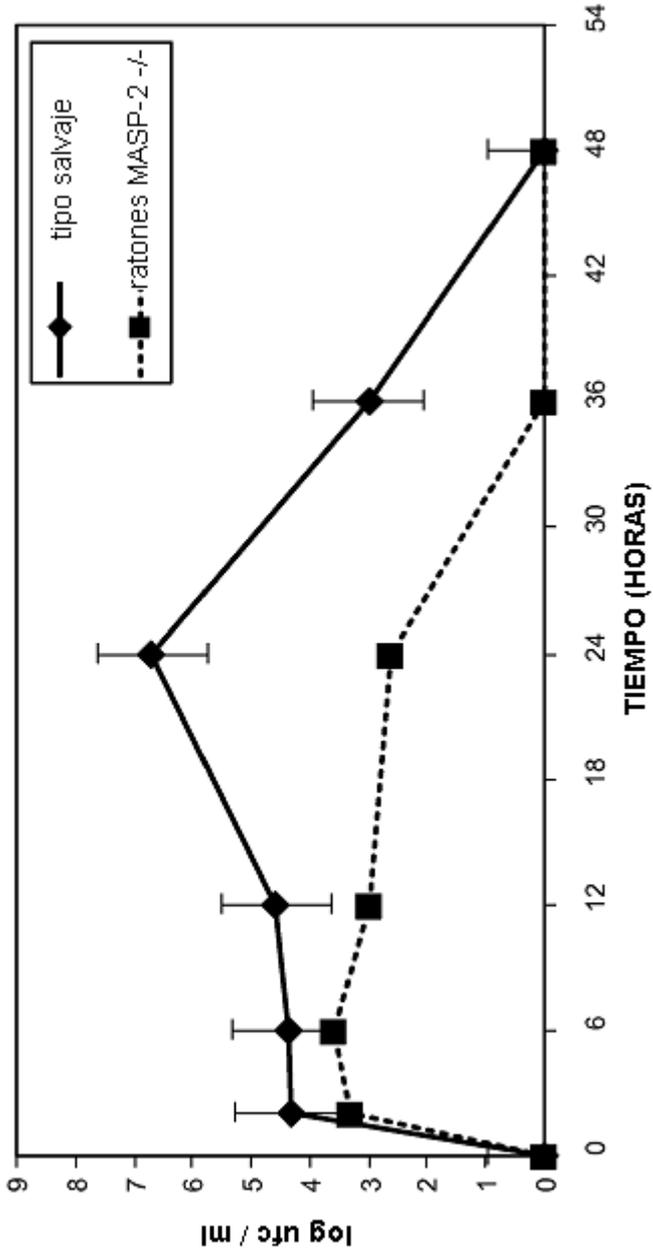


Fig.39B.

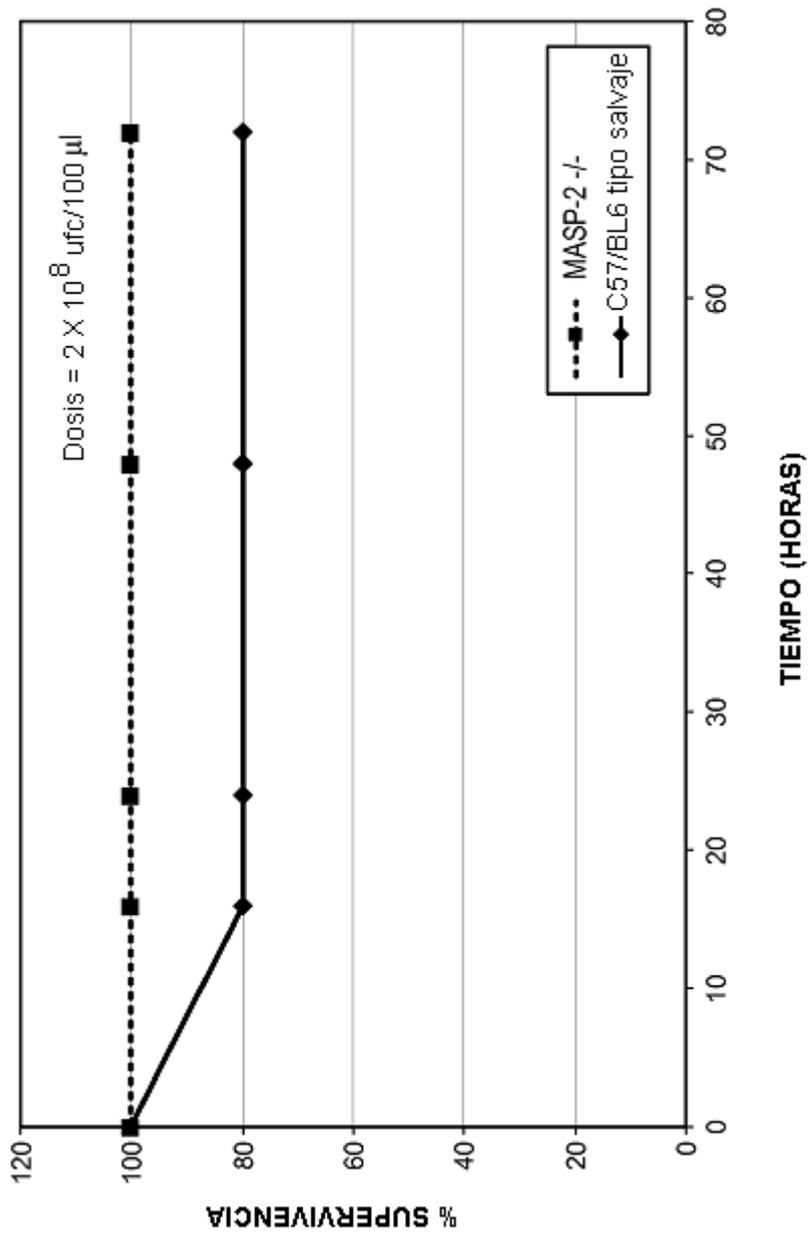


Fig.40A.

ufc de *N. meningitidis* recuperadas en diferentes puntos temporales en sangre de ratones C57/BL6 de tipo salvaje tras la inyección de 2×10^8 ufc/ $100 \mu\text{l}$ de *N. meningitidis*

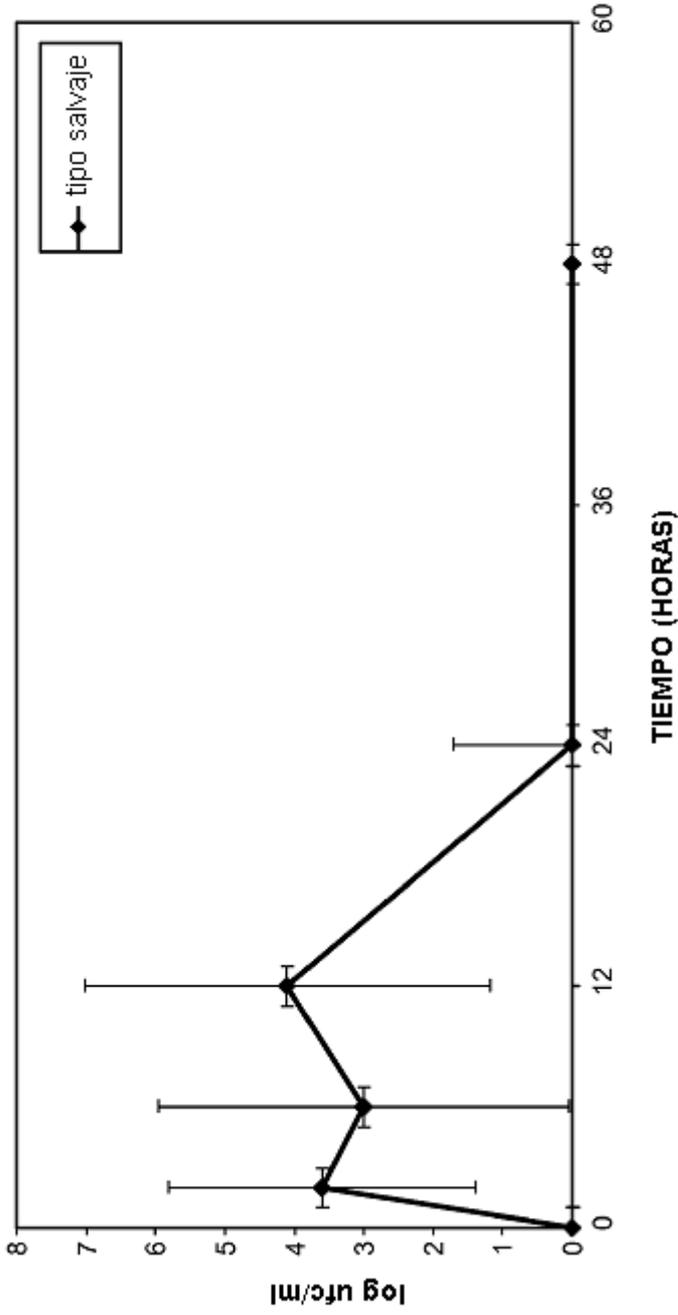


Fig.40B.

ufc de *N. meningitidis* recuperadas en diferentes puntos temporales en sangre de ratones con el gen MASP-2 desactivado tras la infección con 2×10^8 ufc/ $100 \mu\text{l}$ de *N. meningitidis*

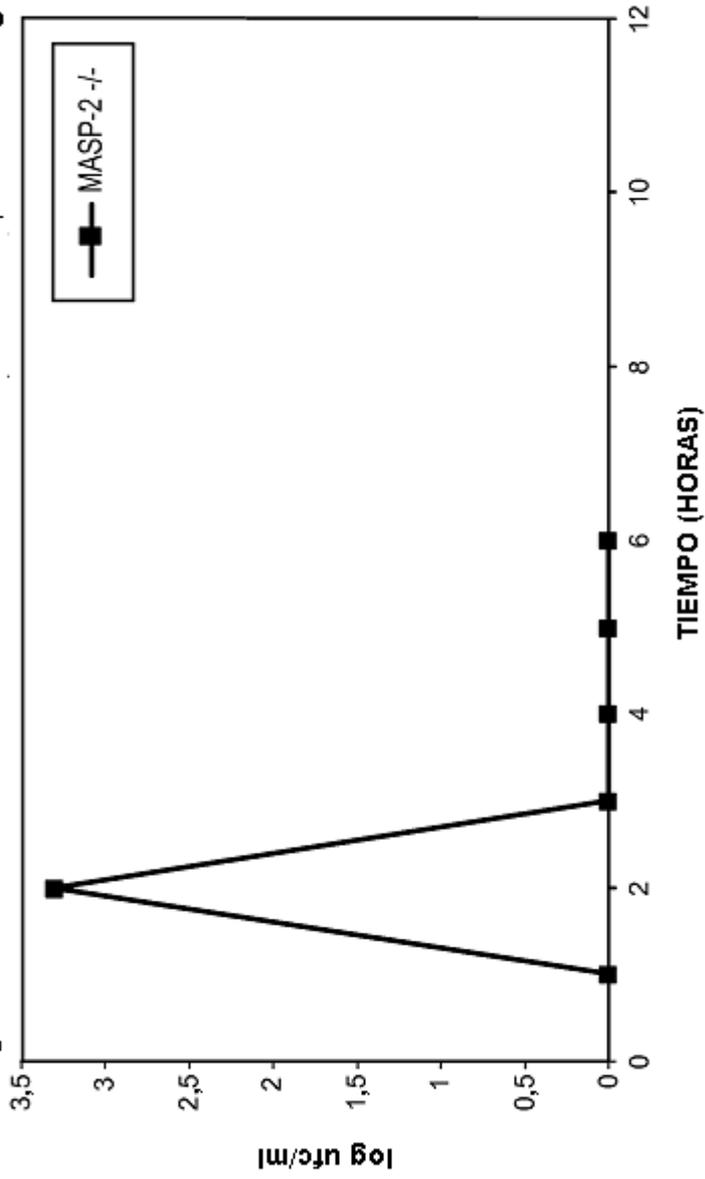


Fig.40C.