

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 127**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)
<b>A61P 13/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/02</b>	(2006.01)
<b>A61P 15/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 13/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/40</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2005 E 10183893 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2465534**

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

30 Prioridad:

**10.06.2004 US 578847 P**

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

**28.08.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 631 127 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

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

**Campo de la invención**

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

**Antecedentes de la invención**

10 El sistema del complemento proporciona un mecanismo de acción temprana para iniciar y ampliar la respuesta inflamatoria a la infección microbiana y otros ataques agudos (M.K. Liszewski y J.P. Atkinson, 1993, en *Fundamental Immunology*, Tercera Edición, editado por W.E. Paul, Raven Press, Ltd., Nueva York). Si bien la activación del complemento proporciona una defensa de primera línea valiosa contra patógenos potenciales, las actividades del complemento que promueven una respuesta inflamatoria protectora pueden también representar una amenaza potencial al hospedante (K.R. Kalli, et al., *Springer Semin. Immunopathol.* 15:417-431, 1994; B.P. Morgan, *Eur. J. Clinical Investig.* 24:219-228, 1994). Por ejemplo, los productos proteolíticos C3 y C5 atraen y activan neutrófilos. Estas células activadas son indiscriminadas en su liberación de enzimas destructivas y pueden causar daño orgánico. Además, la activación del complemento puede causar la deposición de componentes del complemento líticos en células hospedantes aledañas así como también en dianas microbianas, produciendo la lisis de la célula hospedante.

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

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

35 La primera etapa en la activación de la vía clásica es la unión de una molécula de reconocimiento específica, C1q, a IgG e IgM de unión a antígenos. La activación del sistema del complemento produce la activación secuencial de zimógenos de serina proteasa. La C1q está asociada con las proenzimas de serina proteasa C1r y C1s como un complejo llamado C1 y, tras la unión de C1q a un complejo inmune, a la escisión autoproteolítica del sitio Arg-Ile de C1r le sigue la activación por C1r de C1s, que adquiere así la capacidad de escindir C4 y C2. La escisión de C4 en dos fragmentos, denominados C4a y C4b, permite que los fragmentos C4b formen enlaces covalentes con los grupos hidroxilo o amino adyacentes y la subsiguiente generación de convertasa C3 (C4b2b) a través de la interacción no covalente con el fragmento C2b de C2 activada. La convertasa C3 (C4b2b) activa C3, lo que lleva a la generación de la convertasa C5 (C4b2b3b) y a la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b-9) que puede causar lisis microbiana. Las formas activadas de C3 y C4 (C3b y C4b) se depositan covalentemente en las superficies diana exógenas, que son reconocidas por los receptores del complemento en múltiples fagocitos.

50 Independientemente, el primer paso en la activación del sistema del complemento por la vía de lectinas es también la unión de moléculas de reconocimiento específicas, seguida por la activación de serina proteasas asociadas. No obstante, en lugar de la unión de complejos inmunes por C1q, las moléculas de reconocimiento en la vía de lectinas son proteínas unidas a carbohidratos (lectina de unión a manano (MBL), H-ficolina, M-ficolina y L-ficolina) (J. Lu et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1572:387-400, 2002; Holmskov et al., *Annu. Rev. Immunol.* 21:547-578 (2003); Teh et al., *Immunology* 101:225-232 (2000)). Ikeda et al. fueron los primeros en demostrar que, al igual que C1q, la MBL podía activar el sistema del complemento tras la unión a eritrocitos recubiertos con manano en un modo dependiente de C4 (K. Ikeda et al., *J. Biol. Chem.* 262:7451-7454, 1987). La MBL, un miembro de la familia de la proteína colectina, es una lectina dependiente del calcio que se une a carbohidratos con grupos 3 y 4-hidroxi orientados en el plano ecuatorial del anillo piranosico. Por lo tanto, los ligandos prominentes para MBL son D-manosa y N-acetil-D-glucosamina, mientras que los carbohidratos que no cumplen este requerimiento estérico tienen afinidad indetectable hacia MBL (Weis, W.I., et al., *Nature* 360:127-134, 1992). La interacción entre MBL y azúcares

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Las MASP son organizaciones de dominios idénticos a aquellos de C1r y C1s, los componentes enzimáticos del complejo C1 (Sim, R.B., et al., *Biochem. Soc. Trans.* 28:545, 2000). Estos dominios incluyen un dominio morfogénico veg/óseo de erizo de mar/C1r/C1s N-terminal (CUB), un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico, un

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

La MBL está también asociada con una proteína no enzimática denominada proteína asociada a MBL de 19 kDa (MAp19) (Stover, C.M., *J. Immunol.* 162:3481-90, 1999) o proteína pequeña asociada a MBL (sMAP) (Takahashi, M., et al., *Int. Immunol.* 11:859-863, 1999). La MAp19 se forma por el empalme alternativo del producto génico de MASP 2 y comprende los primeros dos dominios de MASP-2, seguidos por una secuencia extra de cuatro aminoácidos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Endo M et al., *Clinical Nephrology*, vol. 55, n° 3, páginas 185-191 (2001); Ohsawa et al., *Clinical immunology*, 101, páginas 59-66 (2001); Ohsawa et al., *Kidney International*, vol. 56, n° 3, páginas 1158 - 1159 (1999); Endo Morito et al., *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 35, n° 3, páginas 401 - 407 (2000); describen la participación de MASP en enfermedades.

#### **Compendio de la invención**

Se describen aquí métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece afecciones renales, incluyendo pero no limitándose a glomerulonefritis mesangioproliferativa, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis membranoproliferativa (glomerulonefritis mesangiocapilar), glomerulonefritis postinfecciosa aguda (glomerulonefritis postreptocócica), glomerulonefritis crioglobulinémica, nefritis lúpica, nefritis púrpura de Henoch-Schonlein o nefropatía por IgA.

Por consiguiente, la invención proporciona un agente inhibidor de MASP-2 para uso en el tratamiento de un sujeto que padece una afección renal mediada por complemento de MASP-2 seleccionada del grupo que consiste en glomerulonefritis mesangioproliferativa, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis membranoproliferativa (glomerulonefritis mesangiocapilar), glomerulonefritis post-infecciosa aguda (glomerulonefritis postreptocócica), glomerulonefritis crioglobulinémica, nefritis lúpica, nefritis púrpura de Henoch-Schonlein y nefropatía por IgA, en donde el agente inhibidor de MASP-2 es un anticuerpo anti-MASP-2 o fragmento del mismo que se une específicamente a una porción de la SEQ ID NO: 6 e inhibe selectivamente la activación del complemento dependiente de MASP-2 sin inhibir sustancialmente la activación del complemento dependiente de C1q.

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

El agente inhibidor de MASP-2 es un anticuerpo anti-MASP-2 o un fragmento del mismo. El anticuerpo anti-MASP-2 puede tener la función efectora reducida. También se describen en la presente memoria composiciones para inhibir los efectos adversos de la activación del complemento dependiente de MASP-2, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se describen métodos para elaborar medicamentos para usar en la inhibición de los efectos adversos de la activación del complemento dependiente de MASP-2 en sujetos vivos que lo necesitan, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico. También se describen métodos para elaborar medicamentos para uso en la inhibición de la activación del complemento dependiente de MASP-2 para el tratamiento de cada una de las afecciones, enfermedades o trastornos que se describen a continuación en este documento.

Los métodos, composiciones y medicamentos descritos en este documento son útiles para inhibir los efectos adversos de la activación del complemento dependiente de MASP-2 *in vivo* en sujetos mamíferos, incluidos seres humanos que padecen una afección o lesión patológica aguda o crónica como se describirá en más detalle en la presente memoria. En la presente memoria también se describen métodos para el tratamiento de lesiones de reperfusión por isquemia, tratando a un sujeto que experimenta una reperfusión isquémica, lo que incluye, de manera no taxativa, después de la reparación de un aneurisma aórtico, derivación cardiopulmonar, renastomosis

vascular en relación con, por ejemplo, trasplante de órgano (p. ej., de corazón, pulmón, hígado, riñón) y/o reimplante de una extremidad/dígito, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, reanimación hemodinámica después de procedimientos de choque y/o quirúrgicos, con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico.

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

También se describen en la presente memoria métodos para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que experimenta una afección vascular que incluye, sin limitación, afecciones cardiovasculares, afecciones cerebrovasculares, afecciones periféricas (p. ej. musculoesqueléticas) afecciones vasculares, afecciones renovasculares, vasculares mesentéricas/entéricas y revascularización a trasplantes y/o reimplantes, tratando a dichos pacientes con una cantidad terapéuticamente eficaz de agente inhibidor de MASP-2. Dichas afecciones incluyen, sin limitación, el tratamiento de: vasculitis, incluida nefritis púrpura de Henoch-Schonlein, vasculitis asociada a lupus eritematoso sistémico, vasculitis asociada a artritis reumatoidea (también llamada artritis reumatoidea maligna), vasculitis del complejo inmunológico y enfermedad de Takayasu; cardiomiopatía dilatada; angiopatía diabética; enfermedad de Kawasaki (arteritis); embolia gaseosa venosa (VGE); y/o restenosis que sigue a la colocación de un stent, aterectomía rotacional y/o angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Breve descripción de los dibujos**

Los métodos anteriores y muchas de las ventajas asociadas de esta invención se apreciarán más fácilmente a medida que los mismos se comprendan mejor por referencia a la siguiente descripción detallada, tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que:

- 30 Los métodos anteriores y muchas de las ventajas asociadas de esta invención se apreciarán más fácilmente a medida que los mismos se comprendan mejor por referencia a la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que:

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

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

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

40 la Figura 3B es un diagrama esquemático que ilustra la estructura de dominio de la proteína MASP19 humana;

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

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

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

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

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

la Figura 7A presentas resultados que demuestran que la deficiencia de MASP-2 produce la pérdida de activación de C3 mediada por la vía de lectinas y mediada por la vía alternativa, según lo medido por la falta

de deposición de C3b en manano;

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

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

la Figura 9 presenta que demuestran que la vía clásica es funcional en la cepa de MASP-2<sup>-/-</sup>; y

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

**Descripción de la lista de secuencias**

SEC ID NO: 1 ADNc de MAp19 humana

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

15 SEC ID NO: 3 proteína MAp19 humana (madura)

SEC ID NO: 4 ADNc de MASP-2 humana

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

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

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

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

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

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

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

SEC ID NO: 11 región EGF (aa 122-166)

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

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

SEC ID NO: 14 TPLGPKWPEPVFGRL (péptido CUBI)

SEC ID NO: 15

TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLC GQ (péptido CUBI)

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

SEC ID NO: 17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (región de unión a MBL)

SEC ID NO: 18 IDECQVAPG (PÉPTIDO EGF)

SEC ID NO: 19 ANMLCAGLESGGKDSRGDSSGGALV (núcleo de la región de unión a serina proteasa)

INHIBIDORES DE PÉPTIDOS:

35 SEC ID NO: 20 ADNc de longitud total MBL

SEC ID NO: 21 proteína de longitud total MBL

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

SEC ID NO: 23 OGKLG

SEC ID NO: 24 GLR GLQ GPO GKL GPO G

## ES 2 631 127 T3

SEC ID NO: 25 GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GPO GPO

SEC ID NO: 26 GKDGRDGTKGEKGEPGQGLRGLQGPOGKLGPOG

SEC ID NO: 27 GAOGSOGEEKGAOGPQGPOGPOGKMGPKGEOGDO (h-ficolina humana)

SEC ID NO: 28

5 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOGPN GAOGEO (ficolina humana p35)

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

INHIBIDORES DE EXPRESIÓN:

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

SEC ID NO: 31

10 5' CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC 3'

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

SEC ID NO: 32

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

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

SEC ID NO: 33

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

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

CEBADORES DE CLONACIÓN:

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

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

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

SEC ID NO: 37 GGAATTCCTAGTAGTGGAT (3' PCR PARA CUB IEGFCUBII)

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

25 SEC ID NO: 48 es un enlace peptídico 9 aa

VECTOR DE EXPRESIÓN:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

generar MASP-2A de rata

**Descripción detallada**

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de los presentes inventores de que la MASP-2 es necesaria para iniciar la activación de la vía del complemento alternativa. A través del uso de un modelo de ratón con genes inactivados de MASP-2<sup>-/-</sup>, los presentes inventores han demostrado que es posible inhibir la activación de la vía del complemento alternativa mediante la vía de MASP-2 mediada por lectinas, dejando la vía clásica intacta, estableciendo así la activación de MASP-2 dependiente de lectinas como un requerimiento para la activación del complemento alternativa en ausencia de la vía clásica. La presente invención describe también el uso de MASP-2 como diana terapéutica para inhibir la lesión celular asociada con la activación de la vía del complemento alternativa mediada por lectinas, dejando intacto el componente de la vía clásica (dependiente de C1q) del sistema inmunológico.

I. Definiciones

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

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

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

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

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

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "agente inhibidor de MASP-2" se refiere a cualquier agente que inhibe o actúa con la MASP-2 e inhibe eficazmente la activación del complemento dependiente de MASP-2, incluidos los anticuerpos anti-MASP-2 y sus fragmentos de unión a MASP-2, péptidos naturales y sintéticos, moléculas pequeñas, receptores de MASP-2 solubles, inhibidores de expresión e inhibidores naturales aislados. Los agentes de inhibición de MASP-2 útiles en el método de la invención pueden reducir la activación del complemento dependiente de MASP-2 por más de 20%, tal como más de 50%, tal como más de 90%. En una realización, el agente inhibidor de MASP-2 reduce la activación del complemento dependiente de MASP-2 por más de 90% (es decir, resultando en la activación del complemento de MASP-2 de solamente 10% o menos).

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

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

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

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

5 Tal como se emplea en la presente memoria, un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo quimérico que comprende una secuencia mínima que conforma regiones determinantes de complementaridad específicas de inmunoglobulina humana que es trasplantada en un marco de anticuerpo humano. Los anticuerpos humanizados son proteínas típicamente recombinantes en las que solamente las regiones determinantes de complementaridad del anticuerpo son de origen no humano.

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

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

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

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

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

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

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

## 35 II. La vía alternativa, una nueva comprensión

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

55 Estos resultados ofrecen una fuerte evidencia de que la vía alternativa no es una vía independiente, autónoma de la activación del complemento como se describe esencialmente en todos los libros de texto médicos y en los artículos de revisión recientes sobre el complemento. La visión actual y ampliamente sostenida es que la vía alternativa se activa en la superficie de ciertas dianas particuladas (microbios, cimosano, eritrocitos de conejo) a través de la

ampliación de la activación de C3 espontánea "poco avanzada". Sin embargo, la ausencia de activación importante de la vía alternativa en el suero de ratones con genes inactivados de MASP-2 por dos "activadores" conocidos de la vía alternativa hace que sea improbable que la "teoría poco avanzada" describa un mecanismo fisiológico importante de activación del complemento.

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

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

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

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

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

## III Afecciones renales

Se ha implicado a la activación del sistema del complemento en la patogénesis de una amplia gama de enfermedades renales; incluidas glomerulonefritis mesangioproliferativa (nefropatía IgA, enfermedad de Berger) (Endo, M., et al., *Clin. Nephrology* 55:185-191, 2001), glomerulonefritis membranosa (Kerjashki, D., *Arch B Cell Pathol.* 58:253-71, 1990; Brenchley, P.E., et al., *Kidney Int.*, 41:933-7, 1992; Salant, D.J., et al., *Kidney Int.* 35:976-84, 1989), glomerulonefritis membranoproliferativa (glomerulonefritis mesangiocapilar) (Bartlow, B.G., et al., *Kidney Int.* 15:294-300, 1979; Meri, S., et al., *J. Exp. Med.* 175:939-50, 1992), glomerulonefritis postinfecciosa aguda (glomerulonefritis postestreptocócica), glomerulonefritis crioglobulinémica (Ohsawa, I., et al., *Clin Immunol.* 101:59-66, 2001), nefritis por lupus (Gatenby, P.A., *Autoimmunity* 11:61-6, 1991) y nefritis por púrpura de Henoch-Schonlein (Endo, M., et al., *Am. J. Kidney Dis.* 35:401-407, 2000). Se ha apreciado la participación del complemento en la enfermedad renal durante varias décadas, pero todavía existe un debate importante en cuanto a su función exacta en la fase de inicio, de desarrollo y de resolución de la enfermedad renal. Bajo condiciones normales, la contribución del complemento es beneficiosa para el hospedante, pero la activación inadecuada y la deposición del complemento pueden contribuir al daño del tejido.

Existen datos sustanciales de que la glomerulonefritis, la inflamación de los glomérulos, a menudo se inicia por deposición de complejos inmunes en estructuras glomerulares o tubulares que luego desencadena la activación del complemento, la inflamación y el daño del tejido. Kahn y Sinniah demostraron un aumento de la deposición de C5b-9 en las membranas basales tubulares en biopsias de pacientes con diversas formas de glomerulonefritis (Kahn, T.N., et al., *Histopath.* 26:351-6, 1995). En un estudio de pacientes con nefrología IgA (Alexopoulos, A., et al., *Nephrol. Dial. Transplant* 10:1166-1172, 1995), la deposición de C5b-9 en las estructuras de la membrana basal tubulares/epiteliales se correlacionó con niveles de creatinina en el plasma. Otro estudio de nefropatía membranosa demostró una relación entre el desenlace y los niveles de sC5b-9 en la orina (Kon, S.P., et al., *Kidney Int.* 48:1953-58, 1995). Los niveles de sC5b-9 elevados se correlacionaron positivamente con un mal pronóstico. Lehto et al., midieron niveles elevados de CD59, un factor regulador del complemento que inhibe el complejo de ataque a la membrana en las membranas plasmáticas, así como también C5b-9 en orina de pacientes con glomerulonefritis membranosa (Lehto, T., et al., *Kidney Int.* 47:1403-11, 1995). El análisis histopatológico de muestras de biopsias tomadas de estos pacientes demostró deposición de proteínas C3 y C9 en los glomérulos, mientras que la expresión de CD59 en estos tejidos disminuyó en comparación con aquella del tejido renal normal. Estos diversos estudios sugieren que la glomerulonefritis constante mediada por el complemento produce excreción urinaria de las proteínas del complemento que se correlaciona con el grado de daño al tejido y pronóstico de la enfermedad.

La inhibición de la activación del complemento en diversos modelos animales de glomerulonefritis también ha demostrado la importancia de la activación del complemento en la etiología de la enfermedad. En un modelo de glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN), la infusión de antisuero anti-Thy1 en ratas deficientes de C6- (que no pueden formar C5b-9) resultó en 90% menos de proliferación celular glomerular, 80% de reducción de plaquetas e infiltración de macrófagos, disminución de la síntesis de colágeno de tipo IV (un marcador para la expansión de la matriz mesangial) y 50% menos de proteinuria que en ratas normales C6+ (Brandt, J., et al., *Kidney Int.* 49:335-343, 1996). Estos resultados implican a C5b-9 como un mediador importante del daño al tejido por el complemento en este modelo de suero anti-timocito de rata. En otro modelo de glomerulonefritis, la infusión de dosis graduales de membrana basal antirrata de conejo produjo un flujo de leucocitos polimorfonucleares (PMN) dependiente de la dosis que se atenuó con el tratamiento previo con el factor de veneno de cobra (para consumir el complemento) (Scandrett, A.L., et al., *Am. J. Physiol.* 268:F256-F265, 1995). Las ratas tratadas con el factor de veneno de cobra también demostraron menos histopatología, menos proteinuria a largo plazo y menos niveles de creatinina que las ratas control. Al emplear tres modelos de GN en ratas (suero anti-timocito. Con A anti-Con A y nefritis pasiva de Heymann), Couser et al., demostraron la eficacia terapéutica potencial de los enfoques para inhibir el complemento usando la proteína sCR1 recombinante (Couser, W.G., et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 5:1888-94, 1995). Las ratas tratadas con sCR1 demostraron una importante reducción de PMN, plaquetas e influjo de macrófagos, menos mesangiólisis y proteinuria frente a las ratas control. Se han aportado otros datos de la importancia de la activación del complemento en la glomerulonefritis mediante el uso de un anti-C5 MoAb en el modelo de ratón NZB/W F1. El anti-C5 MoAb inhibe la escisión de C5, bloqueando así la generación de C5a y C5b-9. La terapia continua con anti-C5 MoAb durante 6 meses produjo la mejoría del curso de la glomerulonefritis. Un anticuerpo monoclonal anti-C5 MoAb humanizado (5G1.1) que previene la escisión del componente del complemento humano C5 en sus componentes pro-inflamatorios está bajo desarrollo por Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut, como tratamiento potencial de la glomerulonefritis.

Evidencia directa de una función patológica del complemento en la lesión renal es provista por estudios de pacientes con deficiencias genéticas en los componentes del complemento específicos. Una serie de informes han documentado una asociación de la enfermedad renal con deficiencias del factor regulador del complemento H (Ault, B.H., *Nephrol.* 14:1045-1053, 2000; Levy, M., et al., *Kidney Int.* 30:949-56, 1986; Pickering, M.C., et al., *Nat. Genet.* 31:424-8, 2002). La deficiencia del factor H resulta en bajos niveles en plasma del factor B y C3, y en el consumo de C5b-9. Tanto la glomerulonefritis membranoproliferativa atípica (MPGN) como el síndrome urémico hemolítico idiopático (HUS) están asociados con la deficiencia del factor H. Cerdos deficientes del factor H (Jansen, J.H., et al., *Kidney Int.* 53:331-49, 1998) y ratones con genes inactivados del factor H (Pickering, M.C., 2002) exhiben síntomas de tipo MPGN, confirmando la importancia del factor H en la regulación del complemento. Las deficiencias de otros componentes del complemento están asociadas con enfermedad renal, secundaria al desarrollo de lupus

eritematoso sistémico (SLE) (Walport, M.J., Davies, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 815:267-81, 1997). La deficiencia de C1q, C4 y C2 predispone fuertemente al desarrollo de SLE mediante mecanismos relacionados con el aclaramiento defectuoso de complejos inmunes y material apoptótico. En muchos de estos pacientes con SLE tiene lugar la nefritis por lupus, que se caracteriza por la deposición de complejos inmunes a través de los glomerulos.

5 Otros datos que vinculan la activación del complemento con la enfermedad renal han sido proporcionados por la identificación en pacientes con autoanticuerpos dirigidos contra los componentes del complemento, algunos de los cuales se han relacionado directamente con enfermedad renal (Trouw, L.A., et al., *Mol. Immunol.* 38:199-206, 2001). Una serie de estos autoanticuerpos demuestran un grado tal de correlación con la enfermedad renal que se introdujo el término factor nefrítico (NeF) para indicar esta actividad. En estudios clínicos, aproximadamente el 50% de los  
10 pacientes positivos para factores nefríticos desarrollaron MPGN (Spitzer, R.E., et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 64:177-83, 1992). C3NeF es un autoanticuerpo dirigido contra la convertasa C3 de la vía alternativa (C3bBb) y estabiliza esta convertasa, promoviendo así la activación de la vía alternativa (Daha, M.R., et al., *J. Immunol.* 116:1-7, 1976). Asimismo, el autoanticuerpo con una especificidad para la convertasa C3 de la vía clásica (C4b2a), llamado C4NeF, estabiliza esta convertasa y promueve así la activación de la vía clásica (Daha, M.R. et al., *J. Immunol.* 125:2051-2054, 1980; Halbwachs, L., et al., *J. Clin. Invest.* 65:1249-56, 1980). Se ha descrito que los autoanticuerpos anti-C1q están relacionados con la nefritis en pacientes con SLE (Hovath, L., et al., *Clin. Exp. Rheumatol.* 19:667-72, 2001; Siegert, C., et al., *J. Rheumatol.* 18:230-34, 1991; Siegert, C., et al., *Clin. Exp. Rheumatol.* 10:19-23, 1992), y se describió que un aumento en la titulación de estos autoanticuerpos anti-C1q pronostica un brote de nefritis (Coremans, I.E., et al., *Am. J. Kidney Dis.* 26:595-601, 1995). Los depósitos inmunes  
20 eluidos de riñones postmórtem de pacientes con SLE revelaron la acumulación de estos autoanticuerpos anti-C1q (Mannick, M., et al., *Arthritis Rheumatol.* 40:1504-11, 1997). Todos estos hechos señalan la función patológica de estos autoanticuerpos. No obstante, no todos los pacientes con autoanticuerpos anti-C1q desarrollan enfermedad renal y también algunos individuos sanos tienen autoanticuerpos anti-C1q de baja titulación (Siegert, C.E., et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 67:204-9, 1993).

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

35 Un aspecto de la invención se refiere entonces al uso de ciertos anticuerpos o fragmentos de los mismos en el tratamiento de afecciones renales que incluyen, aunque sin limitarse a ello, glomerulonefritis mesangioproliferativa, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis membranoproliferativa (glomerulonefritis mesangiocapilar), glomerulonefritis post-infecciosa aguda (glomerulonefritis estreptocócica), glomerulonefritis crioglobulinémica, nefritis por lupus, nefritis por púrpura de Henoch-Schonlein o nefropatía IgA, administrando una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a  
40 un sujeto que padece dicho trastorno. El agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto en forma sistémica, tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, subcutánea u otra administración parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. El agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse periódicamente por un periodo de tiempo extenso para el tratamiento o el control de una afección crónica, o puede ser una administración única o repetida en el periodo, anterior, durante o posterior al  
45 trauma o lesión aguda.

#### IV. Agentes inhibidores de MASP-2

Se describen métodos para inhibir los efectos de la activación del complemento dependiente de MASP-2. Los agentes inhibidores de MASP-2 se administran en una cantidad eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto vivo. Los agentes inhibidores de MASP-2 descritos incluyen moléculas que  
50 inhiben la actividad biológica de MASP-2 (tal como los inhibidores de moléculas pequeñas, anticuerpos anti-MASP-2 o péptidos bloqueantes que interactúan con MASP-2 o interfieren con una interacción proteína-proteína) y moléculas que reducen la expresión de MASP-2 (tales como las moléculas de ácido nucleico antisentido de MASP-2, moléculas de ARNi específicas de MASP-2 y ribozimas de MASP-2), previniendo así que la MASP-2 active las vías del complemento alternativas. Los agentes inhibidores de MASP-2 se pueden usar solos como terapia primaria o combinados con otros agentes terapéuticos como terapia adyuvante para potenciar los beneficios terapéuticos de otros tratamientos médicos.

La inhibición de la activación del complemento dependiente de MASP-2 se caracteriza por al menos uno de los siguientes cambios en un complemento del sistema del complemento que ocurre como resultado de la administración de un agente inhibidor de MASP-2 de acuerdo con los métodos de la invención: la inhibición de  
60 la generación o producción de productos del sistema de activación del complemento dependientes de MASP-2 C4b, C3a, C5a y/o C5b-9 (MAC) (medida, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2), la reducción de la activación

del complemento alternativa evaluada en un ensayo hemolítico que emplea glóbulos rojos de conejo o cobaya insensibilizados, la reducción de escisión de C4 y deposición de C4b (medida, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2) o la reducción de la escisión de C3 y la deposición de C3b (medida, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2).

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

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

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

20 El polipéptido de MASP-2 exhibe una estructura molecular similar a MASP-1, MASP-3, y C1r y C1s, las proteasas del sistema del complemento C1. La molécula de ADNc expuesta en la SEC ID NO: 4 codifica un ejemplo representativo de MASP-2 (que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO: 5) y proporciona el polipéptido de MASP-2 humano con una secuencia líder (aa 1-15) que se escinde después de la segregación, resultando en la forma madura de MASP-2 humana (SEC ID NO: 6). Como se muestra en la FIGURA 2, el gen *MASP 2* humano abarca doce exones. El ADNc de MASP-2 humano es codificado por los exones B, C, D, F, G, H, I, J, K y L. Un empalme alternativo produce la proteína de 20 kDa denominada proteína asociada a MBL 19 ("MAP19") (SEC ID NO: 2), codificada por (SEC ID NO: 1) que surge de los exones B, C, D y E, como se muestra en la FIGURA 2. La molécula de ADNc expuesta en la SEC ID NO:50 codifica la MASP-2 de murino (que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO: 51) y proporciona el polipéptido de MASP-2 murino con una secuencia líder que se escinde después de la segregación, resultando en la forma madura de MASP-2 murina (SEC ID NO: 52). La molécula de ADNc expuesta en la SEC ID NO: 53 codifica la MASP-2 de rata (que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO: 54) y proporciona el polipéptido MASP-2 de rata con una secuencia líder que se escinde después de la segregación, resultando en la forma madura de MASP-2 de rata (SEC ID NO: 55).

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

40 Los dominios de la proteína MASP-2 humana (SEC ID NO: 6) se muestran en la FIGURA 3A e incluyen un dominio de la proteína morfogénica C1r/C1s/de erizo de mar Vegf/ósea N-terminal (CUBI) (aa 1-121 de SEC ID NO: 6), un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico (aa 122-166), un segundo dominio CUBI (aa 167-293), además de un tándem de dominios de proteínas de control del complemento y un dominio de serina proteasa. El empalme alternativo del gen *MASP 2* resultante en MAP19 que se muestra en la FIGURA 3B. MAP19 es una proteína no enzimática que contiene la región CUBI-EGF N-terminal de MASP-2 con cuatro residuos adicionales (EQSL) derivados del exón E, como se muestra en la FIGURA 2.

45 Se ha demostrado que varias proteínas se unen a, o interactúan con MASP-2 a través de interacciones de proteína a proteína. Por ejemplo, se sabe que MASP-2 se une y forma complejos dependientes del  $Ca^{2+}$  con proteínas lectina MBL, H-ficolina y L-ficolina. Se ha demostrado que cada complejo MASP-2/lectina activa el complemento a través de la escisión dependiente de MASP-2 de las proteínas C4 y C2 (Ikeda, K., et al., *J. Biol. Chem.* 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M. et al., *J. Exp. Med.* 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). Se ha demostrado también que los dominios CUBIEGFCUBII median la dimerización de MASP-2, que se requiere para la formación de un complejo activo de MBL (Wallis, R., et al., *J. Biol. Chem.* 275:30962-30969, 2000). En consecuencia, se pueden identificar agentes inhibidores de MASP-2 que se unen a o interfieren con la regiones diana de MASP-2 conocidas por ser importantes para la activación del complemento dependiente de MASP-2.

## Anticuerpos anti-MASP-2

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

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

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

ANTÍGENO	TIPO DE ANTICUERPO	REFERENCIA
MASP-2 recombinante	Policlonal de rata	Peterson, S.V., et al., <i>Mol. Immunol.</i> 37:803-811, 2000
Fragmento CCP1/2-SP (MoAb 8B5) recombinante humano	MoAb de rata (subclase IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., <i>J. of Immunol. Methods</i> 282:159-167, 2003
MAp19 (MoAb 6G12) recombinante humano (reacción cruzada con MASP-2)	MoAb de rata (subclase IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., <i>J. of Immunol. Methods</i> 282:159-167, 2003
MASP-2	MoAb de ratón	Peterson, S.V., et al., <i>Mol. Immunol.</i> 35:409

## Anticuerpos anti-MASP-2 con función efectora reducida

Los anticuerpos anti-MASP-2 pueden tener función efectora reducida para reducir la inflamación que puede surgir de la activación de la vía del complemento clásica. Se ha demostrado que la capacidad de las moléculas de IgG de desencadenar la vía del complemento clásica reside dentro de la porción Fc de la molécula (Duncan, A.R., et al., *Nature* 332:738-740 1988). Las moléculas IgG en las que la porción Fc de la molécula ha sido extraída por escisión enzimática están desprovistas de esta función efectora (véase Harlow, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988). Por consiguiente, los anticuerpos con función efectora reducida pueden generarse como consecuencia de la ausencia de la porción Fc de la molécula, teniendo una secuencia Fc genéticamente modificada que minimiza la función efectora, o siendo o bien el isotipo IgG2 o IgG4 humano.

Los anticuerpos con función efectora reducida pueden producirse por manipulación biológica molecular estándar de la porción Fc de las cadenas pesadas de IgG, como se describe en el Ejemplo 9 del presente documento y también en Jolliffe, et al., *hit'l Rev. Immunol.* 10:241-250, 1993, y en Rodrigues, et al., *J. Immunol.* 151:6954-6961, 1998. Los anticuerpos con función efectora reducida también incluyen los isotipos IgG2 e IgG4 humanos que tienen la capacidad reducida de activar el complemento y/o interactuar con los receptores de Fc (Ravetch, J.V., et al., *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492, 1991; Isaacs, J.D., et al., *J. Immunol.* 148:3062-3071, 1992; van de Winkel, J.G., et al., *Immunol. Today* 14:215-221, 1993). Los anticuerpos humanizados o completamente humanos específicos de MASP-2 humana comprendidos por los isotipos IgG2 o IgG4 se pueden producir mediante uno de los diversos métodos conocidos por el experto en la técnica, como se describe en Vaughan, T.J., et al., *Nature Biotechnical* 16:535-539, 1998.

## Producción de anticuerpos anti-MASP-2

Los anticuerpos anti-MASP-2 se pueden producir usando polipéptidos MASP-2 (p. je., MASP-2 de longitud total) o usando péptidos que portan el epítipo de MASP-2 antigénico (p. ej., una porción del polipéptido MASP-2). Los péptidos inmunogénicos pueden ser tan pequeños como de tan solo cinco residuos de aminoácidos. Por ejemplo, el polipéptido MASP-2, incluida la secuencia de aminoácidos completa de SEC ID NO: 6, se pueden usar para inducir anticuerpos anti-MASP-2 útiles en el método de la invención. Dominios de MASP-2 particulares conocidos por estar

implicados en las interacciones proteína-proteína, tal como los dominios CUBI y CUBIEGF, así como también la región que abarca el sitio activo de serina proteasa, se pueden expresar como polipéptidos recombinantes, como se describe en el Ejemplo 5, y usarse como antígenos. A su vez, los péptidos que comprenden una porción de por lo menos 6 aminoácidos del polipéptido MASP-2 (SEC ID NO: 6) son también útiles para inducir anticuerpos MASP-2. Ejemplos adicionales de antígenos derivados de MASP-2 útiles para inducir los anticuerpos de MASP-2 se dan a conocer en la TABLA 2 a continuación. Los péptidos y polipéptidos MASP-2 utilizados para crear anticuerpos se pueden aislar como polipéptidos naturales o como péptidos recombinantes o sintéticos y como polipéptidos recombinantes catalíticamente inactivos, tal como MASP-2A, como se describe en más detalle en los Ejemplos 5-7. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, los anticuerpos anti-MASP-2 se obtienen usando una cepa de ratón transgénico, como se describe en los Ejemplos 8 y 9 como se describirá en detalle a continuación.

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

Tabla 2: Antígenos derivados de MASP-2

SEC ID NO:	Secuencia de aminoácidos
SEC ID NO: 6	Proteína MASP-2 humana
SEC ID NO: 51	Proteína MASP-2 murina
SEC ID NO: 8	Dominio CUBI de MASP-2 humana (aa 1-121 de SEC ID NO: 6)
SEC ID NO: 9	Dominios CUBIEGF de MASP-2 humana (aa 1-166 de SEC ID NO: 6)
SEC ID NO: 10	Dominios CUBIEGFCUBII de MASP-2 humana (aa 1-293 de SEC ID NO: 6)
SEC ID NO: 11	Dominio EGF de MASP-2 humana (aa 122-166 de SEC ID NO: 6)
SEC ID NO: 12	Dominio serina proteasa de MASP-2 humana (aa 429-671 de SEC ID NO: 6)
SEC ID NO: 13 GKDSCRGDAGGALVFL	Forma mutante inactivada de serina-proteasa (aa 610-625 de SEC ID NO: 6 con Ser 618 mutado)
SEC ID NO: 14 TPLGPKWPEPVFGRL	Péptido CUBI humano
SEC ID NO: 15: TAPPGYRLRLYFTHFDLEL SHLCEYDFVKLSSGAKVL ATLCGQ	Péptido CUBI humano
SEC ID NO: 16: TFRSDYSN	Región de unión a MBL en el dominio CUBI humano
SEC ID NO: 17: FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF	Región de unión a MBL en el dominio CUBI humano
SEC ID NO: 18 IDECQVAPG	Péptido EGF
SEC ID NO: 19 ANMLCAGLESGGKDCRSDSGGALY	Péptido del sitio activo serina-proteasa

Anticuerpos policlonales

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

Losman, M.J., et al., *Int. J. Cancer* 46:310, 1990. Los sueros que contienen anticuerpos inmunológicamente activos se producen luego de la sangre de dichos animales inmunizados, usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

#### Anticuerpos monoclonales

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

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

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

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

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

El experto en la técnica puede determinar fácilmente la afinidad de los anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 (véase, p. ej., Scatchard, A., *NY Acad. Sci.* 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.

#### 55 Anticuerpos quiméricos/humanizados

Los anticuerpos monoclonales útiles en el método de la invención incluyen anticuerpos quiméricos en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que

el resto de la cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como también fragmentos de dichos anticuerpos (patente estadounidense núm. 4.816.567 para Cabilly, y Morrison, S.L., et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE. UU.* 81:6851-6855, 1984).

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

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

Un ejemplo de la generación de un anticuerpo anti-MASP-2 humanizado de un anticuerpo monoclonal anti-MASP-2 murino se provee en el Ejemplo 10. Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales también se describen, por ejemplo, en Jones, P.T., et al., *Nature* 321:522, 1986; Carter, P., et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE. UU.* 89:4285, 1992; Sandhu, J.S., *Crit. Rev. Biotech.* 12:437, 1992; Singer, I.I., et al., *J. Immun.* 150:2844, 1993; Sudhir (ed.), *Antibody Engineering Protocols*, Humana Press, Inc., 1995; Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies," en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., páginas 399-434, 1996; y en la patente estadounidense núm. 5.693.762 para Queen, 1997. Además, existen entidades comerciales que sintetizan anticuerpos humanizados de regiones específicas de anticuerpos murinos, como Protein Design Labs (Mountain  
30 View, CA).

#### Anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos anti-MASP-2 también se pueden preparar usando métodos recombinantes. Por ejemplo, los anticuerpos humanos se pueden preparar usando bibliotecas de expresión de inmunoglobulina humana (disponibles, por ejemplo, de Stratagene, Corp., La Jolla, CA) para producir fragmentos de anticuerpos humanos (Vj, VI, Fv, Fd, Fab o F(ab')<sub>2</sub>). Estos fragmentos se usan luego para construir anticuerpos humanos completos similares a aquellos  
40 usados para producir anticuerpos quiméricos.

#### Anticuerpos anti-idiotipo

Una vez que se identifican los anticuerpos anti-MASP-2 con la actividad inhibidora deseada, estos anticuerpos se pueden utilizar para generar anticuerpos anti-idiotipo que se asemejan a una porción de MASP-2 usando técnicas conocidas en el campo. Véase, p. ej., Greenspan, N.S., et al., *FASEB J.* 7:437, 1993. Por ejemplo, los anticuerpos que se unen a MASP-2 e inhiben competitivamente una interacción de las proteínas MASP-2 requerida para la activación del complemento se pueden utilizar para generar anti-idiotipos que se asemejan al sitio de unión a MBL en la proteína MASP-2 y por ende se unen y neutralizan un ligando de unión de MASP-2, tal como, por ejemplo, MBL.  
45

#### Fragmentos de inmunoglobulina

Los agentes inhibidores de MASP-2 útiles en el método de la invención abarcan no solamente moléculas de inmunoglobulina intactas, sino también fragmentos conocidos, incluidos fragmentos de Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub> y Fv, scFv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

55 Se sabe bien en la técnica que solamente una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el paratopo, está implicada en la unión del anticuerpo a su epitopo (véase, p. ej., Clark, W.R., *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986). Las regiones pFc' y Fc del anticuerpo son efectoras de la vía del complemento clásica, pero no están implicadas en la unión al antígeno. Un anticuerpo del cual la región pFc' ha sido

enzimáticamente escindida, o que ha sido producido sin la región pFc', se denomina fragmento F(ab')<sub>2</sub> y retiene ambos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo intacto. Un fragmento de F(ab')<sub>2</sub> aislado se denomina fragmento monoclonal bivalente debido a sus dos sitios de unión al antígeno. De modo similar, un anticuerpo del cual la región Fc ha sido enzimáticamente escindida, o que ha sido producido sin la región Fc, se denomina fragmento Fab, y

5 retiene uno de los sitios de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo intacta.

Los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener por hidrólisis proteolítica, tal como por digestión de pepsina o papaína de anticuerpos enteros por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden producir por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proveer un fragmento 5S denominado F(ab')<sub>2</sub>-Este fragmento puede además escindirse empleando un agente reductor de tiol para producir fragmentos

10 monovalentes 3.5S Fab'. Opcionalmente, la reacción de escisión puede realizarse usando un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de enlaces disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática que usa pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. núm. 4.331.647 para Goldenberg; Nisonoff, A., et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230, 1960; Porter, R.R., *Biochem. J.* 73:119, 1959; Edelman, et al., en *Methods in Enzymology*, 1:422, Academic Press, 1967; y en Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4.

En algunas realizaciones, el uso de los fragmentos de anticuerpo que carecen de la región Fc se prefieren para evitar la activación de la vía del complemento clásica que se inicia tras la unión de Fc al receptor de Fc $\gamma$ . Hay varios métodos mediante los cuales uno puede producir un MoAb que evita las interacciones con el receptor de Fc $\gamma$ . Por ejemplo, la región Fc de un anticuerpo monoclonal puede eliminarse químicamente usando digestión parcial por

20 enzimas proteolíticas (tales como digestión de ficina), generando así, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno, tales como fragmentos Fab o F(ab)<sub>2</sub> (Mariani, M., et al., *Mol. Immunol.* 28:69-71, 1991).

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

25 técnicas recombinantes como se describe en la presente memoria.

#### Fragmentos de anticuerpos monocatenarios

Alternativamente, uno puede crear moléculas de unión a péptidos sencillos específicas de MASP-2 en donde las regiones Fv de las cadenas pesada y ligera están conectadas. Los fragmentos Fv pueden estar conectados por un enlazador peptídico para formar una proteína de unión al antígeno monocatenaria (scFv). Estas proteínas de unión

30 al antígeno monocatenarias se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que están conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula hospedante tal como *E. coli*. Las células hospedantes recombinantes sintetizan una cadena de polipéptido sencilla con un péptido enlazador que une los dos dominios V. Los métodos para producir scFv se describen, por ejemplo, en Whitlow, et al., "Methods: A Companion to Methods in Enzymology" 2:97, 1991; Bird, et al., *Science* 242:423, 1988; patente estadounidense núm. 4.946.778 para Ladner; Pack, P., et al., *Bio/Technology* 11:1271, 1993.

Como un ejemplo ilustrativo, un scFv específico de MASP-2 se puede obtener exponiendo los linfocitos al polipéptido de MASP-2 *in vitro* y seleccionando bibliotecas que exhiben anticuerpos en fago o vectores similares (por ejemplo, a través del uso de proteína o péptido de MASP-2 inmovilizado o marcado). Los genes que codifican los polipéptidos que tienen dominios de unión a polipéptidos de MASP-2 potenciales se pueden obtener ensayando bibliotecas de

40 péptidos aleatorias exhibidas en fago o en bacterias tales como *E. coli*. Estas bibliotecas que exhiben péptidos aleatorios se pueden usar para detectar péptidos que interactúan con MASP-2. Las técnicas para crear y detectar dichas bibliotecas que exhiben péptidos se conocen en la técnica (patente estadounidense núm. 5.223.409 para Lardner; patente estadounidense núm. 4.946.778 para Ladner; patente estadounidense núm. 5.403.484 para Lardner; patente estadounidense núm. 5.571.698 para Lardner; y Kay et al., *Phage Display of Peptides and Proteins* Academic Press, Inc., 1996), y las bibliotecas que exhiben péptidos aleatorios y kits para ensayar dichas bibliotecas están comercialmente disponibles, por ejemplo, de CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.), Invitrogen Inc. (San Diego, Calif.), New England Biolabs, Inc. (Beverly, Mass.) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, N.J.).

Otra forma de un fragmento de anticuerpo anti-MASP-2 útil en este aspecto de la invención es un péptido que codifica una región determinante de complementaridad (CDR) que se une a un epítipo en un antígeno de MASP-2 e inhibe la activación del complemento dependiente de MASP-2. Los péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimo") se pueden obtener construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable de ARN de

55 células que producen anticuerpos (véase, por ejemplo, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies" en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), página 166, Cambridge University Press, 1995; y Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al. (eds.), página 137, Wiley-Liss, Inc., 1995).

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

#### V. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

##### 5 Dosis

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

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

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

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

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

La eficacia terapéutica de las composiciones y métodos inhibidores de MASP-2 de la presente invención en un sujeto determinado, y las dosis adecuadas, se pueden determinar de acuerdo con ensayos del complemento conocidos por el experto en la técnica. El complemento genera diversos productos específicos. Durante la última década, se han desarrollado y se encuentran disponibles en el mercado ensayos sensibles y específicos para la mayoría de estos productos de activación, incluidos los pequeños fragmentos de activación C3a, C4a y C5a y los grandes fragmentos de activación iC3b, C4d, Bb y sC5b-9. La mayoría de estos ensayos utilizan anticuerpos monoclonales que reaccionan con antígenos nuevos (neoantígenos) expuestos en el fragmento, pero no en las proteínas naturales de las cuales están formados, lo que hace que estos ensayos sean muy simples y específicos. La mayoría se basan en tecnología ELISA, aunque el radioinmunoensayo es todavía utilizado en ocasiones para C3a y C5a. Estos últimos ensayos miden tanto los fragmentos no procesados como sus fragmentos 'desArg', que son las formas importantes encontradas en la circulación. Los fragmentos no procesados y C5ad<sub>es</sub>Arg son rápidamente aclarados por la unión a los receptores de la superficie celular y en consecuencia están presentes en concentraciones muy reducidas, mientras que C3ad<sub>es</sub>Arg no se une a las células y se acumula en el plasma. La medición de C3a proporciona un indicador sensible de la activación del complemento independiente de la vía. La activación de la vía alternativa se puede evaluar midiendo el fragmento Bb. La detección del producto de fase fluida de activación de la vía de ataque a la membrana, sC5b-9, aporta datos de que el complemento está siendo activado hasta la culminación. Dado que tanto la vía de lectinas como la clásica generan los mismos productos de activación, C4a y C4d, la medición de estos dos fragmentos no provee ninguna información sobre cuál de estas dos vías ha generado los productos de activación.

#### Vehículos farmacéuticos y vehículos de administración

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

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

El vehículo puede comprender también un vehículo de administración para sostener (es decir, extender, demorar o regular) la administración del agente(s) o para potenciar la administración, absorción, estabilidad o farmacocinética del agente(s) terapéutico. Dicho vehículo de administración puede incluir, a modo de ejemplo no limitativo, micropartículas, microesferas, nanoesferas o nanopartículas compuestas por proteínas, liposomas, carbohidratos, compuestos orgánicos sintéticos, compuestos inorgánicos, hidrogeles poliméricos o copoliméricos y micelas poliméricas. Los sistemas de administración adecuados de hidrogel y micelas incluyen los copolímeros de PEO:PHB:PEO y los complejos de copolímero/ciclodextrina descritos en el documento WO 2004/009664 A2 y PEO y los complejos de PEO/ciclodextrina descritos en el documento US 2002/0019369 A1. Dichos hidrogeles se pueden inyectar localmente en el sitio de acción destinado o por vía subcutánea o intramuscular para formar una formulación de liberación sostenida.

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

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

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

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

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

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

Vehículos farmacéuticos para anticuerpos

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

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

## Administración sistémica

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

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

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

Los anticuerpos inhibidores de MASP-2 se pueden introducir en asociación con otra molécula, tal como un lípido, para proteger a los polipéptidos de la degradación enzimática. Por ejemplo, la unión covalente de los polímeros, especialmente polietilenglicol (PEG), se ha utilizado para proteger a ciertas proteínas de la hidrólisis enzimática en el cuerpo y prolongar así la semivida (Fuertges, F., et al., *J. Controlled Release* 11:139, 1990). Se han descrito muchos sistemas poliméricos para la administración de proteínas (Bae, Y.H., et al., *J. Controlled Release* 9:271, 1989; Hori, R., et al., *Pharm. Res.* 6:813, 1989; Yamakawa, I., et al., *J. Pharm. Sci.* 79:505, 1990; Yoshihiro, I., et al., *J. Controlled Release* 10:195, 1989; Asano, M., et al., *J. Controlled Release* 9:111, 1989; Rosenblatt, J., et al., *J. Controlled Release* 9:195, 1989; Makino, K., *J. Controlled Release* 12:235, 1990; Takakura, Y., et al., *J. Pharm. Sci.* 78:117, 1989; Takakura, Y., et al., *J. Pharm. Sci.* 78:219, 1989).

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

Para aplicaciones transdérmicas, los anticuerpos inhibidores de MASP-2 se pueden combinar con otros ingredientes adecuados, tales como vehículos y/o adyuvantes. No hay limitaciones con respecto a la naturaleza de dichos otros ingredientes, excepto que deben ser farmacéuticamente aceptables para la administración prevista, y no pueden degradar la actividad de los ingredientes activos de la composición. Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen ungüentos, cremas, geles o suspensiones, con o sin colágeno purificado. Los anticuerpos y polipéptidos inhibidores de MASP-2 pueden también impregnarse en parches transdérmicos, yesos y vendas, preferiblemente en forma líquida o semilíquida.

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

## Esquemas de tratamiento

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

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

## VI. Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran simplemente el mejor modo contemplado ahora para practicar la invención, pero no deben interpretarse como limitativos de la invención. Todas las citas bibliográficas de esta memoria se incorporan expresamente por referencia.

### Ejemplo 1

Este ejemplo describe la generación de una cepa de ratón deficiente de MASP-2 (MASP-2<sup>-/-</sup>) pero suficiente de MAp19 (MAp19<sup>+/+</sup>).

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

**Resultados y fenotipo:** Los ratones deficientes de MASP-2<sup>-/-</sup> homocigotos resultantes se hallaron viables y fértiles, y se verificó que eran deficientes de MASP-2 por análisis Southern para confirmar el correcto evento de direccionamiento, por análisis Northern para confirmar la ausencia de ARNm de MASP-2 y por análisis Western para confirmar la ausencia de la proteína MASP-2 (no se muestran los datos). La presencia de ARNm de MAp19 y la ausencia de ARNm de MASP-2 se confirmaron además usando RT-PCR resuelta en tiempo en una máquina LightCycler. Los ratones MASP-2<sup>-/-</sup> continúan expresando MAp19, MASP-1 y ARNm y proteína MASP-3 como se espera (no se muestran los datos). La presencia y abundancia de ARNm en los ratones MASP-2<sup>-/-</sup> para Properdina, Factor B, Factor D, C4, C2 y C3 se evaluó por análisis LightCycler y se halló idéntico a aquel de los controles de la camada de tipo salvaje (no se muestran los datos). El plasma de los ratones MASP-2<sup>-/-</sup> homocigotos es totalmente deficiente de la activación del complemento mediada por la vía de lectinas y la activación del complemento mediada por la vía alternativa, como se describe en más detalle en el Ejemplo 2.

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

Ejemplo 2

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

Métodos y materiales:

- 5 Ensayo de escisión de C4 específica de la vía de lectinas: Se ha descrito un ensayo de escisión de C4 por Petersen, et al., *J. Immunol. Methods* 257:107 (2001) que mide la activación de la vía de lectinas resultante de ácido lipoteicoico (LTA) de *S. aureus*, que se une a L-ficolina. El ensayo descrito en el Ejemplo 11 se adaptó para medir la activación de la vía de lectinas mediante MBL recubriendo la placa con LPS y manano o cimosano antes de añadir suero de ratones MASP-2 *-/-* como se describe a continuación. El ensayo también se modificó para eliminar la posibilidad de la escisión de C4 debido a la vía clásica. Esto se logró utilizando un tampón de dilución de muestras que contenía NaCl 1 M, lo cual permite la unión de gran afinidad de los componentes de reconocimiento de la vía de lectinas a sus ligandos, pero evita la activación de C4 endógena, excluyendo así la participación de la vía clásica al disociar el complejo C1. En síntesis, en las muestras de suero de ensayo modificadas (diluidas en gran cantidad de sal (tampón de NaCl 1 M) se añaden placas recubiertas con ligando, seguidas de la adición de una cantidad constante de C4 purificada en un tampón con una concentración fisiológica de sal. Los complejos de reconocimiento unidos que contienen MASP-2 escinden C4, generando la deposición de C4b.

Métodos de ensayo:

- 1) Placas de microtitulación Nunc Maxisorb (Maxisorb, Nunc, Cat. No. 442404, Fisher Scientific) se recubrieron con 1  $\mu$ /ml de manano (M7504 Sigma) o cualquier otro ligando (p. ej., los mencionados a continuación) diluido en tampón de recubrimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, pH 9,6).

Se emplearon los siguientes reactivos en el ensayo:

- a. manano (1  $\mu$ g/pocillo manano (M7504 Sigma) en 100  $\mu$ l tampón de recubrimiento);
- b. cimosano (1  $\mu$ g/pocillo cimosano (Sigma) en 100  $\mu$ l tampón de recubrimiento);
- c. LTA (1  $\mu$ g/pocillo en 100  $\mu$ l tampón de recubrimiento o 2  $\mu$ g/pocillo en 20  $\mu$ l metanol)
- 25 d. 1  $\mu$ g de Mab 4H5 específico de H-ficolina en tampón de recubrimiento
- e. PSA de *Aerococcus viridans* (2  $\mu$ g/pocillo en 100  $\mu$ l tampón de recubrimiento)
- f. 100  $\mu$ l/pocillo de *S. aureus* DSM20233 fijada a formalina (OD<sub>550</sub>=0,5) en tampón de recubrimiento.

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

- 3) Después de incubar durante toda la noche, los sitios de unión a la proteína residual se saturaron incubando las placas con tampón bloqueador HSA-TBS al 0,1% (0,1% (p/v) HSA en Tris-CL 10 mM, NaCl 140 mM, NaN<sub>3</sub> 1,5 mM, pH 7,4) durante 1-3 horas; luego lavando las placas 3X con TBS/tween/Ca<sup>2+</sup> (TBS con 0,05% Tween 20 y CaCl<sub>2</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,4).

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

- 5) Después de la incubación durante la noche a 4 °C, las placas se lavaron 3X con TBS/tween/Ca<sup>2+</sup>. C4 humano (100  $\mu$ l/pocillo de 1  $\mu$ g/ml diluido en BBS (barbital 4 mM, NaCl 145 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,4)) se añadió luego a las placas y se incubó durante 90 minutos a 37 °C. Las placas se lavaron nuevamente 3X con TBS/tween/Ca<sup>2+</sup>.

- 6) Se detectó la deposición de C4b con un C4c antihumano de pollo conjugado a fosfatasa alcalina (diluido 1:1000 en TBS/tween/Ca<sup>2+</sup>, que se añadió a las placas y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron luego nuevamente 3X con TBS/tween/Ca<sup>2+</sup>.

7) Se detectó fosfatasa alcalina añadiendo 100  $\mu$ l de disolución de sustrato de p-nitrofenil fosfato, incubando a temperatura ambiente durante 20 minutos y leyendo la OD<sub>405</sub> en una lectora de placas de microtitulación.

- 45 Resultados: Las FIGURAS 6A-B muestran la cantidad de deposición de C4b en manano (FIGURA 6A) y cimosano (FIGURA 6B) en diluciones en suero de MASP-2+/+ (cruces), MASP-2+/- (círculos cerrados) y MASP-2-/- (triángulos cerrados). La FIGURA 6C muestra la actividad relativa de la convertasa C4 en las placas recubiertas con cimosano (barras blancas) o manano (barras sombreadas) de ratones MASP-2+/+ (n=5) y ratones MASP-2-/- (n=4) en relación con ratones de tipo salvaje (n=5) en base a la medición de la cantidad de deposición de C4b normalizado al suero de tipo salvaje. Las barras de error representan la desviación estándar. Como se muestra en las FIGURAS 6A-C, el

plasma de ratones MASP-2<sup>-/-</sup> es totalmente deficiente de la activación del complemento mediada por la vía de lectinas en placas recubiertas con manano y cimosano. Estos resultados demuestran claramente que MASP-2, pero no MASP-1 ni MASP-3, es el componente efector de la vía de lectinas.

Ensayo de deposición de C3b:

- 5 1) Se recubren placas de microtitulación Nunc Maxisorb (Maxisorb, Nunc, cat. No. 442404, Fisher Scientific) con 1 µg/pocillo manano (M7504 Sigma) o cualquier otro ligando diluido en tampón de recubrimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, pH 9,6) y se incuba durante toda la noche a 4 °C.
- 2) Se saturan sitios de unión a proteína residual incubando la placa con tampón de bloqueo HSA-TBS al 0,1% (0,1% (p/v) HSA en Tris-CL 10 mM, NaCl 140 mM, NaN<sub>3</sub> 1,5 mM, pH 7,4) durante 1-3 horas.
- 10 3) Las placas se lavan en TBS/tw/Ca<sup>++</sup> (TBS con 0,05% Tween 20 y CaCl<sub>2</sub> 5 mM) y se añade BBS diluido a las muestras de suero (barbital 4 mM, NaCl 145 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,4). Los pocillos que reciben solamente tampón se usan como controles negativos. Un conjunto control de muestras de suero obtenidas de ratones MASP-2<sup>-/-</sup> de tipo salvaje se despojan de C1q antes del uso en el ensayo. El suero de los ratones despojados de C1q se preparó usando Dynabeads acoplados a la proteína A (Dynal Biotech, Oslo, Noruega)
- 15 recubiertas con C1q IgG antihumano de conejo (Dako, Glostmp, Dinamarca), de acuerdo con las instrucciones del proveedor.
- 4) Después de incubar durante toda la noche a 4 °C y de otro lavado con TBS/tw/Ca<sup>++</sup>, se detecta C3 convertida y unida con anticuerpo C3c antihumano policlonal (Dako A 062) diluido en TBS/tw/Ca<sup>++</sup> a 1:1000). El anticuerpo secundario es IgG anticonejo de cabra (molécula entera) conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma Immunochemicals A-3812) diluido 1:10.000 en TBS/tw/Ca<sup>++</sup>. La presencia de la vía del complemento alternativa (AP) se determina por adición de 100 µl disolución de sustrato (conjuntos de comprimidos de nitrofenilfosfato Sigma Fast, Sigma) y se incuba a temperatura ambiente. La hidrólisis se supervisa cuantitativamente midiendo la absorción a 405 nm en una lectora de placas de microtitulación. Se prepara una curva estándar para cada análisis, usando diluciones en serie de muestras de plasma/suero.
- 20
- 25 Resultados: Los resultados que se muestran en las FIGURAS 7A y 7B son de sueros mezclados de varios ratones. Las cruces representan suero de MASP-2<sup>+/+</sup>, los círculos rellenos representan suero de MASP-2<sup>+/+</sup> desprovistos de C1q, los cuadrados abiertos representan suero de MASP-2<sup>-/-</sup> y los triángulos abiertos representan suero de MASP-2<sup>-/-</sup> desprovistos de C1q. Como se muestra en las FIGURAS 7A-B, el suero de los ratones MASP-2<sup>-/-</sup> ensayados en un ensayo de deposición de C3b produce niveles muy bajos de activación de C3 en placas recubiertas de manano (FIGURA 7A) y cimosano (FIGURA 7B). Este resultado demuestra claramente que se requiere MASP-2 para contribuir a la generación inicial de C3b proveniente de C3 para iniciar la vía del complemento alternativa. Este es un resultado sorprendente en función de la visión ampliamente aceptada de que los factores del complemento C3, el factor B, el factor D y properdina forman una vía alternativa funcional independiente en la que C3 puede someterse a un cambio de configuración conformacional espontáneo a una forma de "tipo C3b" que luego genera convertasa de fase fluida iC3Bb y deposita moléculas C3b en las superficies de activación tales como cimosano.
- 30
- 35

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

- 40 Con el fin de establecer que la ausencia de MASP-2 fue la causa directa de la pérdida de la activación de C4 dependiente de lectinas en los ratones MASP-2<sup>-/-</sup>, se examinó el efecto de añadir proteína MASP-2 recombinante a muestras de suero en el ensayo de escisión de C4 anteriormente descrito. Se produjeron proteínas recombinantes de MASP-2 murina funcionalmente activa y MASP-2A murina catalíticamente inactiva (en donde el residuo serina del sitio activo en el dominio de serina proteasa se sustituyó con el residuo alanina), y se purificaron como se describe a continuación en el Ejemplo 5. El suero agrupado de ratones 4 MASP-2<sup>-/-</sup> se pre-incubó con concentraciones de proteína en aumento de MASP-2 murina recombinante o MASP-2A murina recombinante inactiva y se ensayó la actividad de la convertasa C4 como se describió anteriormente.
- 45

- Resultados: Como se muestra en la FIGURA 8, la adición de la proteína MASP-2 recombinante murina funcionalmente activa (se muestra como triángulos abiertos) al suero obtenido de los ratones MASP-2<sup>-/-</sup> restauró la activación de C4 dependiente de la vía de lectinas en un modo dependiente de la concentración de la proteína, mientras que la proteína MASP-2A murina catalíticamente inactiva (se muestra como asteriscos) no restauró la activación de C4. Los resultados que se muestran en la FIGURA 8 se normalizan a la activación de C4 observada con el suero de ratón de tipo salvaje mezclado (se muestra como una línea de puntos).
- 50

Ejemplo 3

- Este ejemplo describe la generación de una cepa de ratón transgénico que es MASP-2<sup>-/-</sup> murina, MASP19<sup>+/+</sup> y que expresa un transgen de MASP-2 humano (gen inactivado de MASP-2 murina (knock-out) y gen modificado de MASP-2 humana (knock-in)).
- 55

Materiales y métodos: Se construyó un minigen que codifica MASP-2 humana llamado "mini hMASP-2" (SEC ID NO:

49) como se muestra en la FIGURA 5, que incluye una región promotora del gen *MASP 2* humano, incluidos los primeros 3 exones (exón 1 a exón 3) seguido de secuencia de ADNc que representa la secuencia codificadora de los siguiente 8 exones, codificando así la proteína MASP-2 de longitud total promovida por su promotor endógeno. El constructo de mini hMASP-2 se inyectó en huevos fertilizados de MASP-2<sup>-/-</sup> con el fin de reemplazar el gen *MASP 2* murino deficiente por el de MASP-2 humana expresada en forma transgénica.

#### Ejemplo 4

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

Método de aislamiento de MASP-2 humana: Se ha descrito un método para aislar MASP-2 de suero humano en Matsushita et al., *J. Immunol.* 165:2637-2642, 2000. En síntesis, se pasa el suero humano por una columna de manano de levadura-Sepharose usando tampón de imidazol 10 mM (pH 6,0) que contiene NaCl 0,2 M, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, NPGb 0,2 mM, p-APMSFy 20 μM 2% mannitol. Las proenzimas MASP-1 y MASP-2 forman complejo con MBL y se eluye con el tampón anteriormente mencionado que contiene manosa 0,3 M. Para separar las proenzimas MASP-1 y MASP-2 de MBL, se aplican preparaciones que contienen el complejo a anti-MBL-Sepharose y luego se eluyen las MASP con tampón de imidazol que contiene EDTA 20 mM y NaCl 1 M. Finalmente, las proenzimas MASP-1 y MASP-2 se separan unas de otras pasando por anti-MASP-1-Sepharose en el mismo tampón que se usó para anti-MBL-Sepharose. Se recupera la MASP-2 en los efluentes, mientras que MASP-1 se eluye con tampón de glicina 0,1 M (pH 2,2).

#### Ejemplo 5

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

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

La secuencia de ADNc de longitud total de MASP-2 humana (SEC ID NO: 4) también se subclonó en el vector de expresión mamífero pCI-Neo (Promega), que promueve la expresión eucariota bajo el control de la región del potenciador/promotor de CMV (se describe en Kaufman R.J. et al., *Nucleic Acids Research* 19:4485-90, 1991; Kaufman, *Methods in Enzymology*, 185:537-66 (1991)). El ADNc de ratón de longitud total (SEC ID NO: 50) el ADNc de MASP-2 de rata (SEC ID NO: 53) se subclonaron cada uno en el vector de expresión pED. Los vectores de expresión de MASP-2 se transfirieron luego a la línea celular de ovario de hámster chino adherente DXB1 usando el procedimiento de transfección de fosfato de calcio estándar descrito en Maniatis et al., 1989. Las células transfectadas con estos constructos se desarrollaron muy lentamente, implicando que la proteasa codificada es citotóxica.

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

Expresión de MASP-2 catalíticamente inactiva de longitud total:

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

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

Se generó una proteína MASP-2A de rata catalíticamente inactiva convirtiendo a cinasa y renaturalizando la SEC ID NO: 64 y la SEC ID NO: 65 combinando estos dos oligonucleótidos en cantidades molares equivalentes, calentando a 100 °C durante 2 minutos y enfriando lentamente hasta temperatura ambiente. El fragmento renaturalizado

resultante tiene extremos compatibles con Pst1 y Xba1 y se insertó en lugar del fragmento Pst1-Xba1 de ADNc de MASP-2 de rata de tipo salvaje (SEC ID NO: 53) para generar MASP-2A de rata.

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

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

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

En otro planteamiento, la forma catalíticamente inactiva de MASP-2 se construye usando el método descrito en Chen et al., *J. Biol. Chem.*, 276(28):25894-25902, 2001. En síntesis, el plásmido que contiene el ADNc de MASP-2 humano de longitud total (descrito en Thiel et al., *Nature* 386:506, 1997) se digiere con *Xho1* y *EcoR1* y el ADNc de MASP-2 (descrito en la presente como SEC ID NO: 4) se clona en los correspondientes sitios de restricción del vector de transferencia del baculovirus pFastBac1 (Life Technologies, NY). El sitio activo de serina proteasa de MASP-2 en Ser618 se altera luego a Ala618 sustituyendo los oligonucleótidos bicatenarios que codifican el aminoácido de la región peptídica 610-625 (SEC ID NO: 13) con los aminoácidos de la región nativa 610 a 625 para crear un polipéptido de longitud total de MASP-2 con un dominio de proteasa inactiva. Construcción de plásmidos de expresión que contienen regiones de polipéptidos derivados de Masp-2 humana.

Los siguientes constructos se producen usando el péptido de señales de MASP-2 (residuos 1-15 de SEC ID NO: 5) para segregar diversos dominios de MASP-2. Se prepara un constructo que expresa el dominio humano CUBI de MASP-2 (SEC ID NO:8) por PCR ampliando la región que codifica los residuos 1-121 de MASP-2 (SEC ID NO: 6) (correspondientes al dominio N-terminal de CUBI). Se prepara un constructo que expresa el dominio humano CUBIEGF de MASP-2 (SEC ID NO: 9) por PCR ampliando la región que codifica los residuos 1-166 de MASP-2 (SEC ID NO: 6) (correspondientes al dominio N-terminal de CUBIEGF). Se prepara un constructo que expresa el dominio humano CUBIEGFCUBII de MASP-2 (SEC ID NO: 10) por PCR ampliando la región que codifica los residuos 1-293 de MASP-2 (SEC ID NO: 6) (correspondientes al dominio N-terminal de CUBIEGFCUBII). Los dominios precedentemente mencionados se amplían por PCR usando Vent<sub>R</sub> polimerasa y pBS-MASP-2 como molde, de acuerdo con métodos de PCR establecidos. La secuencia del cebador 5' del cebador sentido (5'-CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' SEC ID NO: 34) introduce un sitio de restricción *BamHI* (subrayado) en el extremo 5' de los productos de PCR. Los cebadores antisentido para cada uno de los dominios de MASP-2, que se exponen a continuación en la TABLA 5 están diseñados para introducir un codón finalizador (negrita) seguido por un sitio *EcoRI* (subrayado) al final de cada producto de PCR. Una vez ampliados los fragmentos de ADN se digieren con *BamHI* y *EcoRI* y se clonan en los sitios correspondientes del vector pFastBac1. Los constructos resultantes se caracterizan por mapeo de restricción y se confirman por secuenciación de ADNds.

TABLA 5: Cebadores de PCR para MASP-2)

Dominio de MASP-2	Cebador PCR en 5'	Cebador PCR en 3'
SEC ID NO:8 CUBI (aa 1-121 de SEC ID NO: 6)	5 'CGGGATCCATGA GGCTGCTGACCCT C-3' (SEC ID NO: 34)	5'GGAATTCCTAGGCTGCAT A (SEC ID NO: 35)
SEC ID NO: 9 CUBIEGF (aa 1-166 de SEC ID NO: 6)	5 'CGGGATCCATGA GGCTGCTGACCCT C-3' (SEC ID NO: 34)	5 'GGA ATTCCTAC AGGGCGC T-3' (SEC ID NO: 36)
SEC ID NO: 10 CUBIEGFCUBII (aa 1-293 de SEC ID NO:6)	5 'CGGGATCCATGA GGCTGCTGACCCT C-3' (SEC ID NO: 34)	5 'GG AATTCCTAGTAGTGGA T 3' (SEC ID NO: 37)
SEC ID NO: 4 MASP-2 humana	5'ATGAGGCTGCTG ACCCTCCTGGGCC TTC 3' (SEC ID NO: 56) hMASP-2_directo	5 'TTAAAATCACTAATTATG TTCTCGATC 3' (SEC ID NO: 59) hMASP-2_inverso
SEC ID NO: 4 ADNc de MASP-2 humana	5 CAGAGGTGACGC AGGAGGGGCAC 3' (SEC ID NO: 58) hMASP-2_ala_directo	5'GTGCCCTCCTGCGTCAC CTCTG 3' (SEC ID NO: 57) hMASP-2_ala_inverso
SEC ID NO:50 ADNc de MASP-2 murina	5'ATGAGGCTACTC ATCTTCTGG3' (SEC ID NO: 60) mMASP-2_directo	5 'TT AG A A ATT ACTT ATT AT GTTCTCAATCC3' (SEC ID NO: 63) mMASP-2_inverso

Dominio de MASP-2	Cebador PCR en 5'	Cebador PCR en 3'
SEC ID NO:50 ADNc de MASP-2 murina	5 CCCCCCTGCGT CACCTCTGCAG3' (SEC ID NO: 62) mMASP-2_ala_directo	5 CTGCAGAGGTGACGCAG GGGGGG 3' (SEC ID NO: 61) mMASP-2_ala_inverso

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

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

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

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

Producción de polipéptidos de MASP-2 recombinantes humanos

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

Las células High Five ( $1,75 \times 10^7$  células/175-cm<sup>2</sup> matraz de cultivo de tejido) se infectan con los virus recombinantes que contienen los polipéptidos de MASP-2 a una multiplicidad de la infección de 2 en medio SFM Sf900 II a 28° C durante 96 h. Los sobrenadantes se recogen por centrifugación y se añade diisopropil fosforofluoridato a una concentración final de 1 mM.  
45

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

hasta 0,3 mg/ml por ultrafiltración en microconcentradores Microsep (p.m. límite de corte = 10.000) (Filtron, Karistein, Alemania).

#### Ejemplo 6

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

#### 5 Materiales y métodos:

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

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

#### Ejemplo 7

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

#### Materiales y métodos:

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

30 Para cada fusión, se preparan suspensiones unicelulares del bazo de un ratón inmunizado y se usan para la fusión con células de mieloma Sp2/0. Se fusionan  $5 \times 10^8$  de las células Sp2/0, y  $5 \times 10^8$  de las células de bazo se fusionan en medio que contiene 50% polietilenglicol (P.M. 1450) (Kodak, Rochester, N.Y.) y dimetilsulfóxido al 5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Las células luego se ajustan hasta una concentración de  $1,5 \times 10^5$  células de bazo por 200 µl de la suspensión en medio Iscove (Gibco, Grand Island, N.Y.), enriquecido con suero bovino fetal al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, hipoxantina 0,1 mM, aminopterinina 0,4 µM y timidina 16 µM. Se añaden 200 µl de la suspensión celular a cada pocillo de aproximadamente veinte placas de microcultivo de 96 pocillos. Después de aproximadamente diez días, los sobrenadantes de cultivo se extraen para estudio de reactividad con el factor de MASP-2 purificado en un ensayo ELISA.  
35

40 Ensayo de ELISA: Pocillos de placas de microensayo Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.) se recubren añadiendo 50 µl de hMASP-2 purificada a 50 ng/ml de rMASP-2 rata (o rMASP-2A) durante la noche a temperatura ambiente. La baja concentración de MASP-2 para el recubrimiento permite la selección de anticuerpos de gran afinidad. Después de extraer la disolución de recubrimiento agitando la placa, se añaden 200 µl de BLOTTO (leche en polvo desnatada) en PBS a cada pocillo durante una hora para bloquear los sitios no específicos. Una hora después, los pocillos se lavan con un tampón PBST (PBS que contiene 0,05% Tween 20). Se recogen 50 µl de sobrenadantes de cultivo de cada pocillo de fusión y se mezclan con 50 µl de BLOTTO y luego se añaden a los pocillos individuales de las placas de microensayo. Después de una hora de incubación, los pocillos se lavan con PBST. Los anticuerpos murinos unidos se detectan luego por reacción con IgG antirratón de cabra conjugada (específico de Fc) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.) y se diluyen a 1:2.000 en BLOTTO. La disolución de sustrato de peroxidasa que contiene 0,1% 3,3',5,5' tetrametil benzidina (Sigma, St. Louis, Mo.) y 0,0003% peróxido de hidrógeno (Sigma) se añade a los pocillos para desarrollo de color durante 30 minutos. La reacción finaliza por adición de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M por pocillo. Se lee la densidad óptica a 450 nm de la mezcla de reacción con una lectora de ELISA BioTek (BioTek Instruments, Winooski, Vt.).  
45

#### 50 Ensayo de unión a MASP-2:

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

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

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

#### Ejemplo 8

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

Materiales y métodos: Se cruzan un ratón MASP-2<sup>-/-</sup> descrito en el Ejemplo 1 y un ratón MASP-2<sup>-/-</sup> que expresa un constructo del transgen de MASP-2 humano (genes modificados de MASP-2) descrito en el Ejemplo 3, y la progenie, que consiste en MASP-2<sup>-/-</sup> murino, MAP19<sup>+</sup> murino, MASP-2<sup>+</sup> murino, se usa para identificar agentes inhibidores de MASP-2 humana.

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

Además, los ratones MASP-2<sup>-/-</sup> murino, MAP19<sup>+</sup>, MASP-2<sup>+</sup> humano se pueden usar para generar líneas celulares que contienen uno o más tipos de células implicadas en una enfermedad asociada a MASP-2 que se pueden usar como modelo de cultivo celular para ese trastorno. La generación de líneas celulares continuas de animales transgénicos se conoce en la técnica, véase, por ejemplo Small, J.A., et al., *Mol. Cell Biol.*, 5:642-48, 1985.

#### Ejemplo 9

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

#### Materiales y métodos:

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

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

Ejemplo 10

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

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

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

15 El análisis de PCR anclado se lleva a cabo como lo describen Chen y Platsucas (Chen, P.F., *Scancl. J. Immunol.* 35:539-549, 1992). Para la clonación del gen V<sub>K</sub>, se prepara ADNc bicatenario usando un cebador Not1-MAK1 (5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTTT-3' SEC ID NO: 38). Los adaptadores renaturalizados AD1 (5'-GGAATTCACCTCGTTATTCTCGGA-3' SEC ID NO: 39) y AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEC ID NO:40) se ligan a ambos términos 5' y 3' del ADNc bicatenario. Los adaptadores en los extremos 3' se extraen por digestión de Not1. El producto digerido luego se usa como molde en PCR con el oligonucleótido AD1 como el cebador 5' y MAK2 (5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTC-3' SEC ID NO: 41) como el cebador 3'. Los fragmentos de ADN de aproximadamente 500 bp se clonan en pUC19. Se seleccionan varios clones para análisis de secuencias a fin de verificar que la secuencia clonada abarque la región constante de inmunoglobulina murina esperada. Los oligonucleótidos Not1-MAK1 y MAK2 derivan de la región V<sub>K</sub> y tienen 182 y 84 bp, respectivamente, en dirección 3' del primer par de bases del gen C kappa. Se eligen clones que incluyen V<sub>K</sub> completo y el péptido líder.

20 Para la clonación del gen V<sub>H</sub>, se prepara ADNc usando el cebador Not1 MAG1 (5'-CGCGGCCGCTGCTCAGAGTGTAGA-3' SEC ID NO: 42). Los adaptadores renaturalizados AD1 y AD2 se ligan a ambos términos 5' y 3' del ADNc bicatenario. Los adaptadores en los extremos 3' se extraen por digestión de Not1. El producto digerido se usa como molde en PCR con el oligonucleótido AD1 y MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGGAAATA-3' SEC ID NO: 43) como cebadores. Los fragmentos de ADN de 500 a 600 bp de longitud se clonan en pUC19. Los oligonucleótidos Not1-MAG1 y MAG2 derivan de la región C<sub>γ</sub>.7.1 murina y tienen 180 y 93 bp, respectivamente, en dirección 3' desde el primer bp del gen C<sub>γ</sub>.7.1 murino. Se eligen clones que incluyen el V<sub>H</sub> completo y el péptido líder.

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

55 Para el gen kappa, se lleva a cabo reacción PCR usando 5'-A AG A A AGCTTGCCGCC ACC ATGTTCTC ACT AGCTCT - 3' (SEC ID NO: 46) como el cebador 5' y un cebador 3' derivado de C<sub>K</sub> (5'-CGGGATCCTTCTCCCTTAACACTCT-3' SEC ID NO: 47). Se confirma que la secuencia de ADN contiene las regiones V<sub>H</sub> completa y V<sub>K</sub> humana. Después de la digestión con enzimas de restricción correctas, los fragmentos de ADN kappa se insertan en los sitios de restricción HindIII y BamHI del cassette del vector de expresión pSV2neo-TUS para dar pSV2neoK. La expresión de ambos genes Fd y .kappa es promovida por elementos potenciadores y

promotores derivados de HCMV. Ya que el gen Fd no incluye el residuo de aminoácidos cisteína implicado en el enlace disulfuro intercadenas, este Fab quimérico recombinante contiene cadenas pesada y ligera no covalentemente unidas. Este Fab quimérico está diseñado como cFab.

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

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

10 Para generar líneas celulares que segregan IgG anti-MASP-2 quimérica, se transfectan células NSO con ADN de plásmido purificado de pSV2neoV<sub>H</sub>-huC.γ1 y pSV2neoV-huC kappa por electroporación. Las células transfectadas se seleccionan en presencia de 0,7 mg/ml G418. Las células se desarrollan en un matraz giratorio de 250 ml usando medio que contiene suero.

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

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

Para generar líneas celulares que segregan Fab anti-MASP-2 quimérico, se transfectan células CHO con ADN de plásmido purificado de pSV2dhfrFd (o pSV2dhfrFd/9aa) y pSV2neokappa, por electroporación. Las células transfectadas se seleccionan en presencia de G418 y metotrexato. Las líneas celulares seleccionadas se amplían en concentraciones en aumento de metotrexato. Las células se subclonan en forma unicelular por dilución limitativa. 25 Las líneas celulares subclonadas unicelulares de gran producción se desarrollan luego en un cultivo giratorio de 100 ml que usa medio libre de suero.

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

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

#### Ejemplo 11

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

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

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

45 se desarrollan bacterias durante toda la noche a 37 °C en medio de sangre y soja tréptico, se lava tres veces con PBS, luego se fija durante 1 h a temperatura ambiente en PBS/0,5% formalina y se lava otras tres veces con PBS, antes de resuspenderse en tampón de recubrimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, pH 9,6).

Ensayo: Los pocillos de una placa de microtitulación Nunc MaxiSorb (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) se recubren con: 100 µl de *S. aureus* DSM20233 fijada a formalina (OD<sub>550</sub> = 0,5) en tampón de recubrimiento con 1 µg de L-ficolina en tampón de recubrimiento.

Después de incubar durante toda la noche, los pocillos se bloquean con albúmina de suero humano al 0,1% (HSA) en TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4), luego se lavan con TBS que contiene 0,05% Tween 20 y CaCl<sub>2</sub> 5 mM (tampón de lavado). Las muestras de suero humano se diluyen en Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, 0,05% Triton X-100, 0,1% HSA, pH 7,4, lo que previene la activación de C4 endógena y disocia el complejo C1

(compuesto por C1q, C1r y C1s). Los agentes inhibidores de MASP-2, incluidos MoAb anti-MASP-2 y péptidos inhibidores se añaden a las muestras de suero en concentraciones variables. Las muestras diluidas se añaden a la placa y se incuban durante la noche a 4 ° C. Después de 24 horas, las placas se lavan a fondo con tampón de lavado, luego se añaden a cada pocillo 0,1 µg de C4 humana purificada (obtenida como se describe en Dodds, A.W., *Methods Enzymol.* 223:46, 1993) en 100 (µl de barbital 4 mM, NaCl 145 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,4. Después de 1,5 h a 37 °C, las placas se lavan nuevamente y se detecta la deposición de C4b usando C4c antihumano de pollo conjugado a fosfatasa alcalina (se obtiene de Immunsystem, Uppsala, Suecia) y se mide usando el sustrato colorimétrico fosfato de p-nitrofenilo.

5  
10 Ensayo de C4 en manano: El ensayo anteriormente descrito se adapta para medir la activación de la vía de lectinas mediante MBL recubriendo la placa con LSP y manano antes de añadir suero mezclado con diversos agentes inhibidores de MASP-2.

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

15 Ejemplo 12

El siguiente ensayo demuestra la presencia de activación de la vía clásica en ratones de tipo salvaje y MASP-2<sup>-/-</sup>.

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

25 Resultados: La FIGURA 9 expone los niveles relativos de deposición de C3b en placas recubiertas con IgG en suero de tipo salvaje, suero de MASP-2<sup>-/-</sup>, suero de MASP-2<sup>-/-</sup> despojado de C1q de tipo salvaje y suero de MASP-2<sup>-/-</sup> despojado de C1q. Estos resultados demuestran que la vía clásica está intacta en la cepa de ratón MASP-2<sup>-/-</sup>.

30 Ejemplo 13

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

35 Métodos: Para ensayar el efecto de un agente inhibidor de MASP-2 en condiciones de activación del complemento en las que la vía clásica es iniciada por complejos inmunes, muestras de 50 µl por triplicado que contienen 90% NHS se incuban a 37° C en presencia de 10 µg/ml de complejo inmune (IC) o PBS, y también se incluyen muestras por triplicado paralelas (+/-IC) que contienen anticuerpo monoclonal anti-properdina 200 nM durante la incubación a 37 °C. Después de una incubación de dos horas a 37 °C, se añade EDTA 13 mM a todas las muestras para detener la activación adicional del complemento, y las muestras se enfrían inmediatamente a 5 °C. Las muestras luego se conservan a -70 °C antes de ensayarse para productos de activación del complemento (C3a y sC5b-9) usando kits ELISA (Quidel, Catálogos núm. A015 y A009) siguiendo las instrucciones del fabricante.

40 Ejemplo de referencia 14

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

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

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

Para los pacientes que se sometieron a reparación de AAA, se tomaron muestras de sangre sistémicas de la arteria radial de cada paciente (con una vía arterial) en cuatro puntos de tiempo definidos durante el procedimiento: punto

de tiempo 1: inducción de anestesia; punto de tiempo 2: justo antes del pinzamiento arterial; punto de tiempo 3: justo antes de la extracción de la pinza aórtica; y punto de tiempo 4: durante la reperfusión.

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

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

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

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

#### Ejemplo de referencia 15

Este ejemplo describe el uso de la cepa MASP-2<sup>-/-</sup> como un modelo animal para ensayar los agentes inhibidores de MASP-2 útiles para tratar la artritis reumatoidea.

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

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

50 Métodos: Se obtiene el suero de ratones K/BxN artríticos a los 60 días de vida, se mezcla y se inyecta (150-200 µl i.p.) en receptores MASP-2<sup>-/-</sup> (obtenidos como se describe en el Ejemplo 1); y en las camadas control con o sin agentes inhibidores de MASP-2 (MoAb, péptidos inhibidores y similares descritos en este documento) en los días 0 y 2. Un grupo de ratones normales también se pre-trata con un agente inhibidor de MASP-2 por dos días antes de recibir la inyección de suero. Un grupo más de ratones recibe una inyección de suero en el día 0, seguida por un agente inhibidor de MASP-2 en el día 6. Se evalúa un índice clínico con el paso del tiempo con un punto para cada pata afectada, ½ punto para una pata con solamente inflamación leve. El espesor del tobillo se mide también con  
55 una pinza (el espesor se define como la diferencia desde la medición del día 0).

Ejemplo de referencia 16

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

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

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

Ejemplo 17

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

20 Métodos: Un método para medir la elastasa de los neutrófilos ha sido descrito en Gupta-Bansal, R., et al., *Molecular Immunol.* 37:191-201, 2000. En resumen, el complejo de elastasa y  $\alpha_1$ -antitripsina del suero se mide con un ensayo sándwich de dos sitios que utiliza anticuerpos contra elastasa y  $\alpha_1$ -antitripsina. Se recubren placas de microtitulación de poliestireno con una dilución 1:500 de anticuerpo de elastasa antihumano (The Binding Site, Birmingham, Reino Unido) en PBS durante la noche a 4 °C. Después de aspirar la disolución de anticuerpos, los pocillos se bloquean con PBS que contiene 0,4% HAS durante 2 h a temperatura ambiente. Se añaden a los pocillos alícuotas (100  $\mu$ l) de muestras de plasma que son tratadas con o sin un agente inhibidor de MASP-2. Después de una incubación de a 2 h a temperatura ambiente, los pocillos se enjuagan abundantemente con PBS. El complejo de elastasa- $\alpha_1$ -antitripsina ligado se detecta por adición de una dilución 1:500 de anticuerpo  $\alpha_1$ -antitripsina conjugado a peroxidasa en disolución de bloqueo que se deja incubar por 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar la placa con PBS, se añaden alícuotas de 100  $\mu$ l de sustrato TMB. La reacción de TMB se inactiva por adición de 100  $\mu$ l de ácido fosfórico, y la placa se lee a 450 nm en una lectora de microplacas.

Ejemplo de referencia 18

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

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

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

Ejemplo de referencia 19

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

55 Antecedentes/Fundamentos: Se sabe que la lesión de isquemia/reperfusión ocurre en el órgano de un donante durante el trasplante. El grado de daño al tejido se relaciona con la longitud de la isquemia y es mediado por el complemento, como lo demuestran diversos modelos y el uso de los agentes inhibidores del complemento como el receptor soluble de tipo 1 (CR1) (Weisman et al., *Science* 249:146-151, 1990; Mulligan et al., *J. Immunol.* 148:1479-1486, 1992; Pratt et al., *Am. J. Path.* 163(4):1457-1465, 2003). Se ha descrito un modelo animal para trasplante por

Pratt et al., *Am. J. Path.* 163(4): 1457-1465, que se puede modificar para uso con el modelo de ratón MASP-2<sup>-/-</sup> y/o para uso como sistema del modelo a MASP-2<sup>+/+</sup> en el que seleccionar agente inhibidores de MASP-2 por su capacidad de proteger el tejido trasplantado de lesión de isquemia/reperfusión. La purga del riñón del donante con el fluido de perfusión antes del trasplante proporciona una oportunidad de introducir agentes inhibidores anti-MASP-2 en el riñón del donante.

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

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

#### Ejemplo de referencia 20

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

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

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

Métodos: Se genera un ratón MASP-2<sup>-/-</sup> como se describe en el Ejemplo 1. El ratón MASP-2<sup>-/-</sup> se cruza luego con un ratón derivado de la cepa DBA/1LacJ (The Jackson Laboratory). F1 y la subsiguiente descendencia se entrecruza para producir MASP-2<sup>-/-</sup> homocigoto en la línea DBA/1LacJ.

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

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

#### Ejemplo 21

Este ejemplo describe el uso de un modelo animal de (NZB/W) F<sub>1</sub> para ensayar agentes inhibidores de MASP-2 útiles para tratar la glomerulonefritis mediada por el complejo inmune.

Antecedentes y fundamentos: Los ratones F<sub>1</sub> New Zealand black x New Zealand white (NZB/W) desarrollan espontáneamente un síndrome autoinmune de similitudes notables con la glomerulonefritis mediada por el complejo inmune humano. Los ratones F<sub>1</sub> NZB/W sucumben invariablemente a la glomerulonefritis alrededor de los 12 meses de edad. Como se analizó anteriormente, se ha demostrado que la activación del complemento cumple una función importante en la patogénesis de la glomerulonefritis mediada por el complejo inmune. Se ha demostrado además que la administración de un MoAb anti-C5 en el modelo de ratón F<sub>1</sub> NZB/W resultó en la mejoría significativa del curso de la glomerulonefritis (Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 8563-8568 (1996)). En función de las observaciones descritas en este documento de que la MASP-2 cumple una función esencial en el inicio de las vías de lectinas y alternativa, el modelo animal de F<sub>1</sub> NZB/W es útil para seleccionar agentes inhibidores de MASP-2 eficaces para uso como agentes terapéuticos para tratar la glomerulonefritis.

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

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

#### Ejemplo de referencia 22

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

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

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

#### Ejemplo de referencia 23

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

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

terapéuticos a fin de prevenir o tratar la septicemia o una afección resultante de septicemia.

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

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Omeros Corporation University of Leicester	
	<120> Métodos para tratar afecciones asociadas con la activación del complemento dependiente de MASP-2	
5	<130> P101240EP58	
	<150> US 60/578,847	
	<151> 10-06-2004	
10	<160> 65	
	<170> PatentIn versión 3.2	
15	<210> 1	
	<211> 725	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapien	
20	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (27)..(584)	
	<400> 1	
	ggccaggcca gctggacggg cacacc atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt 53	
	Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu	
	1 5	
	ctg tgt ggc tcg gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct 101	
	Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro	
	10 15 20 25	
	gtg ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat 149	
	Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn	
	30 35 40	
	gac cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg 197	
	Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu	
	45 50 55	
	cgc ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag 245	
	Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu	
	60 65 70	
	tac gac ttc gtc aag ctg agc tcg ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg 293	
	Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu	
	75 80 85	
	tgc ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act 341	
	Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr	
	90 95 100 105	
	ttc tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac 389	
	Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr	
	110 115 120	
	tcc aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag 437	
	Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu	
25	125 130 135	

ES 2 631 127 T3

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 ggccccacc c 725

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu  
 180 185

15 <210> 3  
 <211> 170  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

ES 2 631 127 T3

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4

5 <211> 2460

<212> ADN

<213> Homo sapien

<220>

10 <221> CDS

<222> (22)..(2082)

<400> 4

ES 2 631 127 T3

ggccagctgg	acgggcacac	c	atg	agg	ctg	ctg	acc	ctc	ctg	ggc	ctt	ctg				51
			Met	Arg	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu				
			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									
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	
					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									
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	
					160					165					170	
tac	gtc	ctg	cac	cg	aac	aag	cg	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	agg	tct	ggg	gag	ctc	agc	agc	cct	gaa	tac	cca	627
Gln	Val	Phe	Thr	Gln	Arg	Ser	Gly	Glu	Leu	Ser	Ser	Pro	Glu	Tyr	Pro	
			190					195					200			

ES 2 631 127 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	
					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	ggg	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		
ggt	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	ggt	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	ggg	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	ggg	aaa	tat	1251
Ser	Cys	Glu	Glu	Thr	Phe	Tyr	Thr	Met	Lys	Val	Asn	Asp	Gly	Lys	Tyr	
					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	ggt	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				

ES 2 631 127 T3

caa gtc ctg ata tta ggt gga acc aca gca gca ggt gca ctt tta tat 1443  
 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 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 tgcagtcaag gattcttcat ttttagaaat 2122  
 Ile Ser Asp Phe  
 685  
 gcctgtgaag accttggcag cgacgtggct cgagaagcat tcatcattac tgtggacatg 2182  
 gcagttgttg ctccacccaa aaaaacagac tccaggtgag gctgctgtca tttctccact 2242  
 tgccagttta attccagcct taccattga ctcaagggga cataaaccac gagagtgaca 2302  
 gtcacctttg cccaccagc gtaatgtcac tgctcaaatt acatttcatt accttaaaaa 2362  
 gccagtctct tttcactctg gctgttggca tttctgtaaa ctgcctgtcc atgctctttg 2422  
 tttttaaact tgttcttatt gaaaaaaaa aaaaaaaaa 2460

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

ES 2 631 127 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



ES 2 631 127 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6  
 <211> 671  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

5

<400> 6

ES 2 631 127 T3

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

ES 2 631 127 T3

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

ES 2 631 127 T3

Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln  
 485 490 495  
 Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala  
 500 505 510  
 Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val  
 515 520 525  
 Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu  
 530 535 540  
 Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu  
 545 550 555 560  
 Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro  
 565 570 575  
 Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr  
 580 585 590  
 Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser  
 595 600 605  
 Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe  
 610 615 620  
 Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp  
 625 630 635 640  
 Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys  
 645 650 655  
 Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe  
 660 665 670

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

<400> 7  
 cctgtcctgc ctgcctggaa ctctgagcag gctggagtca tggagtcgat tcccagaatc 60  
 ccagagtcag ggaggctggg ggcaggggca ggtcactgga caaacagatc aaaggtgaga 120  
 ccagcgtagg actgcagacc aggccaggcc agctggacgg gcacaccatg aggtaggtgg 180  
 ggcaccacagc ctccctgcag ggtgtgggggt gggagcacag gcctgggcct caccgccct 240

5

10

ES 2 631 127 T3

gccctgcca taggctgctg accctcctgg gccttctgtg tggctcggtg gccacccct 300  
 taggcccga gtagcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc atccccggc tttccagggg 360  
 agtatgcaa tgaccaggag cggcgctgga ccctgactgc accccccggc taccgctgc 420  
 gcctctactt caccacttc gacctggagc tctcccacct ctgcgagtac gacttcgtca 480  
 aggtgccgtc agacgggagg gctggggttt ctcagggtcg gggggctccc aaggagtagc 540  
 cagggttcag ggacacctgg gagcaggggc caggcttggc caggagggag atcaggcctg 600  
 ggtcttgctt tcaactccctg tgacacctga cccacagct gagctcgggg gccaaaggtagc 660  
 tggccacgct gtgcgggag gagagcacag acacggagcg ggccccctggc aaggacactt 720  
 tctactcgtt gggctccagc ctggacatta cttccgctc cgactactcc aacgagaagc 780  
 cgttcacggg gttcgaggcc ttctatgcag ccgaggggtga gccaaagagg gtcctgcaac 840  
 atctcagtct gcgcagctgg ctgtgggggt aactctgtct taggccaggc agccctgcct 900  
 tcagtttccc cacctttccc agggcagggg agaggcctct ggccctgacat catccacaat 960  
 gcaaagacca aacagccgt gacctccatt cacatgggct gagtgccaac tctgagccag 1020  
 ggatctgagg acagcatcgc ctcaagtgc gcagggactg gccgggagcg gcagctcacg 1080  
 cctgtaattc cagcactttg ggaggccgag gctggcctga taatttgagg gtcaggagtt 1140  
 caaggccagc cagggcaaca cggtgaaact ctatctccac taaaactaca aaaattagct 1200  
 gggcgtggtg gtgcgcacct ggaatcccag ctactagggg ggctgaggca ggagaattgc 1260  
 ttgaacctgc gaggtggagg ctgcagtga cagagattgc accactacac tccacctggg 1320  
 cgacagacta gactcctct caaaaaaaa aaaaacaaaa ccacgcaggg ccgagggccc 1380  
 atttacaagc tgacaaagt ggccctgcca gcgggagcgc tgcaggatgt ttgattttca 1440  
 gatcccagtc cctgcagaga ccaactgtgt gacctctggc aagtggctca atttctctgc 1500  
 tccttagaag ctgctgcaag ggttcagcgc ttagaccccg ccccctgggt ttgattgact 1560  
 cccctcatta gctgggtgac ctgcccggga cactgaaact cccactggtt taacagaggt 1620  
 gatgtttgca tctttctccc agcgtctctg ggagcttgca gcgaccctag gcctgtaagg 1680  
 tgattggccc ggcaccagtc ccgcacccta gacaggacct aggcctcctc tgaggctcac 1740  
 tctgaggta tggatctcct gggaggagtc caggctggat cccgcctctt tccctctga 1800  
 cggcctgcct ggccctgcct ctccccaga cattgacgag tgccaggtgg ccccgggaga 1860  
 ggcgcccacc tgcgaccacc actgccaaa ccacctgggc ggtttctact gctcctgccg 1920  
 cgcaggctac gtccctgacc gtaacaagcg cacctgctca ggtgagggag gctgcctggg 1980  
 ccccaacgca ccctctcctg ggatacccg ggctcctcag ggccattgct gctctgccca 2040  
 ggggtgcgga gggcctgggc ctggacactg ggtgcttcta ggccctgctg cctccagctc 2100

ES 2 631 127 T3

cccttctcag ccctgcttcc cctctcagca gccaggctca tcagtgccac cctgccctag 2160  
 cactgagact aattctaaca tcccactgtg tacctgggtc cacctgggct ctgggaaccc 2220  
 ctcatgtagc cacgggagag tcggggatc tacctcggtt ccttggactg ggttcctggt 2280  
 ccctgactg ggggacgggc cagtgtctg gggcgtgggc agccccaccc tgtggcgtg 2340  
 accctgctcc ccgactcgg tttctcctct cggggtctct ccttgcctct ctgatctctc 2400  
 ttccagagca gagcctctag cctcccctgg agctccggct gccagcagg tcagaagcca 2460  
 gagccaggct gctggcctca gctccgggtt gggtgagat gctgtgcccc aactcccatt 2520  
 caccacccat ggaccaata ataaacctgg cccacccca cctgctgccg cgtgtctctg 2580  
 ggggtggagg gtcgggaggc ggtggggcgc gctcctctct gcctaccctc ctcacagcct 2640  
 catgaacccc aggtctgtgg gagcctctc catggggcca cacggtcctt ggcctcacc 2700  
 cctgttttga agatggggca ctgaggccgg agaggggtaa ggcctcgtc gagtccaggt 2760  
 ccccagaggc tgagcccaga gtaatcttga accaccccca ttcagggtct ggcctggagg 2820  
 agcctgacc acagaggaga caccctggga gatattcatt gaggggtaat ctggtcccc 2880  
 gcaaattccag ggtgattcc cactgcccc taggcacagc cacgtggaag aaggcaggca 2940  
 atgttggggc tcctcacttc ctagaggcct cacaactcaa atgccccca ctgcagctgg 3000  
 ggggtggggtg gtggtatggg atggggacca agccttcctt gaaggataga gccagccca 3060  
 acaccccgcc ccgtggcagc agcatcacgt gttccagcga ggaaggagag caccagactc 3120  
 agtcatgatc actgttgcct tgaactcca agaacagccc cagggcaagg gtcaaacag 3180  
 gggaaagggg gtgatgagag atccttcttc cggatgttcc tccaggaacc agggggctgg 3240  
 ctggtcttgg ctgggttcgg gtaggagacc catgatgaat aaacttggga atcactgggg 3300  
 tggctgtaag ggaatttagg ggagctccga aggggccctt aggctcgagg agatgctcct 3360  
 ctcttttccc gaattcccag ggaccagga gagtgtcctt tcttctctt cctgtgtgtc 3420  
 catccacccc cgccccgc cctggcagag ctggtggaac tcagtgtctt agcccctacc 3480  
 ctggggttgc gactctggct caggacacca ccacgtccc tgggggtgtg agtgagggcc 3540  
 tgtgcgtcc atcccagatg ctgcctgttt cagctaaagc ctcaaagca gagaaacccc 3600  
 ctctctaagc ggccccctcag ccatcgggtg ggtcgtttg tttctgggta ggcctcaggg 3660  
 gctggccacc tgaggggccc agcccaaccc agggatgcag atgtcccagc cacatccctg 3720  
 tcccagtttc ctgctcccc aggcattccac cctgctgttg gtgcgagggc tgatagaggg 3780  
 cacgccaagt cactcccctg cccttccctc cttccagccc tgtgctccgg ccaggtcttc 3840  
 acccagaggt ctggggagct cagcagccct gaataccac ggccgtatcc caaactctcc 3900  
 agttgcactt acagcatcag cctggaggag gggttcagtg tcattctgga ctttgtggag 3960  
 tccttcgatg tggagacaca ccctgaaacc ctgtgtcctt acgactttct caaggtctgg 4020

ES 2 631 127 T3

ctcctgggcc cctcatcttg tcccagatcc tcccccttca gccagctgc acccctact 4080  
 tcctgcagca tggccccac cacgttcccg tcaccctcgg tgaccccacc tcttcaggtg 4140  
 ctctatggag gtcaaggctg gggcttcgag tacaagtgtg ggaggcagag tggggagggg 4200  
 caccccaatc catggcctgg gttggcctca ttggctgtcc ctgaaatgct gaggaggtgg 4260  
 gttacttccc tccgccagg ccagaccag gcagctgtc cccagcttcc atgagcttct 4320  
 ttctcagatt caaacagaca gagaagaaca tggcccattc tgtggaaga cattgcccc 4380  
 caggattgaa acaaaaagca acacggtgac catcaccttt gtcacagatg aatcaggaga 4440  
 ccacacaggc tgaagatcc actacagag cacagtgagc aagtgggctc agatccttgg 4500  
 tggaagcgca gagctgcctc tctctggagt gcaaggagct gtagagtgtg gggctcttct 4560  
 gggcaggact aggaaggac accaggttta gtggtgctga ggtctgaggc agcagcttct 4620  
 aaggggaagc acccgtgcc tcctcagcag caccagcat cttcaccact cattcttcaa 4680  
 ccaccattc acccatcact catcttttac ccaccaccc tttgccactc atccttctgt 4740  
 ccctcatcct tccaaccatt catcaatcac ccaccatcc atcctttgcc acacaacat 4800  
 ccaccattc ttctacctac ccacatcct catccatcct tctatcagca tccttctacc 4860  
 acccatcctt cgttcggtca tccatcatca tccatccatc 4900

<210> 8  
 <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

10

<210> 9  
 <211> 181  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

15

<400> 9

ES 2 631 127 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Arg Thr Cys Ser  
 180

5 <210> 10  
 <211> 293  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

10 <400> 10

ES 2 631 127 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln Arg  
180 185 190

Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys Leu  
195 200 205

Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val Ile  
210 215 220

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu  
225 230 235 240

Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His Gly  
245 250 255

Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser Asn  
260 265 270

Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr Gly  
275 280 285

Trp Lys Ile His Tyr  
290

- 5 <210> 11
- <211> 41
- <212> PRT
- <213> Homo sapien

ES 2 631 127 T3

<400> 11

Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys  
1 5 10 15

Asp His His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg  
20 25 30

Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys  
35 40

- 5 <210> 12
- <211> 242
- <212> PRT
- <213> Homo sapien

10 <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



ES 2 631 127 T3

<210> 15  
 <211> 43  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 15  
 Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp  
 1 5 10 15  
 Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser  
 20 25 30  
 Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln  
 10 35 40  
 <210> 16  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 20  
 <400> 16  
 Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn  
 1 5  
 <210> 17  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 30  
 <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  
 35  
 <210> 18  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 18  
 Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly  
 1 5  
 45  
 <210> 19  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 50

ES 2 631 127 T3

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 19

Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys  
 1 5 10 15

5 Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val  
 20 25

<210> 20

<211> 960

<212> ADN

10 <213> Homo sapien

<220>

<221> CDS

<222> (51)..(797)

15

<400> 20

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

ES 2 631 127 T3

Val 35	Ile	Ala	Cys	Ser	Ser 40	Pro	Gly	Ile	Asn	Gly 45	Phe	Pro	Gly	Lys	Asp 50	
ggg Gly	cgt Arg	gat Asp	ggc Gly	acc Thr 55	aag Lys	gga Gly	gaa Glu	aag Lys	ggg Gly 60	gaa Glu	cca Pro	ggc Gly	caa Gln	ggg Gly 65	ctc Leu	248
aga Arg	ggc Gly	tta Leu	cag Gln 70	ggc Gly	ccc Pro	cct Pro	gga Gly	aag Lys 75	ttg Leu	ggg Gly	cct Pro	cca Pro	gga Gly 80	aat Asn	cca Pro	296
ggg Gly	cct Pro	tct Ser 85	ggg Gly	tca Ser	cca Pro	gga Gly	cca Pro 90	aag Lys	ggc Gly	caa Gln	aaa Lys 95	gga Gly	gac Asp	cct Pro	gga Gly	344
aaa Lys	agt Ser 100	ccg Pro	gat Asp	ggt Gly	gat Asp 105	agt Ser	agc Ser	ctg Leu	gct Ala	gcc Ala 110	tca Ser	gaa Glu	aga Arg	aaa Lys	gct Ala	392
ctg Leu 115	caa Gln	aca Thr	gaa Glu	atg Met	gca Ala 120	cg Arg	atc Ile	aaa Lys	aag Lys	tgg Trp 125	ctc Leu	acc Thr	ttc Phe	tct Ser	ctg Leu 130	440
ggc Gly	aaa Lys	caa Gln	ggt Val 135	ggg Gly	aac Asn	aag Lys	ttc Phe	ttc Phe	ctg Leu 140	acc Thr	aat Asn	ggt Gly	gaa Glu	ata Ile 145	atg Met	488
acc Thr	ttt Phe	gaa Glu	aaa Lys 150	gtg Val	aag Lys	gcc Ala	ttg Leu	tgt Cys 155	gtc Val	aag Lys	ttc Phe	cag Gln	gcc Ala 160	tct Ser	gtg Val	536
gcc Ala	acc Thr	ccc Pro 165	agg Arg	aat Asn	gct Ala	gca Ala	gag Glu 170	aat Asn	gga Gly	gcc Ala	att Ile	cag Gln 175	aat Asn	ctc Leu	atc Ile	584
aag Lys 180	gag Glu	gaa Glu	gcc Ala	ttc Phe	ctg Leu	ggc Gly 185	atc Ile	act Thr	gat Asp	gag Glu	aag Lys 190	aca Thr	gaa Glu	ggg Gly	cag Gln	632
ttt Phe 195	gtg Val	gat Asp	ctg Leu	aca Thr 200	gga Gly	aat Asn	aga Arg	ctg Leu	acc Thr	tac Tyr 205	aca Thr	aac Asn	tgg Trp	aac Asn	gag Glu 210	680
ggt Gly	gaa Glu	ccc Pro	aac Asn 215	aat Asn	gct Ala	ggt Gly	tct Ser	gat Asp	gaa Glu 220	gat Asp	tgt Cys	gta Val	ttg Leu	cta Leu 225	ctg Leu	728
aaa Lys	aat Asn	ggc Gly	cag Gln 230	tgg Trp	aat Asn	gac Asp	gtc Val	ccc Pro 235	tgc Cys	tcc Ser	acc Thr	tcc Ser	cat His 240	ctg Leu	gcc Ala	776
gtc Val	tgt Cys	gag Glu	ttc Phe	cct Pro	atc Ile	tga	agggtcatat	cactcaggcc	ctccttgtct							827
ttttactgca	accacaggc	ccacagtatg	cttgaaaaga	taaattatat	caatttcctc											887
atatccagta	ttgttccttt	tgtgggcaat	cactaaaaat	gatcactaac	agcaccaaca											947
aagcaataat	agt															960

<210> 21  
 <211> 248  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapien  
 <400> 21

ES 2 631 127 T3

Met Ser Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ser Met Val Ala  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu  
 130 135 140

Ile Met Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala  
 145 150 155 160

Ser Val Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn  
 165 170 175

Leu Ile Lys Glu Glu Ala Phe Leu Gly Ile Thr Asp Glu Lys Thr Glu  
 180 185 190

Gly Gln Phe Val Asp Leu Thr Gly Asn Arg Leu Thr Tyr Thr Asn Trp  
 195 200 205

Asn Glu Gly Glu Pro Asn Asn Ala Gly Ser Asp Glu Asp Cys Val Leu  
 210 215 220

Leu Leu Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro Cys Ser Thr Ser His  
 225 230 235 240

Leu Ala Val Cys Glu Phe Pro Ile  
 245

5 <210> 22  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia consenso de péptido sintético

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

15 <222> (1) .. (1)  
 <223> en donde X en la posición 1 representa hidroxiprolina

- <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (4)..(4)  
 5 <223> en donde X en la posición 4 representa un residuo hidrófobo
- <400> 22  
 Xaa Gly Lys Xaa Gly Pro  
 1 5
- 10 <210> 23  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 15 <220>  
 <223> Péptido sintético
- <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 20 <222> (1).. (1)  
 <223> en donde X representa hidroxiprolina
- <400> 23  
 Xaa Gly Lys Leu Gly  
 1 5
- 25 <210> 24  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>  
 <223> Péptido sintético
- <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 35 <222> (9)..(15)  
 <223> en donde X en las posiciones 9 y 15 representa hidroxiprolina
- <400> 24  
 Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly Lys Leu Gly Pro Xaa Gly  
 1 5 10 15
- 40 <210> 25  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 <223> Péptido sintético
- 50 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (3)..(27)  
 <223> en donde X en las posiciones 3, 6, 15, 21, 24, 27 representa hidroxiprolina
- 55 <400> 25  
 Gly Pro xaa Gly Pro Xaa Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly  
 1 5 10 15
- Lys Leu Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa  
 20 25

- <210> 26  
 <211> 53  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 5  
 <220>  
 <223> Péptido sintético
- 10  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (26)..(26)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 15  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (32)..(32)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 20  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (35)..(35)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 25  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (41)..(41)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 30  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (50)..(50)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- <400> 26  
 Gly Lys Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly  
 1 5 10 15
- Gln Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly Lys Leu Gly Pro Xaa  
 20 25 30
- Gly Asn Xaa Gly Pro Ser Gly Ser Xaa Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly  
 35 40 45
- 35  
 Asp Xaa Gly Lys Ser  
 50
- 40  
 <210> 27  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 <223> Péptido sintético
- 45  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (3)..(33)  
 <223> en donde X en las posiciones 3, 6, 12, 18, 21, 30, 33 representa hidroxiprolina
- 50  
 <400> 27

ES 2 631 127 T3

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

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

Xaa

5 <210> 28  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (3)..(45)  
 <223> en donde X en las posiciones 3, 6, 9, 27, 30, 36, 42, 45 representa hidroxiprolina

15 <400> 28  
 Gly Cys xaa Gly Leu Xaa Gly Ala xaa Gly Asp Lys Gly Glu Ala Gly  
 1 5 10 15

Thr Asn Gly Lys Arg Gly Glu Arg Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Lys  
 20 25 30

Ala Gly Pro Xaa Gly Pro Asn Gly Ala Xaa Gly Glu Xaa  
 35 40 45

20 <210> 29  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 29  
 Leu Gln Arg Ala Leu Glu Ile Leu Pro Asn Arg Val Thr Ile Lys Ala  
 1 5 10 15

Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile  
 20

30 <210> 30  
 <211> 559  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapien

35 <400> 30

ES 2 631 127 T3

	atgaggctgc tgaccctcct gggccttctg tgtggctcgg tggccacccc cttgggccc	60
	aagtggcctg aacctgtgtt cgggcgcctg gcatcccccg gctttccagg ggagtatgcc	120
	aatgaccagg agcggcgtg gaccctgact gcaccccccg gctaccgcct ggcctctac	180
	ttcaccact tcgacctgga gctctccac ctctgcgagt acgacttcgt caagctgagc	240
	tcgggggcca aggtgctggc cacgctgtgc gggcaggaga gcacagacac ggagcgggcc	300
	cctggcaagg acactttcta ctgctgggc tccagcctgg acattacctt ccgctccgac	360
	tactccaacg agaagccgtt cacgggggtc gaggccttct atgcagccga ggacattgac	420
	gagtgccagg tggccccggg agaggcggc acctgcgacc accactgcca caaccacctg	480
	ggcggtttct actgctcctg ccgcgaggc tacgtcctgc accgtaaca ggcacactgc	540
	tcagccctgt gctccggcc	559
5	<210> 31 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Oligo sintético	
	<400> 31 cgggcacacc atgaggctgc tgaccctcct gggc	34
15	<210> 32 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Oligo sintético	
	<400> 32 gacattacct tccgctccga ctccaacgag aag	33
25	<210> 33 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Oligo sintético	
35	<400> 33 agcagccctg aatacccacg gccgatccc aaa	33
40	<210> 34 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> Oligo sintético	
	<400> 34 cgggatccat gaggctgctg accctc	26
50	<210> 35 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	

<220>  
 <223> Oligo sintético

5 <400> 35  
 ggaattccta ggctgcata 19

<210> 36  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligo sintético

15 <400> 36  
 ggaattccta cagggcgct 19

<210> 37  
 <211> 19  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligo sintético

25 <400> 37  
 ggaattccta gtagtggat 19

<210> 38  
 <211> 25  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligo sintético

35 <400> 38  
 tgcggccgct gtagtgctg tcttt 25

<210> 39  
 <211> 23  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligo sintético

45 <400> 39  
 ggaattcact cgttattctc gga 23

50 <210> 40  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligo sintético

55 <400> 40  
 tccgagaata acgagtg 17

<210> 41  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligo sintético  
  
 <400> 41  
 5 cattgaaagc ttgggtag aagtggtc 29  
  
 <210> 42  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligo sintético  
  
 <400> 42  
 15 cgcgccgca gctgctcaga gtgtaga 27  
  
 <210> 43  
 <211> 28  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligo sintético  
 25  
 <400> 43  
 cggtaaagctt cactggctca gggaaata 28  
  
 <210> 44  
 30 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 35 <223> Oligo sintético  
  
 <400> 44  
 aagaagcttg ccgccacat ggattggctg tggaact 37  
  
 40 <210> 45  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 45 <220>  
 <223> Oligo sintético  
  
 <400> 45  
 50 cgggatcctc aaactttct gtccaccttg g 31  
  
 <210> 46  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Oligo sintético  
  
 <400> 46  
 60 aagaaagctt gccccacca tgttctact agctct 36  
  
 <210> 47  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 631 127 T3

<220>  
 <223> Oligo sintético

5 <400> 47  
 cgggatcctt ctcctctaa cactct 26

<210> 48  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

15 <400> 48  
 G<sup>1</sup>u Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
 1 5

<210> 49  
 <211> 4960  
 20 <212> ADN  
 <213> Homo Sapien

<400> 49  
 ccggacgtgg tggcgcacgc ctgtaatccc agctactcgg gaggctgagg caggagaatt 60  
 gctcgaaccc cggaggcaga ggtttggtgg ctcacacctg taatcccagc actttgcgag 120  
 gctgaggcag gtgcatcgct ttggctcagg agttcaagac cagcctgggc aacacagggg 180  
 gacccccatc tctacaaaaa acaaaaacaa atataaaggg gataaaaaaa aaaaaagac 240  
 aagacatgaa tccatgagga cagagtgtgg aagaggaagc agcagcctca aagttctgga 300  
 agctggaaga acagataaac aggtgtgaaa taactgcctg gaaagcaact tctttttttt 360  
 tttttttttt tttgaggtgg agtctcactc tgcgtccag gctggagtgc agtgggtcga 420  
 tctcggatca ctgcaacctc cgctcccag gctcaagcaa ttctcctgcc tcagcctccc 480  
 gagtagctgg gattataagt gcgcgctgcc acacctggat gatttttgta ttttagtag 540  
 agatgggatt tcaccatggt ggtcaggctg gtctcaaact cccaacctcg tgatccaccc 600  
 accttggcct cccaaagtgc tgggattaca ggtataagcc accgagccca gccaaaagcg 660  
 acttctaagc ctgcaagggg atcgggaatt ggtggcacca ggtccttctg acagggttta 720  
 agaaattagc cagcctgagg ctgggcacgg tggctcacac ctgtaatccc agcactttgg 780  
 gaggctaagg caggtggatc acctgagggc aggagttcaa gaccagcctg accaacaatgg 840

25

ES 2 631 127 T3

agaaacccca tccctaccaa aaataaaaaa ttagccaggt gtggtggtgc tcgctgtaa 900  
 tcccagctac ttgggaggct gaggtgggag gattgcttga acacaggaag tagaggctgc 960  
 agtgagctat gattgcagca ctgactgaa gccggggcaa cagaacaaga tccaaaaaaa 1020  
 agggaggggt gaggggcaga gccaggattt gtttccaggc tgttgttacc taggtccgac 1080  
 tcctggctcc cagagcagcc tgtcctgcct gcctggaact ctgagcaggc tggagtcag 1140  
 gagtcgattc ccagaatccc agagtcaggg aggctggggg caggggcagg tctactggaca 1200  
 aacagatcaa aggtgagacc agcgtagggc tgcagaccag gccaggccag ctggacgggc 1260  
 acaccatgag gtaggtgggc gccacagcc tccctgcagg gtgtggggtg ggagcacagg 1320  
 cctgggccct caccgcccc tgcctgccca taggctgctg accctcctgg gccttctgtg 1380  
 tggctcggty gccaccccc tgggccgaa gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc 1440  
 atccccggc tttccagggg agtatgcaa tgaccaggag cggcgctgga ccctgactgc 1500  
 accccccgc taccgctgc gcctctactt caccacttc gacctggagc tctcccact 1560  
 ctgcgagtac gacttcgta aggtgccgtc aggacgggag ggctggggtt tctcagggtc 1620  
 ggggggtccc caaggagtag ccagggttca gggacacctg ggagcagggg ccaggcttgg 1680  
 ccaggagga gatcaggcct gggctctgcc ttcactccct gtgacacctg accccacagc 1740  
 tgagctcggg ggccaaggty ctggccacgc tgtcgggca ggagagcaca gacacggagc 1800  
 gggccccctg caaggacact ttctactcgc tgggctccag cctggacatt acctccgct 1860  
 ccgactactc caacgagaag ccgttcacgg ggttcgaggc cttctatgca gccgagggty 1920  
 agccaagagg ggtcctgcaa catctcagtc tgcgcagctg gctgtggggg taactctgtc 1980  
 ttagccagag cagccctgcc ttcagttcc ccaccttcc cagggcaggg gagaggcctc 2040  
 tggcctgaca tcatccaaa tgcaaagacc aaaacagccg tgacctccat tcacatgggc 2100  
 tgagtgccaa ctctgagcca gggatctgag gacagcatcg cctcaagtga cgcagggact 2160  
 ggccgggcy agcagctcac gcctgtaatt ccagcacttt gggaggccga ggctggctga 2220  
 tcatttgagg tcaggagttc aaggccagcc agggcaacac ggtgaaactc tatctccact 2280  
 aaaactaaa aaattagctg ggcgtggtgg tgcgcacctg gaatcccagc tactagggag 2340  
 gctgaggcag gagaattgct tgaacctgcy aggtggaggc tgcagtgaac agagattgca 2400  
 ccactacact ccagcctggg cgacagagct agactccgtc tcaaaaaaca aaaaacaaaa 2460  
 acgacgcagg gggcagggc cccatttaca gctgacaaaag tggggccctg ccagcgggag 2520  
 cgctgccagg atgtttgatt tcagatccca gtccctgcag agaccaactg tgtgacctc 2580  
 ggcaagtggc tcaatttctc tgctccttag gaagctgctg caagggttca gcgctgtagc 2640  
 cccgccccct gggtttgatt gactcccctc attagctggg tgacctcggg ccggacactg 2700  
 aaactcccac tggtttaaca gaggtgatgt ttgcatcttt ctcccagcgc tgctgggagc 2760

ES 2 631 127 T3

ttgcagcgac cctaggcctg taagggtgatt ggccccggcac cagtccccgca ccctagacag 2820  
 gacgaggcct cctctgaggt ccactctgag gtcattggatc tcctgggagg agtccaggct 2880  
 ggatccccgcc tctttccctc ctgacggcct gcctggccct gcctctcccc cagacattga 2940  
 cgagtgccag gtggccccgg gagaggcgcc cacctgcgac caccactgcc acaaccacct 3000  
 gggcggtttc tactgtctct gccgcgcagg ctacgtcctg caccgtaaca agcgcacctg 3060  
 ctacagccctg tgctccggcc aggtcttcac ccagaggtct ggggagctca gcagccctga 3120  
 ataccacagc ccgtatccca aactctccag ttgacttac agcatcagcc tggaggaggg 3180  
 gttcagtgtc attctggact ttgtggagtc cttcgatgtg gagacacacc ctgaaacct 3240  
 gtgtccctac gactttctca agattcaaac agacagagaa gaacatggcc cattctgtgg 3300  
 gaagacattg cccacagga ttgaaacaaa aagcaacacg gtgaccatca cttttgtcac 3360  
 agatgaatca ggagaccaca caggctggaa gatccactac acgagcacag cgcacgcttg 3420  
 cccttatccg atggcgccac ctaatggcca cgtttcacct gtgcaagcca aatacatcct 3480  
 gaaagacagc ttctccatct tttgcgagac tggctatgag cttctgcaag gtcacttgcc 3540  
 cctgaaatcc ttactgcag tttgtcagaa agatggatct tgggaccggc caatgcccgc 3600  
 gtgcagcatt gttgactgtg gccctcctga tgatctacc agtggccgag tggagtacat 3660  
 cacaggtcct ggagtgacca cctacaaagc tgtgattcag tacagctgtg aagagacctt 3720  
 ctacacaatg aaagtgaatg atggtaataa tgtgtgtgag gctgatggat tctggacgag 3780  
 ctccaaagga gaaaaatcac tcccagtctg tgagcctggt tgtggactat cagcccgcac 3840  
 aacaggaggg cgtatatatg gagggcaaaa ggcaaacct ggtgattttc cttggcaagt 3900  
 cctgatatta ggtggaacca cagcagcagg tgactttta tatgacaact gggcctaac 3960  
 agctgctcat gccgtctatg agcaaaaaca tgatgcattc gccctggaca ttcgaatggg 4020  
 cacctgaaa agactatcac ctattatac acaagcctgg tctgaagctg ttttataca 4080  
 tgaaggttat actcatgatg ctggcttga caatgacata gcactgatta aattgaataa 4140  
 caaagttgta atcaatagca acatcacgcc tttttgtctg ccaagaaaag aagctgaatc 4200  
 ctttatgagg acagatgaca ttggaactgc atctggatgg ggattaacc aaaggggtt 4260  
 tcttgctaga aatctaagt atgtcgacat accgattggt gaccatcaa aatgtactgc 4320  
 tgcatatgaa aagccaccct atccaagggg aagtgtaact gctaactgc tttgtgctgg 4380  
 cttagaaagt gggggcaagg acagctgcag aggtgacagc ggaggggcac tgggttttct 4440  
 agatagtgaa acagagaggt ggtttgtggg aggaatagtg tcctgggggt ccatgaattg 4500  
 tggggaagca ggtcagtatg gagtctacac aaaagttatt aactatattc cctggatcga 4560  
 gaacataatt agtgattttt aacttgctg tctgcagtca aggattctt attttagaa 4620  
 --  
 atgcctgtga agacctggc agcgacgtgg ctcgagaagc attcatcatt actgtggaca 4680  
 tggcagttgt tgctccacc aaaaaaacag actccaggtg aggtgctgt catttctcca 4740  
 cttgccagtt taattccagc cttaccatt gactcaaggg gacataaacc acgagagtga 4800  
 cagtcattct tgcccacca gtgtaatgtc actgctcaaa ttacatttca ttacctaaa 4860  
 aagccagtct cttttcatac tggctgttg catttctgta aactgcctgt ccatgctctt 4920  
 tgtttttaa cttgttctta ttgaaaaaaa aaaaaaaaaa 4960

5 <210> 50  
 <211> 2090  
 <212> ADN

ES 2 631 127 T3

<213> CDS de MASP-2 murina

<220>

<221> CDS

5 <222> (33)..(2090)

<400> 50

```

ggcgcctggac tgcagagcta tgggtggcaca cc atg agg cta ctc atc ttc ctg      53
                               Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu
                               1           5

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

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

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

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

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

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

gac acc ttc tac tca ctg ggt ccc agc cta aag gtc acc ttc cac tcc      389
Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser
                               105           110           115

gac tac tcc aat gag aag ccg ttc aca ggg ttt gag gcc ttc tat gca      437
Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala
                               120           125           130           135

gcg gag gat gtg gat gaa tgc aga gtg tct ctg gga gac tca gtc cct      485
Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Val Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro
                               140           145           150

```

ES 2 631 127 T3

tgt Cys	gac Asp	cat His	tat Tyr 155	tgc Cys	cac His	aac Asn	tac Tyr	ttg Leu 160	ggc Gly	ggc Gly	tac Tyr	tat Tyr	tgc Cys 165	tcc Ser	tgc Cys	533
aga Arg	gcg Ala	ggc Gly 170	tac Tyr	att Ile	ctc Leu	cac His	cag Gln 175	aac Asn	aag Lys	cac His	acg Thr	tgc Cys 180	tca Ser	gcc Ala	ctt Leu	581
tgt Cys	tca Ser 185	ggc Gly	cag Gln	gtg Val	ttc Phe	aca Thr 190	gga Gly	aga Arg	tct Ser	ggg Gly	tat Tyr 195	ctc Leu	agt Ser	agc Ser	cct Pro	629
gag Glu 200	tac Tyr	ccg Pro	cag Gln	cca Pro	tac Tyr 205	ccc Pro	aag Lys	ctc Leu	tcc Ser	agc Cys 210	tgc Cys	acc Thr	tac Tyr	agc Ser	atc Ile 215	677
cgc Arg	ctg Leu	gag Glu	gac Asp	ggc Gly 220	ttc Phe	agt Ser	gtc Val	atc Ile	ctg Leu 225	gac Asp	ttc Phe	gtg Val	gag Glu	tcc Ser 230	ttc Phe	725
gat Asp	gtg Val	gag Glu	acg Thr 235	cac His	cct Pro	gaa Glu	gcc Ala	cag Gln 240	tgc Cys	ccc Pro	tat Tyr	gac Asp	tcc Ser 245	ctc Leu	aag Lys	773
att Ile	caa Gln 250	aca Thr	gac Asp	aag Lys	ggg Gly	gaa Glu	cac His 255	ggc Gly	cca Pro	ttt Phe	tgt Cys	ggg Gly 260	aag Lys	acg Thr	ctg Leu	821
cct Pro	ccc Pro 265	agg Arg	att Ile	gaa Glu	act Thr	gac Asp 270	agc Ser	cac His	aag Lys	gtg Val	acc Thr 275	atc Ile	acc Thr	ttt Phe	gcc Ala	869
act Thr 280	gac Asp	gag Glu	tcg Ser	ggg Gly	aac Asn 285	cac His	aca Thr	ggc Gly	tgg Trp	aag Lys 290	ata Ile	cac His	tac Tyr	aca Thr	agc Ser 295	917
aca Thr	gca Ala	cgg Arg	ccc Pro	tgc Cys 300	cct Pro	gat Asp	cca Pro	acg Thr	gcg Ala 305	cca Pro	cct Pro	aat Asn	ggc Gly	agc Ser 310	att Ile	965
tca Ser	cct Pro	gtg Val	caa Gln 315	gcc Ala	acg Thr	tat Tyr	gtc Val	ctg Leu 320	aag Lys	gac Asp	agg Arg	ttt Phe	tct Ser 325	gtc Val	ttc Phe	1013
tgc Cys	aag Lys	aca Thr 330	ggc Gly	ttc Phe	gag Glu	ctt Leu	ctg Leu 335	caa Gln	ggt Gly	tct Ser	gtc Val	ccc Pro 340	ctg Leu	aaa Lys	tca Ser	1061
ttc Phe	act Thr 345	gct Ala	gtc Val	tgt Cys	cag Gln	aaa Lys 350	gat Asp	gga Gly	tct Ser	tgg Trp	gac Asp 355	cgg Arg	ccg Pro	atg Met	cca Pro	1109
gag Glu 360	tgc Cys	agc Ser	att Ile	att Ile	gat Asp 365	tgt Cys	ggc Gly	cct Pro	ccc Pro	gat Asp 370	gac Asp	cta Leu	ccc Pro	aat Asn	ggc Gly 375	1157
cat His	gtg Val	gac Asp	tat Tyr	atc Ile 380	aca Thr	ggc Gly	cct Pro	caa Gln	gtg Val 385	act Thr	acc Thr	tac Tyr	aaa Lys	gct Ala 390	gtg Val	1205
att Ile	cag Gln	tac Tyr	agc Ser	tgt Cys	gaa Glu	gag Glu	act Thr	ttc Phe	tac Tyr	aca Thr	atg Met	agc Ser	agc Ser	aat Asn	ggt Gly	1253

ES 2 631 127 T3

395					400					405						
aaa Lys	tat Tyr	gtg Val 410	tgt Cys	gag Glu	gct Ala	gat Asp	gga Gly 415	ttc Phe	tgg Trp	acg Thr	agc Ser	tcc Ser 420	aaa Lys	gga Gly	gaa Glu	1301
aaa Lys	ctc Leu 425	ccc Pro	ccg Pro	gtt Val	tgt Cys	gag Glu 430	cct Pro	gtt Val	tgt Cys	ggg Gly	ctg Leu 435	tcc Ser	aca Thr	cac His	act Thr	1349
ata Ile 440	gga Gly	gga Gly	cgc Arg	ata Ile	gtt Val 445	gga Gly	ggg Gly	cag Gln	cct Pro	gca Ala 450	aag Lys	cct Pro	ggt Gly	gac Asp	ttt Phe 455	1397
cct Pro	tgg Trp	caa Gln	gtc Val 460	ttg Leu	ttg Leu	ctg Leu	ggt Gly	caa Gln	act Thr 465	aca Thr	gca Ala	gca Ala	gca Ala	ggt Gly 470	gca Ala	1445
ctt Leu	ata Ile	cat His	gac Asp 475	aat Asn	tgg Trp	gtc Val	cta Leu	aca Thr 480	gcc Ala	gct Ala	cat His	gct Ala	gta Val 485	tat Tyr	gag Glu	1493
aaa Lys	aga Arg	atg Met 490	gca Ala	gcg Ala	tcc Ser	tcc Ser	ctg Leu 495	aac Asn	atc Ile	cga Arg	atg Met	ggc Gly 500	atc Ile	ctc Leu	aaa Lys	1541
agg Arg	ctc Leu 505	tca Ser	cct Pro	cat His	tac Tyr	act Thr 510	caa Gln	gcc Ala	tgg Trp	ccc Pro	gag Gly 515	gaa Glu	atc Ile	ttt Phe	ata Ile	1589
cat His 520	gaa Glu	ggc Gly	tac Tyr	act Thr	cac His 525	ggt Gly	gct Ala	ggt Gly	ttt Phe	gac Asp 530	aat Asn	gat Asp	ata Ile	gca Ala	ttg Leu 535	1637
att Ile	aaa Lys	ctc Leu	aag Lys	aac Asn 540	aaa Lys	gtc Val	aca Thr	atc Ile	aac Asn 545	gga Gly	agc Ser	atc Ile	atg Met	cct Pro 550	gtt Val	1685
tgc Cys	cta Leu	ccg Pro	cga Arg 555	aaa Lys	gaa Glu	gct Ala	gca Ala	tcc Ser 560	tta Leu	atg Met	aga Arg	aca Thr	gac Asp 565	ttc Phe	act Thr	1733
gga Gly	act Thr	gtg Val 570	gct Ala	ggc Gly	tgg Trp	ggg Gly	tta Leu 575	acc Thr	cag Gln	aag Lys	ggg Gly	ctt Leu 580	ctt Leu	gct Ala	aga Arg	1781
aac Asn 585	cta Leu	atg Met	ttt Phe	gtg Val	gac Asp	ata Ile 590	cca Pro	att Ile	gct Ala	gac Asp	cac His 595	caa Gln	aaa Lys	tgt Cys	acc Thr	1829
acc Thr 600	gtg Val	tat Tyr	gaa Glu	aag Lys	ctc Leu 605	tat Tyr	cca Pro	gga Gly	gta Val	aga Arg 610	gta Val	agc Ser	gct Ala	aac Asn	atg Met 615	1877
ctc Leu	tgt Cys	gct Ala	ggc Gly	tta Leu 620	gag Glu	act Thr	ggt Gly	ggc Gly	aag Lys 625	gac Asp	agc Ser	tgc Cys	aga Arg	ggt Gly 630	gac Asp	1925
agt Ser	ggg Gly	ggg Gly	gca Ala 635	tta Leu	gtg Val	ttt Phe	cta Leu	gat Asp 640	aat Asn	gag Glu	aca Thr	cag Gln	cga Arg 645	tgg Trp	ttt Phe	1973
gtg Val	gga Gly	gga Gly	ata Ile	gtt Val	tcc Ser	tgg Trp	ggt Gly	tcc Ser	att Ile	aat Asn	tgt Cys	ggg Gly	gcg Ala	gca Ala	ggc Gly	2021
cag Gln 665	tat Tyr	ggg Gly	gtc Val	tac Tyr	aca Thr	aaa Lys 670	gtc Val	atc Ile	aac Asn	tat Tyr	att Ile 675	ccc Pro	tgg Trp	aat Asn	gag Glu	2069
aac Asn 680	ata Ile	ata Ile	agt Ser	aat Asn	ttc Phe 685	taa										2090

5 <210> 51  
 <211> 685  
 <212> PRT

ES 2 631 127 T3

<213> CDS de MASP-2 murina

<400> 51

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

5

ES 2 631 127 T3

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

ES 2 631 127 T3

Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly Gln  
 435 440 445

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

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

Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu Asn  
 485 490 495

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

Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly  
 515 520 525

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

Asn Gly Ser Ile Met Pro Val Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser  
 545 550 555 560

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

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

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

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  
 <212> PRT  
 <213> Proteína madura MASP-2 murina

5

<400> 52

ES 2 631 127 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

ES 2 631 127 T3

Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Gly Glu His  
 225 230 235 240

Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser  
 245 250 255

His Lys Val Thr Ile Thr Phe Ala Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr  
 260 265 270

Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Arg Pro Cys Pro Asp Pro  
 275 280 285

Thr Ala Pro Pro Asn Gly Ser Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val  
 290 295 300

Leu Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu  
 305 310 315 320

Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp  
 325 330 335

Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly  
 340 345 350

Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro  
 355 360 365

Gln Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr  
 370 375 380

Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly  
 385 390 395 400

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

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



ES 2 631 127 T3

Met Arg Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val																
1	5	10														
gcc Ala 15	aca Thr 15	ctt Leu 15	ttg Leu 15	ggc Gly 20	tcc Ser 20	aag Lys 20	tgg Trp 20	cct Pro 25	gag Glu 25	cct Pro 25	gta Val 25	ttc Phe 30	ggg Gly 30	cgc Arg 30	ctg Leu 30	99
gtg Val 35	tcc Ser 35	ctg Leu 35	gcc Ala 35	ttc Phe 35	cca Pro 35	gag Glu 35	aag Lys 35	tat Tyr 40	ggc Gly 40	aac Asn 40	cat His 40	cag Gln 45	gat Asp 45	cga Arg 45	tcc Ser 45	147
tgg Trp 50	acg Thr 50	ctg Leu 50	act Thr 50	gca Ala 50	ccc Pro 50	cct Pro 50	ggc Gly 55	ttc Phe 55	cgc Arg 55	ctg Leu 55	cgc Arg 55	ctc Leu 60	tac Tyr 60	ttc Phe 60	acc Thr 60	195
cac His 65	ttc Phe 65	aac Asn 65	ctg Leu 65	gaa Glu 65	ctc Leu 65	tct Ser 70	tac Tyr 70	cgc Arg 70	tgc Cys 70	gag Glu 75	tat Tyr 75	gac Asp 75	ttt Phe 75	gtc Val 75	aag Lys 75	243
ttg Leu 80	acc Thr 80	tca Ser 80	ggg Gly 85	acc Thr 85	aag Lys 85	gtg Val 85	cta Leu 85	gcc Ala 90	acg Thr 90	ctg Leu 90	tgt Cys 90	ggg Gly 90	cag Gln 95	gag Glu 95	agt Ser 95	291
aca Thr 95	gat Asp 95	act Thr 95	gag Glu 95	cgg Arg 100	gca Ala 100	cct Pro 100	ggc Gly 105	aat Asn 105	gac Asp 105	acc Thr 105	ttc Phe 105	tac Tyr 110	tca Ser 110	ctg Leu 110	ggt Gly 110	339
ccc Pro 115	agc Ser 115	cta Leu 115	aag Lys 115	gtc Val 115	acc Thr 115	ttc Phe 120	cac His 120	tcc Ser 120	gac Asp 120	tac Tyr 125	tcc Ser 125	aat Asn 125	gag Glu 125	aag Lys 125	cca Pro 125	387
ttc Phe 130	aca Thr 130	gga Gly 130	ttt Phe 130	gag Glu 130	gcc Ala 135	ttc Phe 135	tat Tyr 135	gca Ala 135	gcg Ala 135	gag Glu 140	gat Asp 140	gtg Val 140	gat Asp 140	gaa Glu 140	tgc Cys 140	435
aga Arg 145	aca Thr 145	tcc Ser 145	ctg Leu 145	gga Gly 145	gac Asp 150	tca Ser 150	gtc Val 150	cct Pro 150	tgt Cys 155	gac Asp 155	cat His 155	tat Tyr 155	tgc Cys 155	cac His 155	aac Asn 155	483
tac Tyr 160	ctg Leu 160	ggc Gly 160	ggc Gly 160	tac Tyr 165	tac Tyr 165	tgc Cys 165	tcc Ser 165	tgc Cys 165	cga Arg 170	gtg Val 170	ggc Gly 170	tac Tyr 170	att Ile 170	ctg Leu 170	cac His 170	531
cag Gln 175	aac Asn 175	aag Lys 175	cat His 180	acc Thr 180	tgc Cys 180	tca Ser 180	gcc Ala 185	ctt Leu 185	tgt Cys 185	tca Ser 185	ggc Gly 185	cag Gln 190	gtg Val 190	ttc Phe 190	act Thr 190	579
ggg Gly 195	agg Arg 195	tct Ser 195	ggc Gly 195	ttt Phe 195	ctc Leu 195	agt Ser 200	agc Ser 200	cct Pro 200	gag Glu 200	tac Tyr 205	cca Pro 205	cag Gln 205	cca Pro 205	tac Tyr 205	ccc Pro 205	627
aaa Lys 210	ctc Leu 210	tcc Ser 210	agc Ser 210	tgc Cys 210	gcc Ala 215	tac Tyr 215	aac Asn 215	atc Ile 215	cgc Arg 215	ctg Leu 220	gag Glu 220	gaa Glu 220	ggc Gly 220	ttc Phe 220	agt Ser 220	675
atc Ile 225	acc Thr 225	ctg Leu 225	gac Asp 225	ttc Phe 225	gtg Val 230	gag Glu 230	tcc Ser 230	ttt Phe 230	gat Asp 235	gtg Val 235	gag Glu 235	atg Met 235	cac His 235	cct Pro 235	gaa Glu 235	723
gcc Ala 240	cag Gln 240	tgc Cys 240	ccc Pro 245	tac Tyr 245	gac Asp 245	tcc Ser 245	ctc Leu 245	aag Lys 245	att Ile 250	caa Gln 250	aca Thr 250	gac Asp 250	aag Lys 250	agg Arg 250	gaa Glu 250	771

ES 2 631 127 T3

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

ES 2 631 127 T3

gcc tgg cca gag gct gtc ttt atc cat gaa ggc tac act cac gga gct 1587  
 Ala Trp Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala  
 515 520 525

ggt ttt gac aat gat ata gca ctg att aaa ctc aag aac aaa gtc aca 1635  
 Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr  
 530 535 540

atc aac aga aac atc atg ccg att tgt cta cca aga aaa gaa gct gca 1683  
 Ile Asn Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala  
 545 550 555

tcc tta atg aaa aca gac ttc gtt gga act gtg gct ggc tgg ggg tta 1731  
 Ser Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu  
 560 565 570

acc cag aag ggg ttt ctt gct aga aac cta atg ttt gtg gac ata cca 1779  
 Thr Gln Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro  
 575 580 585 590

att gtt gac cac caa aaa tgt gct act gcg tat aca aag cag ccc tac 1827  
 Ile Val Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr  
 595 600 605

cca gga gca aaa gtg act gtt aac atg ctc tgt gct ggc cta gac cgc 1875  
 Pro Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg  
 610 615 620

ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga ggg gca tta gtg ttt 1923  
 Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe  
 625 630 635

cta gac aat gaa aca cag aga tgg ttt gtg gga gga ata gtt tcc tgg 1971  
 Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp  
 640 645 650

ggt tct att aac tgt ggg ggg tca gaa cag tat ggg gtc tac acg aaa 2019  
 Gly Ser Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys  
 655 660 665 670

gtc acg aac tat att ccc tgg att gag aac ata ata aat aat ttc taa 2067  
 Val Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe  
 675 680 685

tttgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2091

<210> 54  
 <211> 685  
 <212> PRT  
 <213> CDS de MASP-2 de 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

10

ES 2 631 127 T3

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

ES 2 631 127 T3

Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp Pro Thr  
 290 295 300

Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu  
 305 310 315 320

Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln  
 325 330 335

Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly  
 340 345 350

Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro  
 355 360 365

Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Glu  
 370 375 380

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

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

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

Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly Gly Gln  
 435 440 445

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

Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu Thr Ala  
 465 470 475 480

Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu Asp Ile  
 485 490 495

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

ES 2 631 127 T3

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

Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln  
565 570 575

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

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

Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly Gly  
610 615 620

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

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

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

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

<210> 55

<211> 670

5 <212> PRT

<213> Proteína madura MASP-2 de rata

<400> 55

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

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

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

10

ES 2 631 127 T3

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





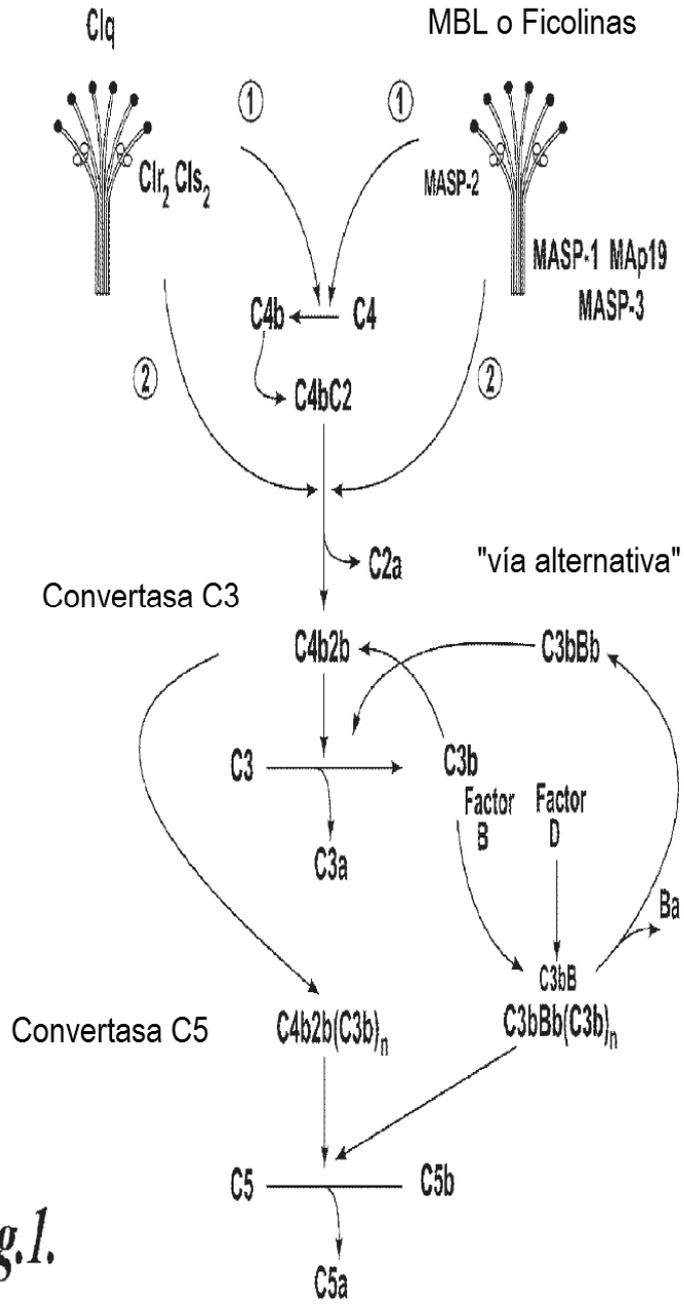
<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Cebador PCR de MASP-2 murina  
  
 <400> 60  
 atgaggctac tcatcttctt gg 22  
  
 10 <210> 61  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Cebador PCR de MASP-2 murina  
  
 <400> 61  
 ctgcagaggt gacgcagggg ggg 23  
 20  
 <210> 62  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Cebador PCR de MASP-2 murina  
  
 <400> 62  
 30 cccccctgc gtcacctctg cag 23  
  
 <210> 63  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador PCR de MASP-2 murina  
  
 <400> 63  
 40 ttagaaatta cttattatgt tctcaatcc 29  
  
 <210> 64  
 <211> 29  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de MASP-2 de rata  
 50  
 <400> 64  
 gaggtgacgc aggaggggca ttagtgttt 29  
  
 <210> 65  
 55 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 60 <223> Oligonucleótido de MASP-2 de rata  
  
 <400> 65  
 ctgaaacac taatgccct cctgcgtcac ctctgca 37  
 65

## REIVINDICACIONES

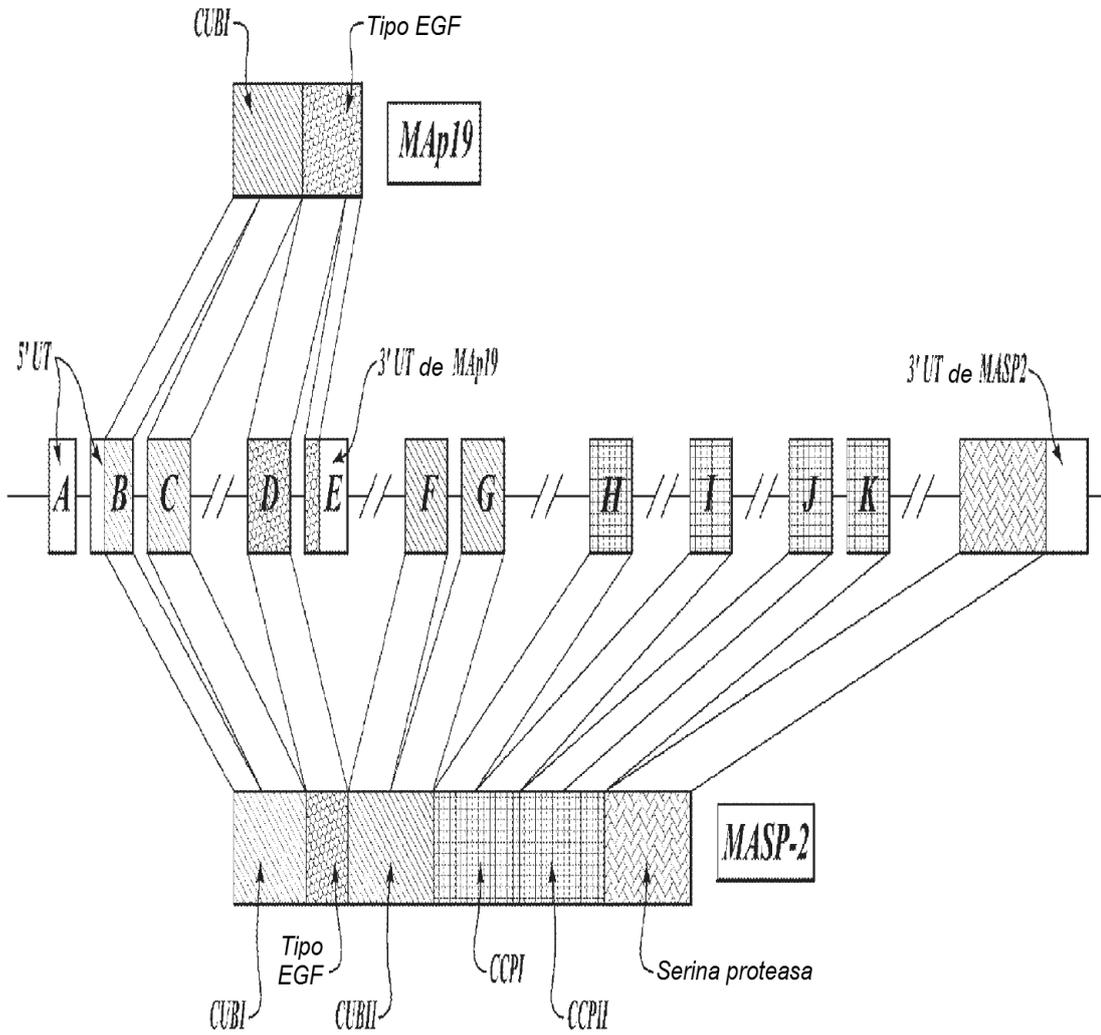
1. Un agente inhibidor de MASP-2 para usar en el tratamiento de un sujeto que padece una afección renal mediada por complemento dependiente de MASP-2 seleccionada del grupo que consiste en glomerulonefritis mesangioproliferativa, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis membranoproliferativa (glomerulonefritis mesangiocapilar), glomerulonefritis postinfecciosa aguda (glomerulonefritis postestreptocócica), glomerulonefritis crioglobulinémica, nefritis lúpica, nefritis purpura de Henoch-Schonlein y nefropatía por IgA, en donde el agente inhibidor de MASP-2 es un anticuerpo anti-MASP-2 o fragmento del mismo que se une específicamente a una porción de la SEQ ID NO: 6 y selectivamente inhibe la activación del complemento dependiente de MASP-2 sin inhibir sustancialmente la activación del complemento dependiente de C1q.
2. Un agente inhibidor de MASP-2 para usar según la reivindicación 1, en el que el agente inhibidor de MASP-2 se une específicamente a un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 6.
3. Un agente inhibidor de MASP-2 para usar según cualquier reivindicación anterior, en el que el agente inhibidor de MASP-2 se une específicamente a un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 6 con una afinidad de al menos 10 veces mayor que la afinidad con la que se une a un antígeno diferente en el sistema de complemento.
4. Un agente inhibidor de MASP-2 para usar según cualquier reivindicación precedente, en el que el agente inhibidor de MASP-2 se une al polipéptido en un lugar dentro de los residuos de aminoácidos 1-176 de la SEQ ID NO: 6.
5. Un agente inhibidor de MASP-2 para usar según cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo anti-MASP-2 o fragmento del mismo es monoclonal.
6. Un agente inhibidor de MASP-2 para usar según cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo anti-MASP-2 o fragmento del mismo es recombinante.
7. Un agente inhibidor de MASP-2 para usar según cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo anti-MASP-2 o fragmento del mismo tiene una función efectora reducida.
8. Un agente inhibidor de MASP-2 para usar según cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo anti-MASP-2 o fragmento del mismo es quimérico, humanizado o humano.
9. Un agente inhibidor de MASP-2 para usar según cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo anti-MASP-2 o fragmento del mismo se produce en un animal transgénico deficiente en MASP-2.
10. Una composición farmacéutica que comprende un agente inhibidor de MASP-2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento de una afección renal mediada por complemento dependiente de MASP-2 seleccionada del grupo que consiste en glomerulonefritis mesangioproliferativa, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis membranoproliferativa (glomerulonefritis mesangiocapilar), glomerulonefritis post-infecciosa aguda (glomerulonefritis postestreptocócica), glomerulonefritis crioglobulinémica, nefritis lúpica, nefritis purpura de Henoch-Schonlein y nefropatía por IgA, en donde el agente inhibidor de MASP-2 es un anticuerpo anti-MASP-2 o fragmento del mismo que se une específicamente a una porción de la SEQ ID NO: 6 e inhibe selectivamente la activación del complemento dependiente de MASP-2 sin inhibir sustancialmente la activación del complemento dependiente de C1q.
11. Una composición farmacéutica para usar según la reivindicación 10, en la que el agente inhibidor de MASP-2 es como se establece en cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10.
12. Una composición farmacéutica para usar según la reivindicación 10 u 11, en la que la composición se formula para administración intraarterial, intravenosa, intramuscular, subcutánea o administración como inhalante.
13. Una composición farmacéutica para usar según la reivindicación 10 u 11, en la que la composición se formula para administración subcutánea.

Vía clásica

Vía de lectinas



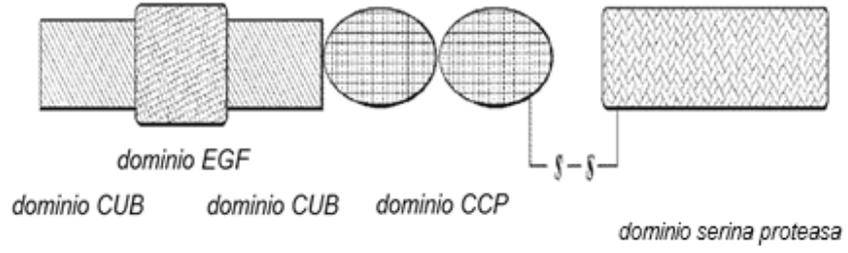
*Fig.1.*



*Fig.2.*

*Clr/Clk/MASP-1/MASP-2/MASP-3*

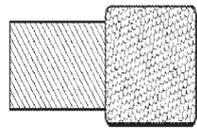
*Fig.3A.*



*Map19*

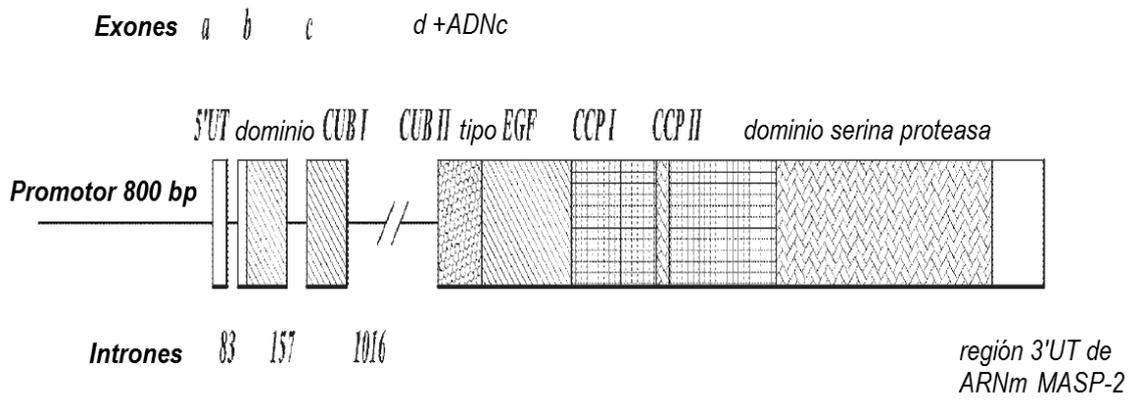
*EQSL*

*Fig.3B.*

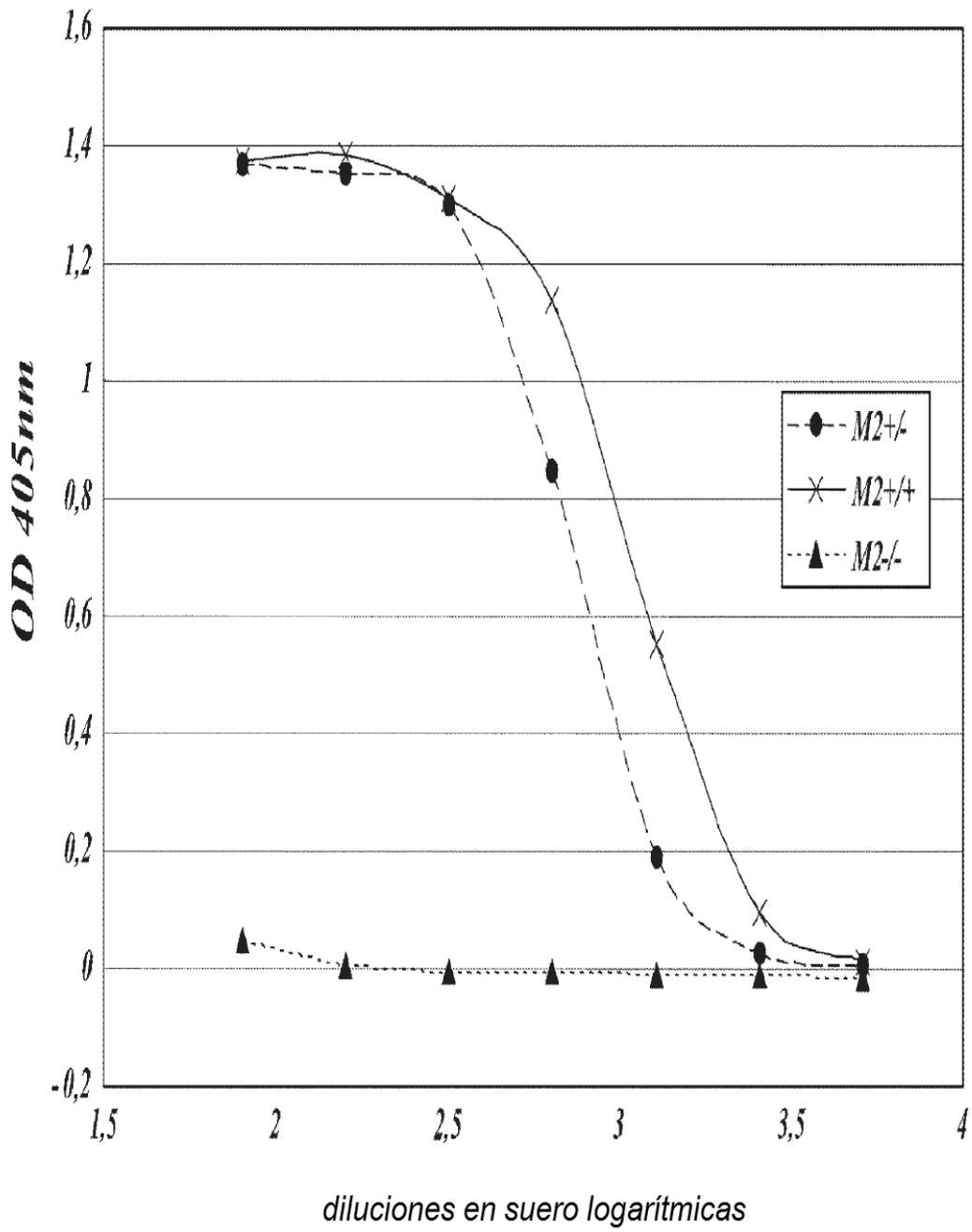


dominio CUB    dominio EGF

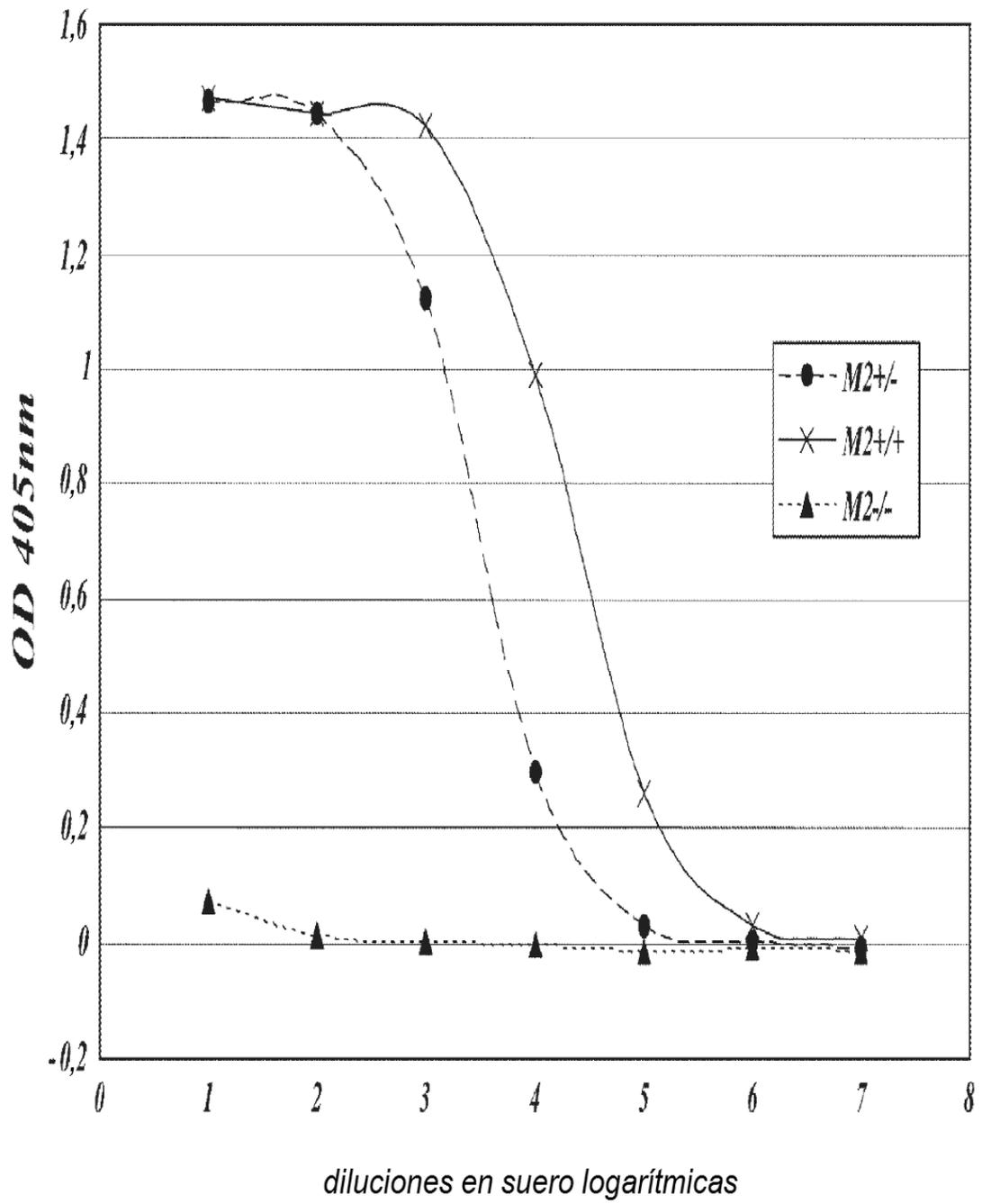




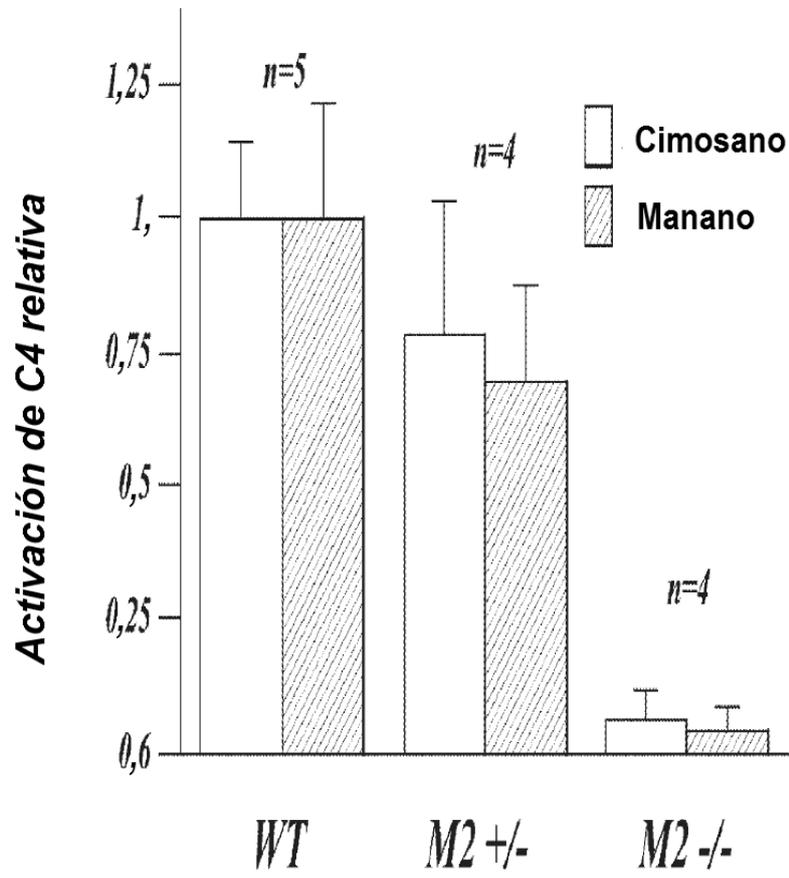
*Fig.5.*



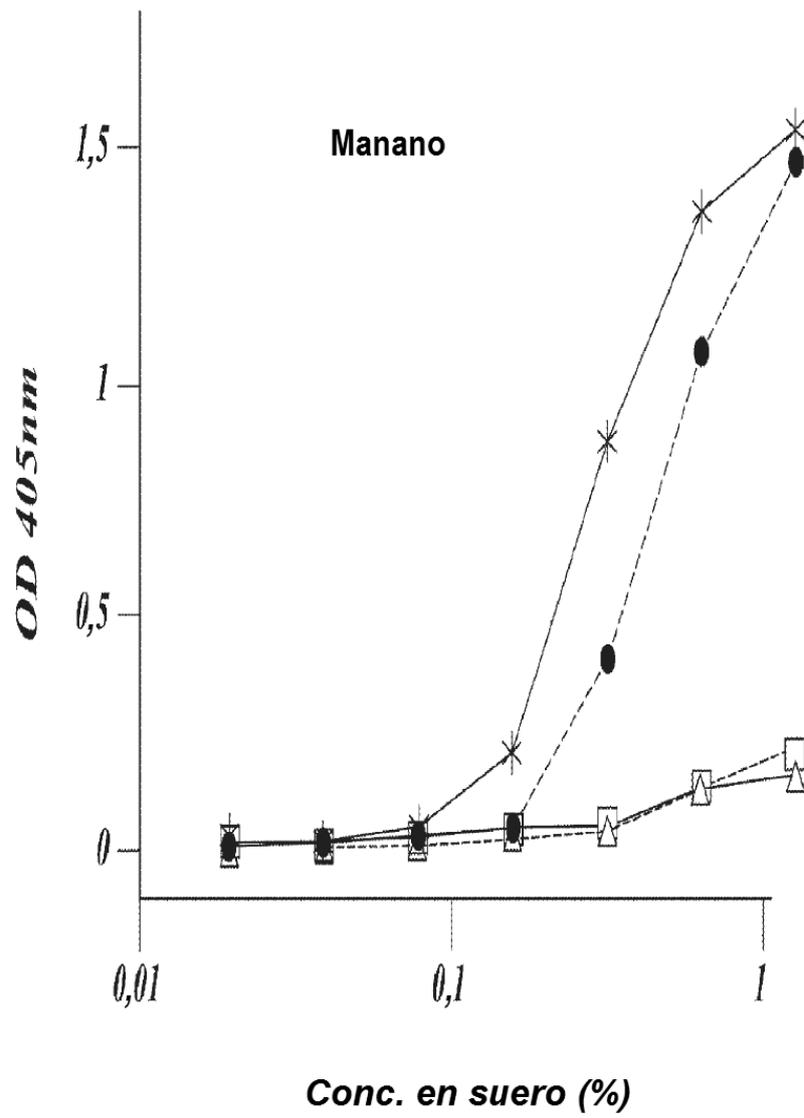
*Fig.6A.*



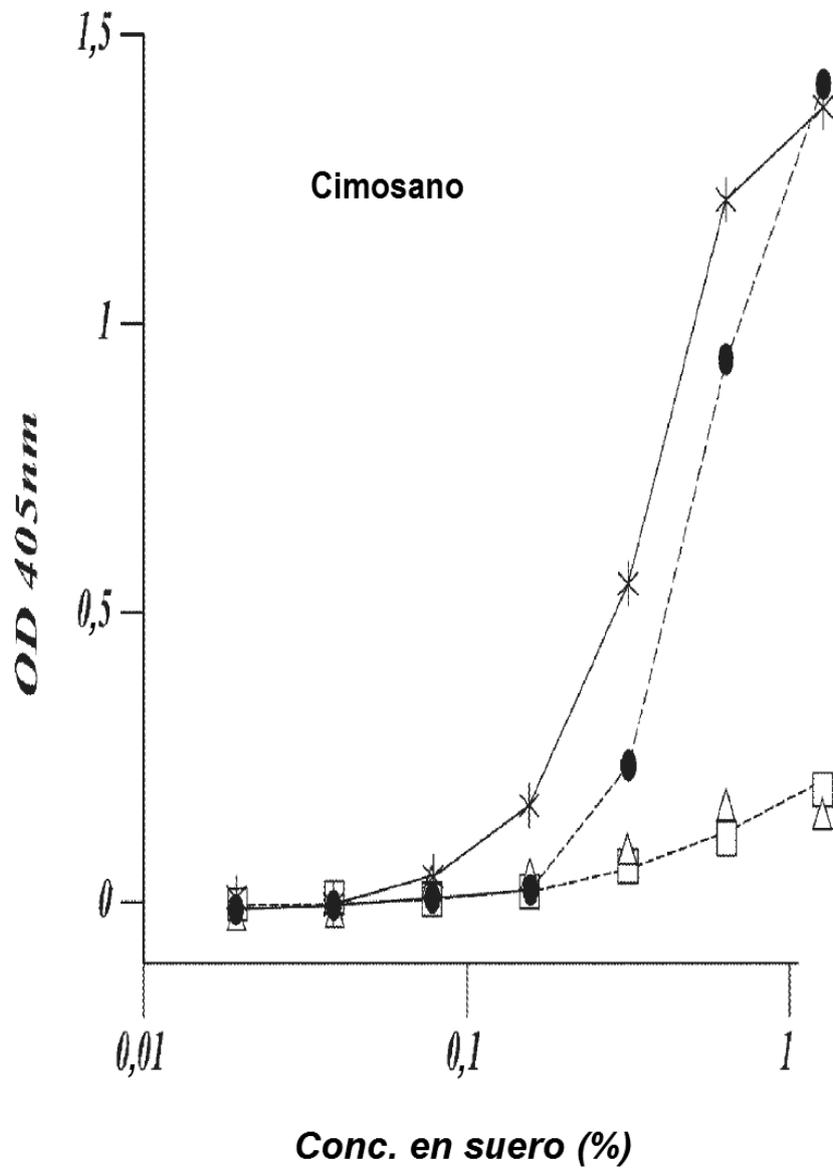
*Fig.6B.*



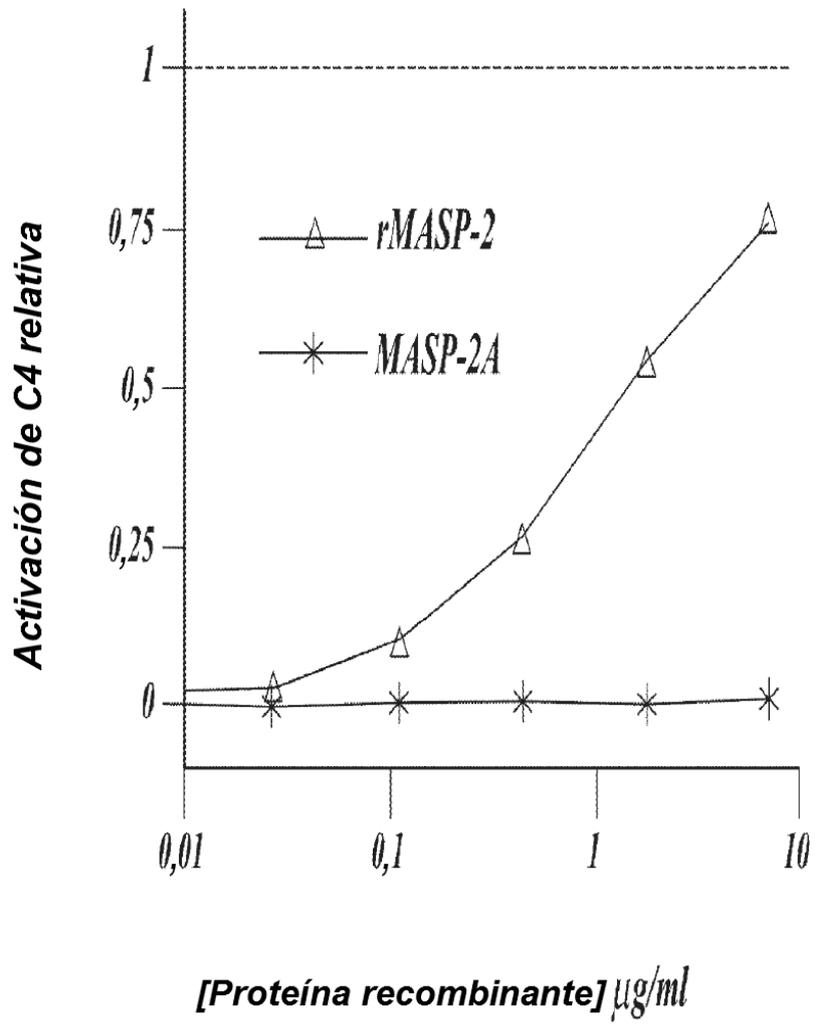
*Fig.6C.*



*Fig. 7A.*



*Fig.7B.*



*Fig.8.*

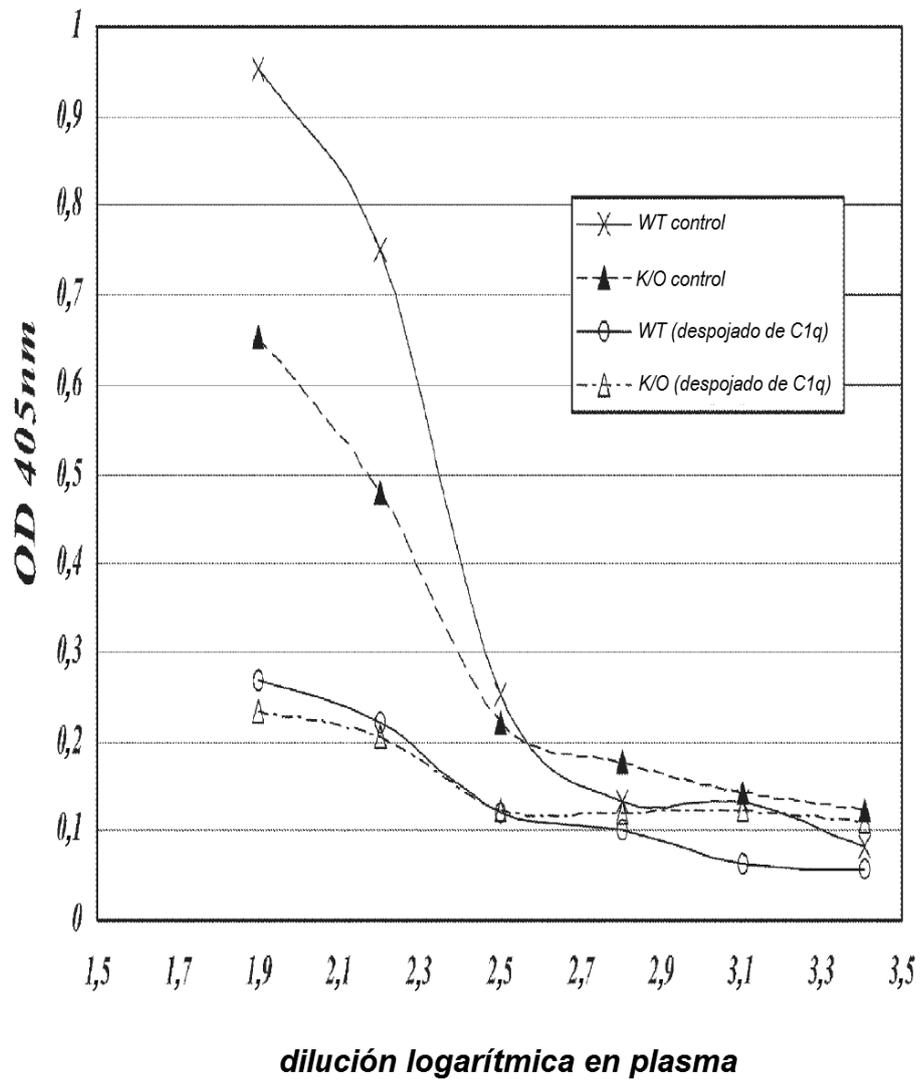
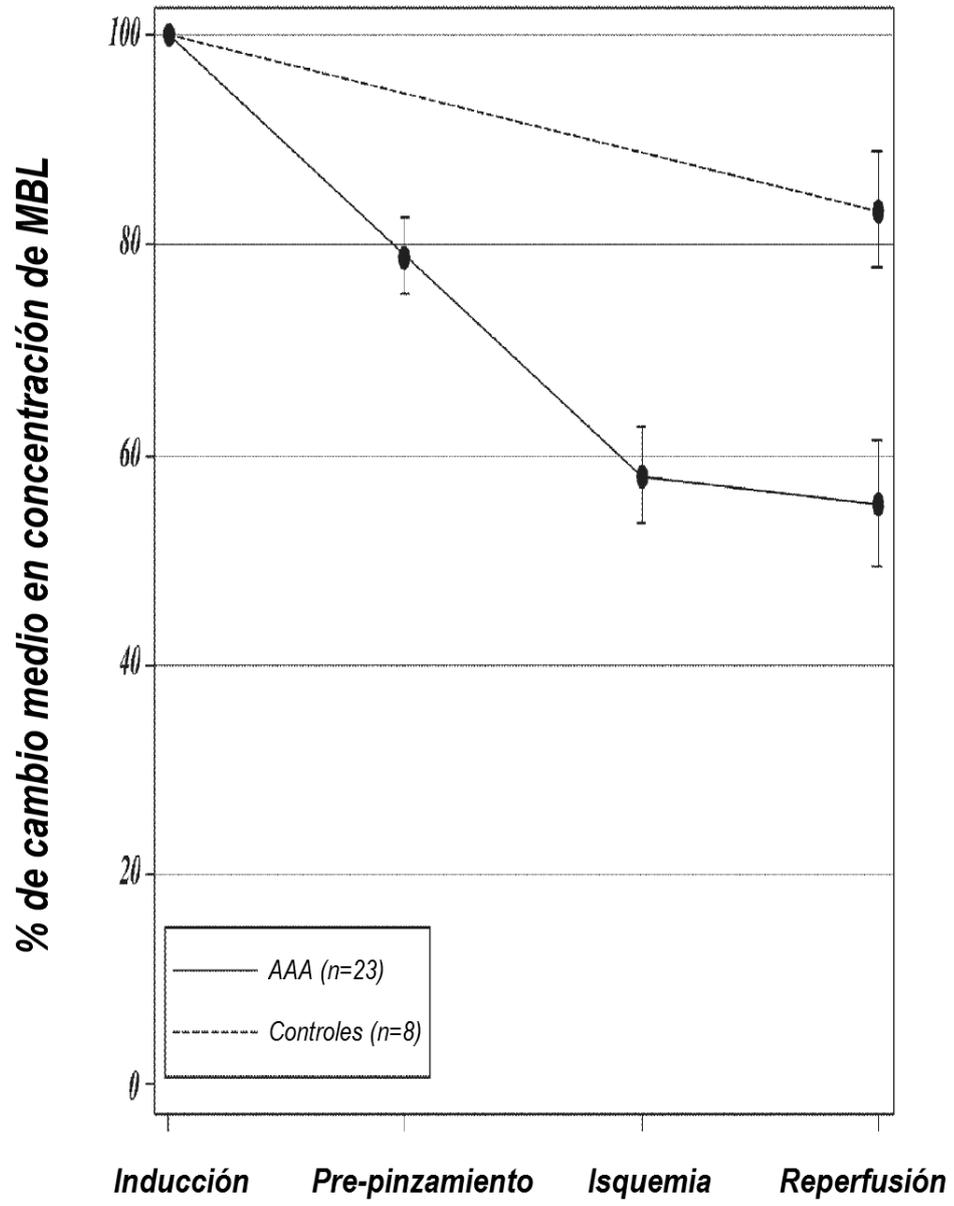


Fig.9.



*Fig.10.*