(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 683 307**

(51) Int. CI.:

A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2012 PCT/US2012/032650**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12139081**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2012 E 12767899 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2694108**

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

(30) Prioridad:

08.04.2011 US 201161473698 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.09.2018

(73) Titular/es:

UNIVERSITY OF LEICESTER (50.0%)
9 University Road
Leicester LE1 7RH, GB y
OMEROS CORPORATION (50.0%)

(72) Inventor/es:

DEMOPULOS, GREGORY A.;
DUDLER, TOM y
SCHWAEBLE, HANS-WILHELM

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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 de complemento dependiente de MASP-2

Antecedentes

El sistema de complemento proporciona un mecanismo de acción temprana para iniciar, amplificar y orquestar la respuesta inmunitaria contra infecciones microbianas y otras agresiones agudas (M.K. Liszewski y J.P. Atkinson, 1993, en *Fundamental Immunology*, Tercera edición, editado por W.E. Paul, Raven Press, Ltd., Nueva York), en seres humanos y otros vertebrados. Aunque la activación del complemento proporciona una valiosa primera línea de defensa contra potenciales patógenos, las actividades del complemento que promueven una respuesta inmunitaria protectora también pueden representar una potencial amenaza para el hospedador (K.R. Kalli, et al., *Springer Semin. Immunopathol. 15*:417-431, 1994; B.P. Morgan, *Eur.J. Clinical Investig. 24:*219-228, 1994). Por ejemplo, los productos proteolíticos C3 y C5 reclutan y activan a los neutrófilos. Aunque son indispensables para la defensa del hospedador, los neutrófilos activados actúan de manera indiscriminada liberando enzimas destructoras y pueden provocar daño orgánico. Además, la activación del complemento puede provocar la deposición de componentes líticos del complemento en las células hospedadoras adyacentes, así como sobre las dianas microbianas, provocando la lisis de la célula hospedadora.

También se ha relacionado el sistema de complemento con la patogénesis de numerosas patologías agudas y crónicas, incluyendo: infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, SDRA, lesión por reperfusión, choque séptico, filtración capilar secundaria a quemaduras por calor, inflamación secundaria a derivación cardiopulmonar, rechazo de trasplantes, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia graves y enfermedad de Alzheimer. En prácticamente todas estas afecciones, el complemento no es la causa, sino que es uno de los diversos factores implicados en su patogénesis. Sin embargo, la activación del complemento puede ser un mecanismo patológico importante y representa un punto eficaz para el control clínico de muchas de estas patologías. La cada vez más reconocida importancia de la lesión tisular mediada por complemento en una serie de patologías subraya la necesidad de fármacos inhibidores de complemento eficaces. Hasta la fecha, Eculizumab (Solaris®), un anticuerpo contra C5, es el único fármaco que actúa de manera selectiva sobre el complemento que ha sido aprobado para su uso en seres humanos. Sin embargo, C5 es una de las diversas moléculas efectoras situadas "aguas abajo" en el sistema de complemento y el bloqueo de C5 no inhibe la activación del sistema de complemento. Por lo tanto, un inhibidor de las etapas iniciales de la activación del complemento podría presentar ventajas significativas frente a un inhibidor del complemento "aguas abajo".

En la actualidad, se acepta ampliamente que el sistema de complemento puede activarse por tres vías distintas: la vía clásica, la vía de lectina y la vía alternativa. La vía clásica se activa normalmente por medio de un complejo formado por anticuerpos del hospedador unidos a una partícula extraña (es decir, un antígeno) y por lo tanto, requiere de la exposición previa a un antígeno para la generación de una respuesta de anticuerpos específica. Ya que la activación de la vía clásica depende de una respuesta inmunitaria adaptativa previa por parte del hospedador, la vía clásica forma parte del sistema inmunitario adquirido. En cambio, las vías tanto de lectina como alternativa son independientes de la inmunidad adaptativa y forman parte del sistema inmunitario innato.

La activación del complemento da como resultado la activación de cimógenos de serina proteasa. La primera etapa en la activación de la vía clásica es la unión de una molécula de reconocimiento específica, C1q, a moléculas IgG e IgM unidas al antígeno. C1q se asocia con las proenzimas de serina proteasa C1r y C1s en un complejo denominado C1. Tras la unión de C1q a un inmunocomplejo, la escisión autoproteolítica del sitio de Arg-Ile de C1r va seguida de la escisión mediada por C1r y la activación de C1s, que de este modo adquiere la capacidad de escindir a C4 y C2. C4 se escinde en dos fragmentos, denominados C4a y C4b y, de manera similar, C2 se escinde en C2a y C2b. Los fragmentos C4b son capaces de formar enlaces covalentes con los grupos hidroxilo o amino adyacentes y generan la convertasa C3 (C4b2a) mediante interacción no covalente con el fragmento C2a de C2 activado. La convertasa C3 (C4b2a) activa a C3 mediante escisión proteolítica en los subcomponentes C3a y C3b, que dan lugar a la generación de la convertasa C5 (C4b2a3b) que, al escindir a C5, ocasiona la formación del complejo de ataque a membrana (C5b combinado con C6, C7, C8 y C-9, también citado como "MAC") que puede alterar las membranas celulares, ocasionando la lisis celular. Las formas activadas de C3 y C4 (C3b y C4b) se depositan covalentemente en las superficies diana extrañas, que son reconocidas por receptores de complemento en múltiples fagocitos.

De manera independiente, la primera etapa en la activación del sistema de complemento mediante la vía de lectina es también la unión de moléculas de reconocimiento específicas, que va seguida de la activación de proenzimas de serina proteasa asociadas. Sin embargo, en lugar de la unión de inmunocomplejos mediante C1q, las moléculas de reconocimiento en la vía de lectina comprenden un grupo de proteínas de unión a carbohidratos (lectina de unión a manano (MBL), H-ficolina, M-ficolina, L-ficolina y lectina de tipo C CL-11), citadas colectivamente como lectinas. Véase 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)). Véase también J. Luet 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); Hansen et al, *J. Immunol* 185(10):6096-6104 (2010).

Ikeda et al. demostraron por primera vez que, al igual que C1q, MBL puede activar el sistema de complemento tras su unión a eritrocitos recubiertos de manano de levadura de una manera dependiente de C4 (Ikeda et al., *J. Biol. Chem. 262*:7451-7454, (1987)). MBL, un miembro de la familia de proteínas de colectina, es una lectina dependiente de calcio que se une a carbohidratos con grupos 3 y 4-hidroxi orientados en el plano ecuatorial en el anillo de piranosa. Por lo tanto, la D-manosa y la N-acetil-D-glucosamina son ligandos prominentes para MBL, mientras que los carbohidratos que no cumplen este requisito estérico tienen una afinidad indetectable por MBL (Weis et al., *Nature* 360:127-134, (1992)). La interacción entre MBL y azúcares monovalentes es extremadamente débil, con constantes de disociación normalmente en el intervalo milimolar de un solo dígito. MBL logra una unión estrecha y específica a ligandos de glucano mediante avidez, es decir, interactuando simultáneamente con múltiples restos de monosacárido ubicados muy próximos entre sí (Lee et al., *Archiv. Biochem. Biophys.* 299:129-136, (1992)). MBL reconoce los patrones de carbohidrato que normalmente decoran a los microorganismos, tales como bacterias, levaduras, parásitos y ciertos virus. En cambio, MBL no reconoce la D-galactosa y el ácido siálico, los azúcares penúltimo y último que normalmente decoran los glucoconjugados complejos "maduros" presentes en el plasma de mamíferos y las glucoproteínas de la superficie celular. Se cree que esta especificidad de unión promueve el reconocimiento de superficies "exógenas" y ayuda a proteger frente a la "auto-activación". Sin embargo, MBL se une con alta afinidad a cúmulos de glucanos "precursores" ricos en manosa en las glucoproteínas unidas en N y glucolípidos secuestrados en el retículo endoplasmático y el Golgi de células de mamífero (Maynard et al., *J. Biol. Chem. 257*:3788-3794, (1982)). Por lo tanto, las células dañadas son dianas potenciales para la activación de la vía de lectina mediante unión a MBL.

Las ficolinas poseen un dominio de lectina de un tipo diferente al de MBL, denominado el dominio similar a fibrinógeno. Las ficolinas se unen a los restos de azúcar de una manera independiente de Ca^{++}. En seres humanos, se han identificado tres tipos de ficolinas (L-ficolina, M-ficolina y H-ficolina). Las dos ficolinas séricas, L-ficolina y H-ficolina, tienen en común su especificidad por la N-acetil-D-glucosamina; sin embargo, la H-ficolina también se une a N-acetil-D-galactosamina. La diferencia en la especificidad por el azúcar de la L-ficolina, H-ficolina, CL-11 y MBL significa que las diferentes lectinas pueden ser complementarias y actuar de manera selectiva sobre glucoconjugados diferentes, aunque solapantes. Este concepto se ve respaldado por el reciente hallazgo de que, de las lectinas conocidas en la vía de lectina, solo la L-ficolina se une específicamente al ácido lipoteicoico, un glucoconjugado de la pared celular hallado en todas las bacterias grampositivas (Lynch et al., *J. Immunol. 172*:1198-1202, (2004)). Las colectinas (es decir, MBL) y las ficolinas no comparten similitud en su secuencia de aminoácidos. Sin embargo, los dos grupos de proteínas tienen organizaciones de dominio similares y, al igual que C1q, se ensamblan en estructuras oligoméricas, lo que maximiza las posibilidades de unirse por múltiples sitios.

Las concentraciones séricas de MBL son altamente variables en las poblaciones sanas y estas se controlan genéticamente por polimorfismos/mutaciones en las regiones tanto promotoras como codificantes del gen MBL. Como proteína de la fase aguda, la expresión de MBL se regula aún más positivamente durante la inflamación. La L-ficolina está presente en suero a concentraciones similares a las de MBL. Por lo tanto, la rama de L-ficolina de la vía de lectina tiene una fuerza potencialmente comparable a la de la rama de MBL. MBL y las ficolinas también pueden actuar como opsoninas, que permiten a los fagocitos dirigirse de manera específica a superficies decoradas con MBL y ficolina (véase Jack et al., *J Leukoc Biol.,* 77(3):328-36 (2004), Matsushita y Fujita, *Immunobiology,* 205(4-5):490-7 (2002), Aoyagi et al., *J Immunol,* 174(1):418-25(2005). Esta opsonización requiere la interacción de estas proteínas con receptores de fagocitos (Kuhlman et al., *J. Exp. Med. 169*:1733, (1989); Matsushita et al., *J. Biol. Chem. 271*:2448-54, (1996)), cuya identidad aún no se ha determinado.

MBL humano forma una interacción específica y de alta afinidad a través de su dominio similar a colágeno, con serina proteasas únicas similares a C1r/C1s, denominadas serina proteasas asociadas con MBL (MASP). Hasta la fecha, se han descrito tres MASP. En primer lugar, se identificó una enzima "MASP" individual y se caracterizó como la enzima responsable del inicio de la cascada de complemento (es decir, escinde a C2 y C4) (Matsushita et al., *J Exp Med* 176(6):1497-1502 (1992); Ji et al., *J. Immunol. 150*:571-578, (1993)). Posteriormente, se determinó que la actividad de MASP era, de hecho, una mezcla de dos proteasas: MASP-1 y MASP-2 (Thiel et al., *Nature 386*:506-510, (1997)). Sin embargo, se demostró que el complejo MBL-MASP-2 por sí mismo es suficiente para la activación del complemento (Vorup-Jensen et al., *J. Immunol. 165*:2093-2100, (2000)). Además, solo MASP-2 escinde a C2 y C4 en grandes cantidades (Ambrus et al., *J. Immunol. 170*:1374-1382, (2003)). Por lo tanto, MASP-2 es la proteasa responsable de la activación de C4 y C2 para generar la convertasas de C3, C4b2a. Esta es una diferencia significativa respecto del complejo C1 de la vía clásica, donde la acción coordinada de dos serina proteasas específicas (C1r y C1s) da lugar a la activación del sistema de complemento. Además, se ha aislado una tercera nueva proteasa, MASP-3 (Dahl, M.R., et al., *Immunity 15*:127-35, 2001). MASP-1 y MASP-3 son productos de corte y empalme alternativo del mismo gen.

Las MASP comparten organizaciones de dominio idénticas a las de C1r y C1s, los componentes enzimáticos del complejo de C1 (Sim et al., *Biochem. Soc. Trans. 28*:545, (2000)). Estos dominios incluyen un dominio N-terminal de C1r/C1s/VEGF de erizo de mar/proteína morfogénica ósea (CUB), un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico, un segundo dominio CUB, un tándem de dominios de proteína de control de complemento y un dominio de serina proteasa. Como en las proteasas C1, la activación de MASP-2 se produce mediante la escisión de un enlace de Arg-Ile adyacente al dominio de serina proteasa, que separa la enzima en las cadenas A y B unidas por disulfuro, constando esta última del dominio de serina proteasa.

MBL también puede asociarse con una forma de corte y empalme alternativo de MASP-2, conocida como proteína asociada a MBL de 19 kDa (MAp19) o proteína asociada a MBL pequeña (sMAP), que carece de la actividad catalítica de MASP2. (Stover, *J. Immunol. 162*:3481-90, (1999); Takahashi et al., *Int. Immunol. 11*:859-863, (1999)). MAp19 comprende los dos primeros dominios de MASP-2, seguidos de una secuencia adicional de cuatro aminoácidos únicos. La función de Map19 no está clara (Degn et al., *J Immunol. Methods,* 2011). Los genes MASP-1 y MASP-2 están ubicados en los cromosomas 3 y 1 humanos, respectivamente (Schwaeble et al., *Immunobiology 205*:455-466, (2002)).

Varias series de indicios sugieren que hay diferentes complejos MBL-MASP y una gran parte de las MASP en suero no están formando complejos con MBL (Thiel, et al., *J. Immunol. 165*:878-887, (2000)). Tanto H como L-ficolina se unen a todas las MASP y activan la vía de complemento de la lectina, del mismo modo que MBL (Dahl et al., *Immunity 15*:127-35, (2001); Matsushita et al., *J. Immunol. 168*:3502-3506, (2002)). Las vías tanto de lectina como clásica forman una convertasa C3 común (C4b2a) y las dos vías convergen en esta etapa.

Se cree ampliamente que la vía de lectina tiene un papel principal en la defensa del hospedador contra infecciones en hospedadores sin exposición previa al patógeno. Los indicios más claros de la implicación de MBL en la defensa del hospedador proceden del análisis de pacientes con niveles séricos reducidos de MBL funcional (Kilpatrick, *Biochim. Biophys. Acta 1572*:401-413, (2002)). Dichos pacientes muestran susceptibilidad a infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes. Normalmente, estos síntomas son evidentes en las etapas iniciales de la vida, durante una ventana de vulnerabilidad aparente a medida que se desvanecen los títulos de anticuerpos procedentes de la madre, pero antes de que se desarrolle un repertorio completo de respuestas de anticuerpos. Este síndrome suele ser el resultado de mutaciones en varios sitios en la porción colagenosa de MBL, que interfieren con la formación adecuada de oligómeros de MBL. Sin embargo, como MBL puede funcionar como opsonina independiente de complemento, no se sabe hasta qué punto el aumento de la susceptibilidad a infecciones se debe a una activación del complemento defectuosa.

A diferencia de las vías clásica y de lectina, no se han hallado iniciadores de la vía alternativa que cumplan las funciones de reconocimiento que llevan a cabo C1q y las lectinas en las otras dos vías. En la actualidad, hay un consenso mayoritario acerca de que la vía alternativa sufre de manera espontánea un bajo nivel de activación de recambio, que puede amplificarse fácilmente sobre superficies extrañas u otras superficies anormales (bacterias, levaduras, células infectadas por virus o tejido dañado) que carecen de los elementos moleculares adecuados que mantienen controlada la activación de complemento espontánea. Hay cuatro proteínas plasmáticas implicadas directamente en la activación de la vía alternativa: C3, los factores B y D y properdina.

Aunque hay gran cantidad de indicios que vinculan a las vías de complemento clásica y alternativa con la patogénesis de enfermedades humanas no infecciosas, es ahora cuando se está empezando a evaluar el papel de la vía de lectina. Estudios recientes han aportado indicios de que la activación de la vía de lectina puede ser responsable de la activación de complemento y la inflamación asociada en la lesión por isquemia/reperfusión. Collard et al. (2000) comunicaron que las células endoteliales sometidas a estrés oxidativo se unen a MBL y muestran deposición de C3 tras su exposición a suero humano (Collard et al., *Am. J. Pathol. 156*:1549-1556, (2000)). Además, el tratamiento de sueros humanos con anticuerpos monoclonales de bloqueo anti-MBL inhibió la unión a MBL y la activación de complemento. Estos hallazgos se extendieron a un modelo de rata de isquemia-reperfusión de miocardio en el que ratas tratadas con un anticuerpo de bloqueo dirigido contra MBL de rata mostraron un daño del miocardio significativamente menor tras la oclusión de una arteria coronara que en ratas tratadas con un anticuerpo de control (Jordan et al., *Circulation 104*:1413-1418, (2001)). Aún no está claro el mecanismo molecular de la unión de MBL al endotelio vascular tras un estrés oxidativo; un estudio reciente sugiere que la activación de la vía de lectina tras un estrés oxidativo puede estar mediada por la unión de MBL a citoqueratinas endoteliales vasculares y no a glucoconjugados (Collard et al., *Am. J. Pathol. 159*:1045-1054, (2001)). Otros estudios han relacionado las vías clásica y alternativa con la patogénesis de la lesión por isquemia/reperfusión y existe controversia acerca del papel de la vía de lectina en esta enfermedad (Riedermann, N.C., et al., *Am. J. Pathol. 162*:363-367, 2003).

Un estudio reciente ha demostrado que MASP-1 (y posiblemente también MASP-3) es necesaria para convertir la enzima de activación de la vía alternativa, el factor D, en su forma enzimáticamente activa a partir de su forma de cimógeno (véase Takahashi M. et al., *J Exp Med* 207(1):29-37 (2010)). La importancia fisiológica de este proceso se ve confirmada por la ausencia de actividad funcional de la vía alternativa en el plasma de ratones con deficiencia de MASP-1/3. Es necesaria la generación proteolítica de C3b a partir de C3 nativo para el funcionamiento de la vía alternativa. Debido a que la convertasa de C3 de la vía alternativa (C3bBb) contiene C3b como subunidad esencial, la cuestión referente al origen de la primera C3b a través de la vía alternativa ha presentado un problema sorprendente y ha alentado una cantidad considerable de investigaciones.

C3 pertenece a una familia de proteínas (junto con C4 y α-2 macroglobulina) que contienen una modificación postraduccional rara conocida como enlace tioéster. El grupo tioéster está formado por una glutamina cuyo grupo carbonilo terminal forma un enlace covalente tioéster con el grupo sulfhidrilo de una cisteína a tres aminoácidos de distancia. Este enlace es inestable y el glutamil-tioéster electrófilo puede reaccionar con restos nucleófilos, tales como grupos hidroxilo o amino y de este modo forma un enlace covalente con otras moléculas. El enlace tioéster es razonablemente estable cuando queda secuestrado dentro de un bolsillo hidrófobo de C3 intacto. Sin embargo, la

escisión proteolítica de C3 en C3a y C3b da como resultado la exposición del enlace tioéster altamente reactivo sobre C3b y, después del ataque nucleófilo por restos adyacentes que comprenden grupos hidroxilo o amino, C3b queda unido covalentemente a una diana. Además de su papel bien estudiado en la unión covalente de C3b a dianas de complemento, se cree que el tioéster de C3 también tiene un papel central en la activación de la vía alternativa. Según la "teoría *tick-over* (activación al ralentí)" ampliamente aceptada, la vía alternativa se inicia por la generación de una convertasa de fase fluida, iC3Bb, que se forma a partir de C3 con el tioéster hidrolizado (iC3; $C3(H_2O)$) y factor B (Lachmann, P.J., et al., *Springer Semin. Immunopathol. 7*:143-162, (1984)). La $C3(H_2O)$ similar a C3b se genera a partir de C3 nativo mediante una hidrólisis lenta espontánea del tioéster interno en la proteína (Pangbum, M.K., et al., *J. Exp. Med. 154*:856-867, 1981). Por medio de la actividad de la convertasa $C3(H_2O)Bb$, las moléculas de C3b se depositan sobre la superficie diana, iniciando de este modo la vía alternativa.

Se sabe bastante poco acerca de los iniciadores de la activación de la vía alternativa. Se cree que los activadores incluyen paredes celulares de levadura (cimosano), muchos polisacáridos puros, eritrocitos de conejo, ciertas inmunoglobulinas, virus, hongos, bacterias, células tumorales animales, parásitos y células dañadas. La única característica común a estos activadores es la presencia de carbohidratos, pero la complejidad y variedad de estructuras de carbohidratos ha dificultado la determinación de los determinantes moleculares compartidos que se reconocen. Se ha aceptado ampliamente que la activación de la vía alternativa está controlada por un delicado equilibrio entre los componentes reguladores inhibidores de esta vía, tales como factor H, factor I, DAF y CR1 y properdina, que es el único regulador positivo de la vía alternativa (véase Schwaeble W.J. y Reid K.B., *Immunol Today* 20(1):17-21 (1999)).

Además del mecanismo de activación aparentemente desregulado descrito anteriormente, la vía alternativa también pueden proporcionar un potente bucle de amplificación para la convertasas C3 (C4b2a) de la vía de lectina/clásica, ya que cualquier C3b generado puede participar con el factor B formando convertasas C3 (C3bBb) de la vía alternativa. La convertasa C3 de la vía alternativa se estabiliza por la unión de properdina. La properdina alaga la semivida de la convertasa C3 de la vía alternativa de seis a diez veces. La adición de C3b a la convertasa C3 de la vía alternativa da lugar a la formación de la convertasa C5 de la vía alternativa.

Se cree que las tres vías (es decir, la clásica, la de lectina y la alternativa) convergen en C5, que se escinde formando productos con múltiples efectos proinflamatorios. La vía convergida se ha citado como la vía de complemento terminal. C5a es la anafilotoxina más potente, que induce alteraciones en los músculos lisos y el tono vascular, así como en la permeabilidad vascular. También es una quimiotaxina potente y un activador tanto de neutrófilos como de monocitos. La activación celular mediada por C5a puede amplificar de manera significativa las respuestas inflamatorias, induciendo la liberación de múltiples mediadores inflamatorios adicionales, incluyendo citocinas, enzimas hidrolíticas, metabolitos del ácido araquidónico y especies de oxígeno reactivo. La escisión de C5 da lugar a la formación de C5b-9, también conocido como complejo de ataque a membranas (MAC). En la actualidad hay sólidos indicios de que la deposición de MAC sublítica puede desempeñar un papel importante en la inflamación, además de su papel como complejo lítico formador de poros.

Además de su papel esencial en la defensa inmunitaria, el sistema de complemento contribuye al daño tisular en muchas afecciones clínicas. Por lo tanto, hay una necesidad acuciante de desarrollar inhibidores de complemento terapéuticamente eficaces para prevenir estos efectos adversos.

Compendio

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal contra MASP-2 o un fragmento del mismo que inhibe la activación de la vía de complemento de la lectina dependiente de MASP-2 para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica adecuada para inhibir la activación de la vía de complemento de la lectina dependiente de MASP-2 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15. La presente divulgación proporciona composiciones para inhibir los efectos adversos de la activación de 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 proporcionan métodos para fabricar un medicamento para su uso en la inhibición de los efectos adversos de la activación de complemento dependiente de MASP-2 en sujetos vivos que lo necesiten, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico. También se proporcionan métodos para fabricar medicamentos para su uso en la inhibición de la activación de complemento dependiente de MASP-2 para el tratamiento de cada una de las afecciones, enfermedades y trastornos descritos más adelante en la presente memoria.

Los métodos, composiciones y medicamentos de la divulgación son útiles para inhibir los efectos adversos de la activación de complemento dependiente de MASP-2 *in vivo* en sujetos mamíferos, incluyendo seres humanos que padecen una patología o lesión aguda o crónica, tal como se describe con más detalle en la presente memoria.

Se proporcionan métodos para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece hemoglobinuria paroxística nocturna, que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación de complemento dependiente de

MASP-2.

En otro aspecto, se divulga un método para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece o que está en riesgo de desarrollar síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa) no dependiente de factor H, usando una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2.

Además, se divulga la reducción de la probabilidad de que un sujeto en riesgo de desarrollar síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa) padezca síntomas clínicos asociados con el SHUa que comprende: (a) determinar la presencia de un marcador genético en el sujeto que se sabe está asociado con el SHUa; (b) efectuar un seguimiento periódico del paciente para determinar la presencia o ausencia de al menos un síntoma seleccionado entre el grupo que consiste en anemia, trombocitopenia, insuficiencia renal y aumento de la creatinina; y (c) administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2 tras determinar la presencia de al menos uno de anemia, trombocitopenia, insuficiencia renal o aumento de la creatinina, en donde la composición se administra en una cantidad eficaz y durante un periodo de tiempo suficiente para mejorar dichos uno o más síntomas.

También se divulga la inhibición de la activación de complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece o se encuentra en riesgo de desarrollar síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa) secundario a una infección, mediante la administración al sujeto de una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2.

Se divulga un método para tratar a un sujeto que padece síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa) que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2, en donde la administración del agente inhibidor de MASP-2 se efectúa a través de un catéter intravenoso u otro método de suministro por catéter.

También se divulga la reducción de la probabilidad de desarrollar un deterioro de la función renal en un sujeto en riesgo de desarrollar síndrome hemolítico urémico (SHU) mediante la administración al sujeto de una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2.

Además, se divulga el tratamiento de un sujeto que padece síndrome hemolítico urémico (SHU) administrando al sujeto una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2, en donde la administración del agente inhibidor de MASP-2 se efectúa en el sujeto a través de un catéter intravenoso u otro método de suministro por catéter.

En otro aspecto, se divulga en tratamiento de un sujeto que padece púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) o que muestra síntomas coherentes con un diagnóstico de PTT, administrando al sujeto una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2, en donde la administración del agente inhibidor de MASP-2 se efectúa en el sujeto a través de un catéter intravenoso u otro método de suministro por catéter.

En otro aspecto, se divulga el tratamiento de un sujeto que padece púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) refractaria administrando al sujeto una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2.

Se divulgan métodos para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece crioglobulinemia, que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2.

En otro aspecto, se divulgan métodos para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece enfermedad de las crioaglutininas, que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2.

Además, se divulgan métodos para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece glaucoma, usando una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2.

Se proporcionan métodos para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto en riesgo de desarrollar o padecer síndrome agudo por radiación usando una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2. En algunos casos, el agente inhibidor anti-MASP-2 es un anticuerpo anti-MASP-2. En algunos casos, el agente inhibidor de MASP-2 se administra de manera profiláctica al sujeto antes de una exposición a radiación (tal como antes del tratamiento con radiación o antes de una exposición prevista a radiación). En algunos casos, el agente inhibidor de MASP-2 se administra de 24 a 48 horas después de la exposición a la radiación. En algunos casos, el agente inhibidor de MASP-2 se administra antes de y/o después de la exposición a la radiación en una cantidad suficiente

para mejorar uno o más síntomas asociados con el síndrome agudo por radiación.

Descripción de los dibujos

Los aspectos anteriores y muchas de las ventajas que los acompañan de la presente divulgación se apreciarán más fácilmente a la ver que se entenderán mejor por referencia a la siguiente descripción detallada, cuando se toma en conjunto con los dibujos adjuntos, en donde:

La FIGURA 1 es un diagrama que ilustra la estructura genómica de MASP-2 humana;

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

La FIGURA 2B es un diagrama esquemático que ilustra la estructura de dominios de la proteína MAp19 humana;

La FIGURA 3 es un diagrama que ilustra la estrategia de supresión génica de MASP-2 murino;

La FIGURA 4 es un diagrama que ilustra la construcción del minigen de MASP-2 humana;

La FIGURA 5A presenta resultados que demuestran que la deficiencia de MASP-2 da lugar a la pérdida de activación de C4 mediada por la vía de lectina, medida por la ausencia de deposición de C4b sobre manano, como se describe en el ejemplo 2;

La FIGURA 5B presenta resultados que demuestran que la deficiencia de MASP-2 da lugar a la pérdida de activación de C4 mediada por la vía de lectina, medida por la ausencia de deposición de C4b sobre cimosano, como se describe en el ejemplo 2;

La FIGURA 5C presenta resultados que demuestran los niveles relativos de activación de C4 de muestras de suero obtenidas de cepas MASP-2+/-; MASP-2-/- y de tipo silvestre medidos mediante deposición de C4b sobre manano y sobre cimosano, como se describe en el ejemplo 2;

La FIGURA 6 presenta resultados que demuestran que la adición de MASP-2 recombinante murino a muestras de suero MASP-2-/- recupera la activación de C4 mediada por la vía de lectina de una manera dependiente de la concentración de proteína, medida por la deposición de C4b sobre manano, como se describe en el ejemplo 2;

La FIGURA 7 presenta resultados que demuestran que la vía clásica es funcional en la cepa MASP-2-/-, como se describe en el ejemplo 8;

La FIGURA 8A presenta resultados que demuestran que el anticuerpo Fab2 anti-MASP-2 n.º 11 inhibe la formación de C3 convertasa, como se describe en el ejemplo 10;

La FIGURA 8B presenta resultados que demuestran que el anticuerpo Fab2 anti-MASP-2 n.º 11 se une a MASP-2 de rata nativo, como se describe en el ejemplo 10;

La FIGURA 8C presenta resultados que demuestran que el anticuerpo Fab2 anti-MASP-2 n.º 41 inhibe la escisión de C4, como se describe en el ejemplo 10;

La FIGURA 9 presenta resultados que demuestran que todos los anticuerpos Fab2 anti-MASP-2 probados que inhibían la formación de C3 convertasa también inhiben la escisión de C4, como se describe en el ejemplo 10;

La FIGURA 10 es un diagrama que ilustra los polipéptidos recombinantes procedentes de MASP-2 de rata que se usaron para el mapeo de epítopos de los anticuerpos Fab2 bloqueantes anti-MASP-2, como se describe en el ejemplo 11;

La FIGURA 11 presenta resultados que demuestran la unión de los Fab2 anti-MASP-2 n.º 40 y n.º 60 a polipéptidos de MASP-2 de rata, como se describe en el ejemplo 11;

La FIGURA 12 presenta resultados que demuestran la eliminación de nitrógeno de urea en sangre para ratones de tipo silvestre (+/+) y MASP-2 (-/-) a las 24 y 48 horas después de la reperfusión en un modelo de lesión renal por isquemia/reperfusión, como se describe en el ejemplo 12;

La FIGURA 13A presenta resultados que muestran los niveles basales de proteína VEGF en complejo EPR-coroides aislado de ratones de tipo silvestre (+/+) y MASP-2 (-/-), como se describe en el ejemplo 13;

La FIGURA 13B presenta resultados que muestran los niveles de proteína VEGF en complejo EPR-coroides en el día 3 en ratones de tipo silvestre (+/+) y MASP-2 (-/-) después de una lesión inducida por láser en un modelo de degeneración macular, como se describe en el ejemplo 13;

La FIGURA 14 presenta resultados que muestran el volumen de neovascularización coroidal media (NVC) en el día siete después de una lesión inducida por láser en ratones de tipo silvestre (+/+) y MASP-2 (-/-), como se

describe en el ejemplo 13;

Las FIGURAS 15A y 15B presentan curvas de respuesta a la dosis para la inhibición de la deposición de C4b (FIG. 15A) y la inhibición de la activación de trombina (FIG. 15B) después de la administración de un anticuerpo Fab2 para MASP-2 en suero de rata normal, como se describe en el ejemplo 14;

Las FIGURAS 16A y 16B presentan la agregación plaquetaria medida (expresada como área agregada) en ratones MASP-2 (-/-) (FIG. 16B) en comparación con la agregación plaquetaria en ratones de tipo silvestre no tratados y ratones de tipo silvestre en los que se inhibe la vía de complemento mediante el agente supresor, factor de veneno de cobra (CVF) y un inhibidor terminal de la vía (antagonista de C5aR) (FIGURA 16A) en un modelo de reacción de Schwartzman localizado de coagulación intravascular diseminada, como se describe en el ejemplo 15;

La FIGURA 17 ilustra gráficamente los niveles de nitrógeno de urea en sangre (BUN) medidos en ratones TS (+/+) (B6) o MASP-2 (-/-) receptores de trasplantes de riñones de donante TS (+/+), como se describe en el ejemplo 16;

La FIGURA 18 ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones TS (+/+) y MASP-2 (-/-) en función del número de días después de la infección bacteriana en el modelo de ligadura y punción cecal (LPC), como se describe en el ejemplo 17;

La FIGURA 19 ilustra gráficamente el número de bacterias medidas en ratones TS (+/+) y MASP-2 (-/-) después de la infección microbiana en el modelo de ligadura y punción cecal (LPC), como se describe en el ejemplo 17;

La FIGURA 20 es una gráfica de Kaplan-Mayer que ilustra el porcentaje de supervivencia de ratones TS (+/+), MASP-2 (-/-) y C3 (-/-) seis días después de la exposición por administración intranasal de *Pseudomonas aeruginosa*, como se describe en el ejemplo 18;

La FIGURA 21 ilustra gráficamente el nivel de deposición de C4b, medido como % de control, en muestras tomadas en diversos puntos de tiempo después de la administración subcutánea de 0,3 mg/kg o 1,0 mg/kg de anticuerpo monoclonal de ratón anti-MASP-2 en ratones TS, como se describe en el ejemplo 19;

La FIGURA 22 ilustra gráficamente el nivel de deposición de C4b, medido como % de control, en muestras tomadas en diversos puntos de tiempo después de la administración i.p. de 0,6 mg/kg de anticuerpo monoclonal de ratón anti-MASP-2 en ratones TS, como se describe en el ejemplo 19;

La FIGURA 23 ilustra gráficamente la neovascularización coroidal media (NVC) en el día siete después de la lesión inducida por láser en ratones TS (+/+) tratados previamente con una sola inyección i.p. de 0,3 mg/kg o 1,0 mg/kg de anticuerpo monoclonal de ratón anti-MASP-2; como se describe en el ejemplo 20;

La FIGURA 24A ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones MASP-2 (-/-) y TS (+/+) después de la infección con $5x10^8$/100 µl ufc de *N. meningitidis*, como se describe en el ejemplo 21;

La FIGURA 24B ilustra gráficamente el log ufc/ml de *N. meningitidis* recuperadas en diferentes puntos de tiempo en muestras de sangre tomadas de ratones MASP-2 KO (-/-) y TS (+/+) infectados con $5x10^8$ ufc/100 µl de *N. meningitidis*, como se describe en el ejemplo 21;

La FIGURA 25A ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones MASP-2 KO (-/-) y TS (+/+) después de la infección con $2x10^8$ ufc/100 µl de *N. meningitidis*, como se describe en el ejemplo 21;

La FIGURA 25B ilustra gráficamente el log ufc/ml de *N. meningitidis* recuperadas en diferentes puntos de tiempo en muestras de sangre tomadas de ratones TS (+/+) infectados con $2x10^8$ ufc/100 µl de N. meningitidis, como se describe en el ejemplo 21;

La FIGURA 25C ilustra gráficamente el log ufc/ml de *N. meningitidis* recuperadas en diferentes puntos de tiempo en muestras de sangre tomadas de ratones MASP-2 (-/-) infectados con $2x10^8$ ufc/100 µl de N. meningitidis, como se describe en el ejemplo 21;

La FIGURA 26A ilustra gráficamente los resultados de un ensayo de deposición de C3b que demuestra que los ratones MASP-2 (-/-) conservan una vía clásica funcional, como se describe en el ejemplo 22;

La FIGURA 26B ilustra gráficamente los resultados de un ensayo de deposición de C3b sobre placas recubiertas de cimosano, demostrando que los ratones MASP-2 (-/-) conservan una vía alternativa funcional, como se describe en el ejemplo 22;

La FIGURA 27A ilustra gráficamente la pérdida de tejido miocárdico inducida por lesión por isquemia/reperfusión (MIRI) después de la ligadura de la rama descendiente anterior de la arteria coronaria (LAD) y su reperfusión en ratones C4 (-/-) (n=6) y controles de la misma camada TS emparejados (n=7), mostrando en área en riesgo (AAR) y el tamaño del infarto (INF) como se describe en el ejemplo 22;

La FIGURA 27B ilustra gráficamente el tamaño del infarto (INF) en función del área en riesgo (AAR) en ratones C4 (-/-) y TS tratados como se describe en la FIGURA 42A, demostrando que los ratones C4 (-/-) son igual de susceptibles a la MIRI que los controles TS (línea discontinua), como se describe en el ejemplo 22;

La FIGURA 28A ilustra gráficamente los resultados de un ensayo de deposición de C3b usando suero de ratones TS, ratones C4 (-/-) y suero de ratones C4 (-/-) incubado previamente con manano, como se describe en el ejemplo 22;

La FIGURA 28B ilustra gráficamente los resultados de un ensayo de deposición de C3b en suero de ratones TS, C4 (-/-) y MASP-2 (-/-) mezclado con diversas concentraciones de un mAb anti-MASP-2 murino (mAbM11), como se describe en el ejemplo 22;

La FIGURA 28C ilustra gráficamente los resultados de un ensayo de deposición de C3b en suero humano de suero TS (con suficiente C4) y deficiente en C4 y suero de sujetos con deficiencia de C4 incubado previamente con manano, como se describe en el ejemplo 22;

La FIGURA 28D ilustra gráficamente los resultados de un ensayo de deposición de C3b en suero humano de sujetos TS (con suficiente C4) y deficientes para C4 mezclado con mAb anti-MASP-2 humano (mAbH3), como se describe en el ejemplo 22;

La FIGURA 29A ilustra gráficamente un análisis comparativo de la actividad de C3 convertasa en plasma de diversas cepas de ratón deficientes para complemento probadas en condiciones de ensayo específicas para la activación de la vía de lectina o en condiciones de ensayo específicas para la activación de la vía clásica, como se describe en el ejemplo 22;

La FIGURA 29B ilustra gráficamente la cinética resuelta en tiempo de la actividad de C3 convertasa en plasma de diversas cepas de ratón deficientes para complemento probadas en condiciones específicas para la activación de la vía de lectina, como se describe en el ejemplo 22;

La FIGURA 30 ilustra los resultados de un análisis de transferencia de Western que muestra la activación de C3 humano, mostrada por la presencia de la cadena a', mediante los sustratos de trombina, FXIa y FXa, como se describe en el ejemplo 23;

La FIGURA 31 muestra los resultados del ensayo de deposición de C3 en muestras de suero obtenidas de TS, MASP-2 (-/-), F11(-/-), F11(-/-)/C4 (-/-) y C4 (-/-), como se describe en el ejemplo 23;

La FIGURA 32A es una gráfica de supervivencia de Kaplan-Meyer que muestra el porcentaje de supervivencia después de la exposición a 7,0 Gy de radiación en ratones de control y en ratones tratados con anticuerpo anti-MASP-2 murino (mAbM11) o anticuerpo anti-MASP-2 humano (mAbH6), como se describe en el ejemplo 29;

La FIGURA 32B es una gráfica de supervivencia de Kaplan-Meyer que muestra el porcentaje de supervivencia después de la exposición a 6,5 Gy de radiación en ratones de control y en ratones tratados con anticuerpo anti-MASP-2 murino (mAbM11) o anticuerpo anti-MASP-2 humano (mAbH6), como se describe en el ejemplo 29;

La FIGURA 33 es una gráfica de Kaplan-Meyer que ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones MASP-2 KO y TS después de la administración de una dosis infecciosa de $2,6 \times 10^7$ ufc de *N. meningitidis* serogrupo A Z2491, que demuestra que los ratones deficientes para MASP-2 están protegidos frente a la mortalidad inducida por *N. meningitidis*, como se describe en el ejemplo 30;

La FIGURA 34 es una gráfica de Kaplan-Meyer que ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones MASP-2 KO y TS después de la administración de una dosis infecciosa de 6×10^6 ufc de *N. meningitidis* serogrupo B, cepa MC58, que demuestra que los ratones deficientes para MASP-2 están protegidos frente a la mortalidad inducida por *N. meningitidis* serogrupo B, cepa MC58, como se describe en el ejemplo 30;

La FIGURA 35 ilustra gráficamente el log ufc/ml de *N. meningitidis* serogrupo B cepa MC58 recuperadas en diversos puntos de tiempo en muestras de sangre tomadas de los ratones MASP-2 KO y TS después de la infección i.p. con $6x10^6$ ufc de *N. meningitidis* serogrupo B, cepa MC58 (n=3 en diferentes puntos de tempo para ambos grupos de ratones, los resultados se muestran como media±EEM) que demuestran que aunque los ratones MASP-2 KO se infectaron con la misma dosis de *N. meningitidis* serogrupo B cepa MC58 que los ratones TS, los ratones MASP-2 KO tenían una mejor eliminación de la bacteriemia en comparación con los TS, como se describe en el ejemplo 30;

La FIGURA 36 ilustra gráficamente la puntuación media de enfermedad de ratones MASP-2 y TS a las 3, 6, 12 y 24 horas después de la infección con $6x10^6$ ufc/100 µl de *N. meningitidis* serogrupo B cepa MC58, que demuestran que los ratones deficientes para MASP-2 mostraron una mayor resistencia a la infección, con puntuaciones de enfermedad mucho más bajas a las 6 horas, como se describe en el ejemplo 30;

La FIGURA 37 es una gráfica de Kaplan-Meyer que ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones después de la administración de una dosis infecciosa de 4×10^6 ufc/100 µl de *N. meningitidis* serogrupo

B, cepa MC58, seguido de la administración 3 horas después de la infección de anticuerpo inhibidor anti-MASP-2 (1 mg/kg) o anticuerpo de control de isotipo, demostrando que el anticuerpo anti-MASP-2 es eficaz para tratar y mejorar la supervivencia en sujetos infectados por *N. meningitidis*, como se describe en el ejemplo 31;

La FIGURA 38 ilustra gráficamente el log ufc/ml de recuentos viables de *N. meningitidis* serogrupo B-MC58 recuperadas en distintos puntos de tiempo en suero humano al 20% de concentración después de la infección i.p. con $6{,}5x10^6$ ufc/100 µl de *N. meningitidis* serogrupo B cepa MC58 a los 0, 30, 60 y 90 minutos después de la incubación en presencia de: (A) suero humano normal (NHS) más anticuerpo humano anti-MASP-2; (B) suero humano normal (NHS) más anticuerpo de control de isotipo; (C) suero humano MBL-/-; (D) suero humano normal (NHS) y (E) suero humano normal (NHS) inactivado por calor, demostrando que la eliminación dependiente de complemento de *N. meningitidis* en suero humano mejoró significativamente mediante la adición del anticuerpo humano anti-MASP-2, como se describe en el ejemplo 32;

La FIGURA 39 ilustra gráficamente el log ufc/ml de recuentos viables de *N. meningitidis* serogrupo B-MC58 recuperadas en distintos puntos de tiempo en las muestras de suero de ratón, demostrando que los sueros de ratón MASP-2 -/- tienen un mayor nivel de actividad bactericida para *N. meningitidis* que los sueros de ratón TS, como se describe en el ejemplo 32;

La FIGURA 40 ilustra gráficamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón lisados (Crry/C3-/-) en el sobrenadante medida por fotometría) de eritrocitos murinos recubiertos de manano por suero humano frente a un intervalo de concentraciones de suero. Los sueros ensayados incluyeron NHS inactivado por calor (HI), MBL-/-, NHS +anticuerpo anti-MASP-2 y NHS de control, como se describe en el ejemplo 33;

La FIGURA 41 ilustra gráficamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón TS en el sobrenadante medida por fotometría) de eritrocitos murinos no recubiertos de manano por suero humano frente a un intervalo de concentraciones de suero. Los sueros ensayados incluyeron NHS inactivado por calor (HI), MBL-/-, NHS +anticuerpo anti-MASP-2 y NHS de control, demostrando que la inhibición de MASP-2 inhibe la lisis mediada por complemento de eritrocitos de ratón TS no sensibilizados, como se describe en el ejemplo 33;

La FIGURA 42 ilustra gráficamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón (CD55/59 -/-) en el sobrenadante medida por fotometría) de eritrocitos murinos no recubiertos de manano por suero humano frente a un intervalo de concentraciones de suero. Los sueros ensayados incluyeron NHS inactivado por calor (HI), MBL-/-, NHS +anticuerpo anti-MASP-2 y NHS de control, como se describe en el ejemplo 33;

La FIGURA 43 ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia frente al tiempo (días) después de la exposición a 8,0 Gy de radiación en ratones de control y ratones tratados con anticuerpo anti-MASP-2 humano (mAbH6), como se describe en el ejemplo 34;

La FIGURA 44 ilustra gráficamente el tiempo hasta la aparición de oclusión microvascular después de la inyección de LPS en ratones MASP-2 -/- y TS, mostrando el porcentaje de ratones con formación de trombos medido a lo largo de 60 minutos, demostrando que se detecta formación de trombos después de 15 minutos en ratones TS, con hasta un 80% de los ratones TS que muestran formación de trombos a los 60 minutos; en cambio, ninguno de los ratones MASP-2 -/- mostró formación de trombos durante el periodo de 60 minutos (rango log: p=0,0005), como se describe en el ejemplo 35; y

La FIGURA 45 ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones de control tratados con suero salino (n=5) y ratones tratados con anticuerpo anti-MASP-2 (n=5) en el modelo de SHU frente al tiempo (horas), demostrando que todos los ratones de control murieron a las 42 horas, mientras que, en cambio, un 100 % de los ratones tratados con anticuerpo anti-MASP-2 sobrevivió durante el transcurso del experimento, como se describe en el ejemplo 36.

DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:1 ADNc de MAp19 humana
SEQ ID NO:2 proteína MAp19 humana (con líder)
SEQ ID NO:3 proteína MAp19 humana (madura)
SEQ ID NO:4 ADNc de MASP-2 humana
SEQ ID NO:5 proteína MASP-2 humana (con líder)
SEQ ID NO:6 proteína MASP-2 humana (madura)
SEQ ID NO:7 ADNg de MASP-2 humana (exones 1-6)

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

SEQ ID NO:8 secuencia de CUBI (aa 1-121)
SEQ ID NO:9 secuencia de CUBEGF (aa 1-166)

SEQ ID NO:10 CUBEGFCUBII (aa 1-293)
SEQ ID NO:11 región de EGF (aa 122-166)
SEQ ID NO:12 dominio de serina proteasa (aa 429-671)
SEQ ID NO:13 dominio de serina proteasa inactivo (aa 610-625 con mutación Ser618 a Ala)
SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL (péptido CUB1)
SEQ ID NO:15 TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ (péptido CUB1)
SEQ ID NO:16 TFRSDYSN (núcleo de región de unión a MBL)
SEQ ID NO:17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (región de unión a MBL)
SEQ ID NO:18 IDECQVAPG (PÉPTIDO DE EGF)
SEQ ID NO:19 ANMLCAGLESGGKDSCRGDSGGALV (núcleo de unión a serina proteasa)

INHIBIDORES PEPTÍDICOS:

SEQ ID NO:20 ADNc de longitud completa de MBL
SEQ ID NO:21 proteína MBL de longitud completa
SEQ ID NO:22 OGK-X-GP (unión consenso)
SEQ ID NO:23 OGKLG
SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G
SEQ ID NO:25 GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GPO GPO
SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEPGQGLRGLQGPOGKLGPOG
SEQ ID NO:27 GAOGSOGEKGAOGPQGPOGPOGKMGPKGEOGDO (h-ficolina humana)
SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOGPNGAOGEO (ficolina p35 humana)
SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI (sitio de escisión de C4)

INHIBIDORES DE EXPRESIÓN:

SEQ ID NO:30 ADNc de dominio de CUBI-EGF (nucleótidos 22-680 de la SEQ ID NO:4)
SEQ ID NO:31 5' CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC 3' Nucleótidos 12-45 de la SEQ ID NO:4, incluyendo el sitio de inicio de la traducción de MASP-2 (sentido)
SEQ ID NO:32 5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3' Nucleótidos 361-396 de la SEQ ID NO:4 que codifica una región que comprende el sitio de unión a MBL de MASP-2 (sentido)
SEQ ID NO:33 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAAA3' Nucleótidos 610-642 de la SEQ ID NO:4 que codifica una región que comprende el dominio CUBII

CEBADORES DE CLONACIÓN:

SEQ ID NO:34 CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC (PCR 5' para CUB)
SEQ ID NO:35 GGAATTCCTAGGCTGCATA (PCR 3' PARA CUB)
SEQ ID NO:36 GGAATTCCTACAGGGCGCT (PCR 3' PARA CUBIEGF)
SEQ ID NO:37 GGAATTCCTAGTAGTGGAT (PCR 3' PARA CUBIEGFCUBII)
Las SEQ ID NO:38-47 son cebadores de clonación para anticuerpos humanizados
La SEQ ID NO:48 es un enlace peptídico de 9 aa

VECTOR DE EXPRESIÓN:

SEQ ID NO:49 es el inserto de minigen de MASP-2
SEQ ID NO: 50 es el ADNc de MASP-2 murino
SEQ ID NO: 51 es la proteína MASP-2 (con líder)
SEQ ID NO: 52 es la proteína MASP-2 murina madura
SEQ ID NO: 53 es el ADNc de MASP-2 de rata
SEQ ID NO: 54 es la proteína MASP-2 de rata (con líder)
SEQ ID NO: 55 es la proteína MASP-2 de rata
SEQ ID NO: 56-59 son oligonucleótidos para mutagénesis de sitio dirigido de MASP-2 humana usados para generar MASP-2A humana
SEQ ID NO: 60-63 son oligonucleótidos para mutagénesis de sitio dirigido de MASP-2 murino usados para generar MASP-2A murino
SEQ ID NO: 64-65 son oligonucleótidos para mutagénesis de sitio dirigido de MASP-2 de rata usados para generar MASP-2A de rata

Descripción detallada

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento por parte de los presentes inventores de que es posible inhibir la vía de MASP-2 mediada por lectina dejando la vía clásica intacta. La presente invención también describe el uso de MASP-2 como diana terapéutica para inhibir la lesión celular asociada con la activación de la vía de complemento mediada por lectina, a la vez que queda intacto el componente de la vía clásica (dependiente de C1q) del sistema inmunitario.

I. Definiciones

A menos que se definan específicamente en la presente memoria, todos los términos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el que entendería un experto habitual en la materia de la presente divulgación. Las siguientes definiciones se proporcionan con el objetivo de proporcionar claridad respecto de los términos, en el sentido que se usan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones para describir la presente divulgación.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "activación de complemento dependiente de MASP-2" comprende la activación dependiente de MASP-2 de la vía de lectina, que se produce en condiciones fisiológicas (es decir, en presencia de Ca^{++}) que da lugar a la formación de la C3 convertasa de la vía de lectina C4b2a y tras la acumulación del producto de escisión de C3, C3b posterior a la C5 convertasa, C4b2a(C3b)n, que se ha determinado que principalmente, causa opsonización.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "vía alternativa" se refiere a la activación de complemento que se desencadena, por ejemplo, por cimosano de las paredes celulares fúngicas y de levadura, lipopolisacárido (LPS) de membranas externas gramnegativas y eritrocitos de conejo, así como de diversos polisacáridos puros, eritrocitos de conejo, virus, bacterias, células tumorales animales, parásitos y células dañadas y que tradicionalmente se ha pensado que surgen de la generación proteolítica espontánea de C3b a partir del factor de complemento C3.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "vía de lectina" se refiere a la activación de complemento que se produce mediante la unión específica de proteínas de unión a carbohidratos séricas y no séricas, incluyendo lectina de unión a manano (MBL), CL-11 y las ficolinas (H-ficolina, M-ficolina o L-ficolina).

Como se usa en la presente memoria, la expresión "vía clásica" se refiere a la activación de complemento que se desencadena por anticuerpos unidos a una partícula extraña y requiere la unión de la molécula de reconocimiento C1q.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "agente inhibidor de MASP-2" se refiere a cualquier agente que se une a o que interactúa directamente con MASP-2 e inhibe de manera eficaz la activación de complemento dependiente de MASP-2, incluyendo anticuerpos anti-MASP-2 y fragmentos de unión a MASP-2 de los mismos, péptidos naturales y sintéticos, moléculas pequeñas, receptores solubles de MASP-2, inhibidores de expresión e inhibidores naturales aislados y también abarca péptidos que compiten con MASP-2 por la unión a otra molécula de reconocimiento (por ejemplo, MBL, H-ficolina, M-ficolina o L-ficolina) en la vía de lectina, pero no abarca anticuerpos que se unen a dichas otras moléculas de reconocimiento. Los agentes inhibidores de MASP-2 útiles en el método de la divulgación pueden reducir la activación de complemento dependiente de MASP-2 en más de un 20%, tal como más de un 50%, tal como más de un 90%. En una realización, el agente inhibidor de MASP-2 reduce la activación de complemento dependiente de MASP-2 en más de un 90% (es decir, da como resultado una activación de complemento de MASP-2 de solo un 10% o menos).

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de los mismos, procedentes de un mamífero productor de anticuerpos (por ejemplo, ratón, rata, conejo y primate, incluyendo ser humano) o de un hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante o animales transgénicos (u otros métodos para producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpo), que se unen específicamente a un polipéptido diana, tal como, por ejemplo, MASP-2, polipéptidos o porciones de los mismos. No se pretende que el término "anticuerpo" se limite en cuanto a la fuente del anticuerpo o al modo en que se prepara (por ejemplo, mediante hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animal transgénico, síntesis peptídica, etc.). Los anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales y recombinantes; anticuerpos pan-específicos y multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos triespecíficos); anticuerpos humanizados; anticuerpos murinos; anticuerpos monoclonales quiméricos, de ratón-humano, de ratón-primate y de primate-humano; y anticuerpos anti-idiotipo y pueden ser cualquier anticuerpo intacto o un fragmento de los mismos. Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" abarca no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como dAb, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv), monocatenarios (ScFv), variantes sintéticas de los mismos, variantes de origen natural, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo con un fragmento de unión a antígeno con la especificidad necesaria, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio o fragmento de unión a antígeno (sitio de reconocimiento de epítopos) con la especificidad necesaria.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población homogénea de anticuerpos en donde el anticuerpo monoclonal está formado por aminoácidos (de origen natural y de origen no natural) que están implicados en la unión selectiva de un epítopo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos para el antígeno diana. La expresión "anticuerpo monoclonal" abarca no solo anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv), monocatenarios (ScFv), variantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de unión a antígeno, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un fragmento de unión a antígeno (sitio de reconocimiento de epítopos) con la especificidad necesaria y la capacidad para unirse a un epítopo. No se pretende que se limite

respecto de la fuente del anticuerpo o el modo en que se prepara (por ejemplo, mediante hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.). El término incluye inmunoglobulinas completas, así como los fragmentos etc. descritos anteriormente en la definición de "anticuerpo".

Como se usa en la presente memoria, el término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción procedente o relacionada con un anticuerpo de longitud completa, tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-MASP-2, que incluye en general la región de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos ilustrativos de los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$ y Fv, fragmentos scFv, diabodies, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenarias y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Como se usa en la presente memoria, un fragmento de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprende los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptido. En general, el polipéptido de Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L, que permite al scFv adoptar la estructura deseada para la unión al antígeno.

Como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo quimérico" es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y las regiones determinantes de la complementariedad procedentes de un anticuerpo de una especie no humana (por ejemplo, roedor), mientras que el resto de la molécula de anticuerpo procede de un anticuerpo humano.

Como se usa en la presente memoria, un "anticuerpos humanizado" es un anticuerpo quimérico que comprende una secuencia mínima que se conforma en regiones determinantes de la complementariedad específicas procedentes de una inmunoglobulina no humana que se trasplanta en un armazón de anticuerpo humano. Los anticuerpos humanizados son normalmente proteínas recombinantes en las que solo las regiones determinantes de la complementariedad son de origen no humano.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "lectina de unión a manano" ("MBL") es equivalente a proteína de unión a manano ("MBP").

Como se usa en la presente memoria, el "complejo de ataque a membrana" ("MAC") se refiere a un complejo de los cinco componentes terminales de complemento (C5b combinado con C6, C7, C8 y C-9) que se inserta en y altera las membranas (también citado como C5b-9).

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

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

En el sentido más amplio, los aminoácidos de origen natural pueden dividirse en grupos basándose en las características químicas de la cadena lateral de los respectivos aminoácidos. Por aminoácido "hidrófobo" se entiende Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys o Pro. Por aminoácido "hidrófilo" se entiende Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg o His. Esta agrupación de aminoácidos puede subclasificarse además del siguiente modo. Por aminoácido "hidrófilo no cargado" se entiende Ser, Thr, Asn o Gln. Por aminoácido "ácido" se entiende Glu o Asp. Por aminoácido "básico" se entiende Lys, Arg o His.

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

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

Como se usa en la presente memoria, un "epítopo" se refiere al sitio en una proteína (por ejemplo, una proteína MASP-2 humana) que se une a un anticuerpo. Los "epítopos solapantes" incluyen al menos uno (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis) restos de aminoácido comunes, incluyendo epítopos lineales y no lineales.

Como se usa en la presente memoria, los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de manera indistinta y significan cualquier cadena de aminoácidos unida con péptidos, independientemente de la longitud de la modificación postraduccional. La proteína MASP-2 descrita en la presente memoria puede contener o ser una proteína de tipo silvestre o puede ser variantes que tienen no más de 50 (por ejemplo, no más de uno, dos, tres,

cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 50) sustituciones de aminoácido conservativas. Las sustituciones conservativas incluyen normalmente sustituciones en los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina, glutamina, serina y treonina; lisina, histidina y arginina; y fenilalanina y tirosina.

En algunos casos, la proteína MASP-2 humana puede tener una secuencia de aminoácidos que es o es más de un 70 (por ejemplo, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100) % idéntica a la proteína MASP-2 humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5.

En algunos casos, los fragmentos peptídicos pueden tener al menos 6 (por ejemplo, al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o 600 o más) restos de aminoácido de longitud (por ejemplo, al menos 6 restos de aminoácido contiguos de la SEQ ID NO: 5). En algunos casos, un fragmento peptídico antigénico de una proteína MASP-2 humana tiene menos de 500 (por ejemplo, menos de 450, 400, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7 o 6) restos de aminoácido de longitud (por ejemplo, menos de 500 restos de aminoácido contiguos en una cualquiera de las SEQ ID NO: 5).

El porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos se define como el porcentaje de aminoácidos en una secuencia candidata que es idéntico a los aminoácidos en una secuencia de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. El alineamiento a efectos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia puede lograrse de diversas maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles para el público, tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr un alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se están comparando pueden determinarse mediante métodos conocidos.

II. Descripción general

Las lectinas (MBL, M-ficolina, H-ficolina, L-ficolina y CL-11) son las moléculas de reconocimiento específicas que activan el sistema de complemento innato y el sistema incluye la vía de iniciación de lectina y el bucle de amplificación de la vía terminal que amplifica la activación iniciada por lectinas de moléculas efectoras de complemento terminales. C1q es la molécula de reconocimiento específica que activa el sistema de complemento adquirido y el sistema incluye la vía de iniciación clásica y el bucle de amplificación de la vía terminal que amplifica la activación iniciada por C1q de moléculas efectoras de complemento terminales. Los presentes inventores hacen referencia a estos dos sistemas de activación de complemento principales como el sistema de complemento dependiente de lectina y el sistema de complemento dependiente de C1q, respectivamente.

Además de su papel esencial en la defensa inmunitaria, el sistema de complemento contribuye al daño tisular en muchas afecciones clínicas. Por lo tanto, hay una necesidad acuciante de desarrollar inhibidores de complemento terapéuticamente eficaces para prevenir estos efectos adversos. Al reconocer que es posible inhibir la vía de MASP-2 mediada por lectina mientras que se deja intacta la vía clásica, se llega a la conclusión de que podría ser altamente deseable inhibir de manera específica solo el sistema de activación de complemento que causa una patología particular sin desactivar completamente las capacidades de defensa inmunitaria del complemento. Por ejemplo, en los estados patológicos en los que la activación de complemento está mediada predominantemente por el sistema de complemento dependiente de lectina, sería ventajoso inhibir específicamente solo este sistema. Esto podría dejar intacto el sistema de activación de complemento dependiente de C1q para manejar el procesamiento de inmunocomplejos y ayudar en la defensa del hospedador contra infecciones.

El componente proteínico preferido como diana en el desarrollo de agentes terapéuticos para inhibir específicamente el sistema de complemento dependiente de lectina es MASP-2. De todos los componentes de proteína conocidos del sistema de complemento dependiente de lectina (MBL, H-ficolina, M-ficolina, L-ficolina, MASP-2, C2-C9, Factor B, Factor D y properdina), solo MASP-2 es tanto única para el sistema de complemento dependiente de lectina como necesaria para que funcione el sistema. Las lectinas (MBL, H-ficolina, M-ficolina, L-ficolina y CL-11) también son componentes únicos en el sistema de complemento dependiente de lectina. Sin embargo, la pérdida de uno cualquiera de los componentes de lectina podría no inhibir necesariamente la activación del sistema debido a la redundancia de las lectinas. Sería necesario inhibir las cinco lectinas para garantizar una inhibición del sistema de activación de complemento dependiente de lectina. Además, ya que se sabe que MBL y las ficolinas tienen actividad opsónica independiente de complemento, la inhibición de la función de lectina podría dar como resultado la pérdida de este mecanismo de defensa del hospedador beneficioso contra la infección. En cambio, esta actividad opsónica de las lectinas independiente de complemento podría permanecer intacta en caso de que MASP-2 fuese la diana inhibidora. Un beneficio añadido de MASP-2 como diana terapéutica para inhibir el sistema de activación de complemento dependiente de lectina es que la concentración plasmática de MASP-2 se encuentra entre las más

bajas de cualquier proteína de complemento (≈ 500 ng/ml); por lo tanto, pueden ser suficientes concentraciones correspondientemente más bajas de inhibidores de alta afinidad de MASP-2 para obtener una inhibición completa (Moller-Kristensen, M., et al., *J. Immunol Methods* 282:159-167, 2003).

III. PAPEL DE MASP-2 EN DIVERSAS ENFERMEDADES Y AFECCIONES Y MÉTODOS TERAPÉUTICOS QUE USAN AGENTES INHIBIDORES DE MASP-2

AFECCIONES RENALES

Se ha relacionado la activación del sistema de complemento con la patogénesis de una gran variedad de enfermedades renales; incluyendo, glomerulonefritis mesangioproliferativa (nefropatía por 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 posinfecciosa aguda (glomerulonefritis posenterocócica), glomerulonefritis crioglobulinémica (Ohsawa, I., et al., *Clin Immunol. 101*:59-66, 2001), nefritis lúpica (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 observado en las últimas décadas implicación del complemento en enfermedades renales pero sigue habiendo discusión acerca de su papel exacto en el inicio, el desarrollo y la fase de resolución de la enfermedad renal. En condiciones normales, la contribución del complemento es beneficiosa para el hospedador, pero la activación y deposición inadecuada del complemento puede contribuir al daño tisular.

Hay pruebas indicios sustanciales de que la glomerulonefritis, inflamación de los glomérulos, se inicia normalmente por la deposición de inmunocomplejos sobre las estructuras glomerulares o tubulares que después desencadena la activación de complemento, la inflamación y el daño tisular. Kahn y Sinniah demostraron el aumento de la deposición de C5b-9 en las membranas tubulares basales en biopsias tomadas de pacientes con diversas formas de glomerulonefritis (Kahn, T.N., et al., *Histopath. 26*:351-6, 1995). En un estudio de pacientes con nefropatía por IgA (Alexopoulos, A., et al., *Nephrol. Dial. Transplant 10*:1166-1172, 1995), la deposición de C5b-9 en las estructuras de membrana epitelial/basal se correlacionó con los niveles plasmáticos de creatinina. Otro estudio acerca de la nefropatía membranosa demostró una relación entre el resultado clínico y los niveles de sC5b-9 en 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 de complemento que inhibe al complejo de ataque a membrana en las membranas plasmáticas, así como C5b-9 en orina de pacientes con glomerulonefritis membranosa (Letho, T., et al., *Kidney Int. 47*:1403-11, 1995). El análisis histopatológico de muestras de biopsia tomadas de estos mismos pacientes demostró la deposición de las proteínas C3 y C9 en los glomérulos, mientras que la expresión de CD59 en estos tejidos se redujo en comparación con la del tejido renal normal. Estos diversos estudios sugieren que una glomerulonefritis mediada por complemento continuada da como resultado la expresión urinaria de proteínas de complemento que se correlaciona con el grado de daño tisular y el pronóstico de la enfermedad.

La inhibición de la activación de 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 para C6 (que no pueden formar C5b-9) dio como resultado una proliferación celular glomerular un 90% menor, una reducción del 80% en la infiltración de plaquetas y macrófagos, una síntesis reducida del colágeno de tipo IV (un marcador de la expansión de la matriz mesangial) y un 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 principal del daño tisular mediante complemento en este modelo de suero de rata anti-timocitos. En otro modelo de glomerulonefritis, la infusión de dosis graduadas anticuerpo de conejo anti-membrana basal glomerular de rata produjo un influjo dependiente de la dosis de leucocitos polimorfonucleares (PMN) que se atenuó por el tratamiento previo con factor de veneno de cobra (para agotar el complemento) (Scandrett, A.L., et al., *Am. J. Physiol. 268*:F256-F265, 1995). Las ratas tratadas con factor de veneno de cobra también mostraron una histopatología reducida, una proteinuria a largo plazo reducida y menores niveles de creatinina que las ratas de control. Empleando tres modelos de GN en ratas (suero anti-timocitos, Con A anti-Con A y nefritis de Heymann pasiva), Couser et al., demostraron la potencial eficacia terapéutica de las estrategias 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 mostraron un influjo de PMN, plaquetas y macrófagos reducido, mesangliolisis reducida y proteinuria frente a ratas de control. Se han proporcionado pruebas adicionales de la importancia de la activación del complemento en la glomerulonefritis mediante el uso de un MoAb anti-C5 en el modelo de ratón NZB/W F1. El MoAb anti-C5 inhibe la escisión de C5, bloqueando de este modo la generación de C5a y C5b-9. Una terapia continuada con MoAb anti-C5 durante 6 meses dio como resultado una mejora significativa del transcurso de la glomerulonefritis. Se encuentra en desarrollo un anticuerpo monoclonal anti-C5 (5G1.1) que previene la escisión del componente de complemento C5 en sus componentes proinflamatorios por Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut, como tratamiento potencial para la glomerulonefritis.

Se proporcionan pruebas directas del papel patológico del complemento en la lesión renal por estudios de pacientes

con deficiencias genéticas en componentes de complemento específicos. Una serie de estudios han documentado la asociación de la enfermedad renal con deficiencias del factor H regulador del complemento (Ault, B.H., *Nephrol. 14*:1045-1053, 2000; Levy, M., et al., *Kidney Ini. 30*:949-56, 1986; Pickering, M.C., et al., *Nat. Genet. 31*:424-8, 2002). La deficiencia de Factor H da como resultado bajos niveles plasmáticos de factor B y C3 y en el consumo de C5b-9. Tanto la glomerulonefritis membranoproliferativa atípica (MPGN) como el síndrome hemolítico urémico (SHU) se encuentran asociados con una deficiencia de factor H. Los cerdos deficientes para factor H (Jansen, J.H., et al., *Kidney Int. 53*:331-49, 1998) y los ratones con supresión génica de factor H (Pickering, M.C., 2002) muestran síntomas similares a MPGN, que confirman la importancia del factor H en la regulación del complemento. Las deficiencia de otros componentes del complemento se asocian con la enfermedad renal, secundaria al desarrollo de lupus eritematoso sistémico (LES) (Walport, M.J., Davies, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci. 815*:267-81, 1997). La deficiencia de C1q, C4 y C2 causa una fuerte predisposición al desarrollo de LES por mecanismos relacionados con una eliminación defectuosa de inmunocomplejos y material apoptótico. En muchos de estos pacientes de LES se produce nefritis lúpica, caracterizada por la deposición de complejos inmunes por todos los glomérulos.

Se han proporcionado pruebas adicionales que relacionan la activación de complemento y la enfermedad renal por la identificación en pacientes de autoanticuerpos dirigidos contra componentes del complemento, algunos de los cuales se han relacionado directamente con la enfermedad renal (Trouw, LA., et al., *Mol. Immunol. 38*:199-206, 2001). Algunos de estos autoanticuerpos muestran un grado tan alto de correlación con la enfermedad renal que se introdujo la expresión factor nefrítico (NeF) para indicar esta actividad. En estudios clínicos, aproximadamente un 50% de los pacientes positivos para factores nefríticos desarrollaron MPGN (Spitzer, R.E., et al., *Clin. Immunol. Immunopathol. 64*:177-83, 1992). C3NeF es un autoanticuerpo dirigido contra la C3 convertasa de la vía alternativa (C3bBb) y estabiliza a esta convertasa, promoviendo de este modo la activación de la vía alternativa (Daha, M.R., et al., *J. Immunol. 116*:1-7, 1976). Igualmente, un autoanticuerpo con especificidad por la C3 convertasa de la vía clásica (C4b2a), denominado C4NeF, estabiliza a esta convertasa y de este modo promueve 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 han descrito autoanticuerpos anti-C1q que están relacionados con la nefritis en pacientes de LES (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 ha comunicado que un aumento en el título de estos autoanticuerpos anti-C1q predice un brote de nefritis (Coremans, I.E., et al., *Am. J. Kidney Dis. 26*:595-601, 1995). Los depósitos inmunitarios eluidos de riñones postmortem de pacientes de LES revelaron la acumulación de estos autoanticuerpos anti-C1q (Mannick, M., et al., *Arthritis Rheumatol. 40*:1504-11, 1997). Todos estos hechos apuntan a un papel patológico para estos autoanticuerpos. Sin embargo, no todos los pacientes con autoanticuerpos anti-C1q desarrollan enfermedad renal y asimismo, algunos individuos sanos tienen un bajo título de autoanticuerpos anti-C1q (Siegert, C.E., et al., *Clin. Immunol. Immunopathol. 67*:204-9, 1993).

Además de las vías alternativa y clásica de activación del complemento, la vía de lectina también puede tener un papel patológico importante en la enfermedad renal. Se han detectado niveles elevados de MBL, serina proteasa asociada con MBL y productos de activación de complemento mediante técnicas inmunohistoquímicas en material de biopsia renal obtenido de pacientes a los que se han diagnosticado varias enfermedades renales diferentes, incluyendo 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 nefropatía por IgA (Endo, M., et al., *Clin. Nephrology* 55:185-191, 2001). Por lo tanto, a pesar del hecho de que se ha conocido durante décadas la asociación entre el complemento y las enfermedades renales, los datos acerca de cómo influencia exactamente el complemento a estas enfermedades renales dista de ser completo.

Por lo tanto, un aspecto de la divulgación se refiere al tratamiento de afecciones renales, incluyendo, pero sin limitación, glomerulonefritis mesangioproliferativa, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis membranoproliferativa (glomerulonefritis mesangiocapilar), glomerulonefritis posinfecciosa aguda (glomerulonefritis posestreptocócica), glomerulonefritis crioglobulinémica, nefritis lúpica, nefritis por púrpura de Henoch-Schonlein o nefropatía por IgA, mediante la administración de una composición que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que padece dicho trastorno. El agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto por vía sistémica, tal como por vía intraarterial, intravenosa, intramuscular, subcutánea u otra administración parenteral o potencialmente, mediante administración oral para agentes no peptidérgicos. El agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse periódicamente a lo largo de un periodo de tiempo prolongado para el tratamiento o control de una afección crónica o puede ser mediante administración individual o repetida en el periodo antes, durante o después de un traumatismo o lesión aguda.

TRASTORNOS SANGUÍNEOS

La septicemia está provocada por una reacción abrumadora del paciente a los microorganismos invasores. Una función importante del sistema de complemento es orquestar la respuesta inflamatoria contra bacterias invasoras y otros patógenos. De manera coherente con este papel fisiológico, se ha demostrado en numerosos estudios que la activación de complemento tiene un papel principal en la patogénesis de la septicemia (Bone, R.C., *Annals. Internal. Med. 115:*457-469, 1991). La definición de las manifestaciones clínicas de la septicemia se encuentra en constante evolución. La septicemia se define normalmente como la respuesta sistémica del hospedador a una infección. Sin embargo, en muchas ocasiones, no se encuentran indicios clínicos de infección (por ejemplo, cultivos de sangre bacterianos positivos) en pacientes con síntomas de septicemia. Esta discrepancia se abordó en primer lugar en una

conferencia de consenso en 1992 cuando se estableció el término "síndrome de respuesta inflamatoria sistémica" (SIRS) y para el cual no era necesaria la presencia de una infección bacteriana definitoria (Bone, R.C., et al., *Crit. Care Med. 20*:724-726, 1992). En la actualidad hay un consenso general de que la septicemia y el SIRS van acompañados de la incapacidad para regular la respuesta inflamatoria. A efectos de esta breve revisión, los presentes inventores considerarán que la definición clínica de la septicemia también incluye la septicemia grave, el choque séptico y el SIRS.

La fuente predominante de infección en los pacientes con septicemia antes del final de la década de 1980 eran bacterias gramnegativas. Se sabe que el lipopolisacárido (LPS), el componente principal de la pared celular de bacterias gramnegativas, estimula la liberación de mediadores inflamatorios de diversos tipos celulares e induce síntomas de infecciones agudas cuando se inyecta en animales (Haeney, M.R., et al., *Antimicrobial Chemotherapy 41*(Suppl. A):41-6, 1998). De manera interesante, el espectro de microorganismos responsables parece haber cambiado de bacterias predominantemente gramnegativas al final de la década de 1970 y principios de la década de 1980 a bacterias predominantemente grampositivas en la actualidad, por motivos que en la actualidad no están claros (Martin, G.S., et al., *N. Eng. J. Med. 348*:1546-54, 2003).

Diversos estudios han demostrado la importancia de la activación del complemento para mediar en la inflamación y contribuir a los rasgos del choque, en particular, el choque séptico y el choque hemorrágico. Los organismos tanto grampositivos como gramnegativos normalmente precipitan el choque séptico. El LPS es un potente activador del complemento, predominantemente por la vía alternativa, aunque también se produce la activación de la vía clásica mediada por anticuerpos (Fearon, D.T., et al., *N. Engl. J. Med. 292*:937-400, 1975). Los principales componentes de la pared celular grampositiva son el peptidoglucano y el ácido lipoteicoico y ambos componentes son potentes activadores de la vía de complemento alternativa, aunque en presencia de anticuerpos específicos, también pueden activar la vía de complemento clásica (Joiner, K.A., et al., *Ann. Rev. Immunol.* 2:461-2, 1984).

Inicialmente, se implicó el sistema de complemento con la patogénesis de la septicemia cuando algunos investigadores que las anafilotoxinas C3a y C5a median una variedad de reacciones inflamatorias que también podrían producirse durante la septicemia. Estas anafilotoxinas evocan la vasodilatación y un aumento en la permeabilidad microvascular, eventos que desempeñan un papel crucial en el choque séptico (Schumacher, W.A., et al., *Agents Actions 34*:345-349, 1991). Además, las anafilotoxinas inducen broncoespasmo, liberación de histamina por mastocitos y agregación de plaquetas. Además, ejercen numerosos efectos en los granulocitos, tales como quimiotaxia, agregación, adhesión, liberación de enzimas lisosómicas, generación del anión superóxido tóxico y formación de leucotrienos (Shin, H.S., et al., *Science 162*:361-363, 1968; Vogt, W., *Complement 3*:177-86, 1986). Se cree que estos efectos biológicos desempeñan un papel en el desarrollo de las complicaciones de la septicemia, tales como choque o síndrome de la dificultad respiratoria aguda (SDRA) (Hammerschmidt, D.E., et al., *Lancet 1*:947-949, 1980; Slotman, G.T., et al., *Surgery 99*:744-50, 1986). Además, los niveles elevados de la anafilotoxina C3a están asociados con un resultado fatal en la septicemia (Hack, C.E., et al., *Am. J. Med. 86*:20-26, 1989). En algunos modelos animales de choque, ciertas cepas deficientes para complemento (por ejemplo, las deficientes para C5) son más resistentes a los efectos de las infusiones de LPS (Hseuh, W., et al., *Immunol. 70*:309-14, 1990).

Se ha demostrado que el bloqueo de la generación de C5a con anticuerpos durante el inicio de la septicemia en roedores mejora significativamente la supervivencia (Czermak, B.J., et al., *Nat. Med. 5*:788-792, 1999). Se efectuaron hallazgos similares cuando se bloqueó el receptor de C5a (C5aR), ya sea con anticuerpos o con un inhibidor de molécula pequeña (Huber-Lang, M.S., et al., *FASEB J. 16*:1567-74, 2002; Riedemann, N.C., et al., *J. Clin. Invest. 110*:101-8, 2002). Estudios experimentales anteriores en monos han indicado que el bloqueo con anticuerpos de C5a atenuó el choque séptico inducido por *E. coli* y el síndrome del distrés respiratorio agudo (Hangen, D.H., et al., *J. Surg. Res. 46*:195-9, 1989; Stevens, J.H., et al., *J. Clin. Invest.* 77:1812-16, 1986). En seres humanos con septicemia, C5a se encuentra elevado y se asocia con tasas de supervivencia significativamente reducidas, junto con fallo multiorgánico, en comparación con el de pacientes y supervivientes a septicemias menos graves (Nakae, H., et al., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 84*:189-95, 1994; Nakae, et al., *Surg. Today 26*:225-29, 1996; Bengtson, A., et al., *Arch. Surg. 123*:645-649, 1988). Aún falta por estudiar con más detalle el mecanismo mediante el cual C5a ejerce sus efectos dañinos durante la septicemia, pero datos recientes sugieren que la generación de C5a durante la septicemia compromete de manera significativa las funciones inmunitarias innatas de los neutrófilos de la sangre (Huber-Lang, M.S., et al., *J. Immunol. 169*:3223-31, 2002), su capacidad para expresar una explosión respiratoria y su capacidad para generar citocinas (Riedemann, N.C., et al., *Immunity 19*:193-202, 2003). Además, la generación de C5a durante la septicemia parece tener efectos procoagulantes (Laudes, I.J., et al., *Am. J. Pathol. 160*:1867-75, 2002). La proteína moduladora de complemento, CI INH también ha demostrado ser eficaz en modelos animales de septicemia y SDRA (Dickneite, G., *Behring Ins. Mitt. 93*:299-305, 1993).

La vía de lectina también puede tener un papel importante en la patogénesis de la septicemia. Se ha demostrado que MBL se une a una serie de microorganismos clínicamente importantes, incluyendo bacterias tanto gramnegativas como grampositivas y que activa la vía de lectina (Neth, O., et al., *Infect. Immun. 68*:688, 2000). Cada vez cobra más importancia el ácido lipoteicoico (LTA) como homólogo grampositivo del LPS. Es un potente inmunoestimulante que induce la liberación de citocinas de fagocitos mononucleares y sangre completa (Morath, S., et al., *J. Exp. Med. 195*:1635, 2002; Morath, S., et al., *Infect. Immun. 70*:938, 2002). Recientemente, se ha demostrado que la L-ficolina se une específicamente al LTA aislado de numerosas especies de bacteria

grampositivas, incluyendo *Staphylococcus aureus,* y activa la vía de lectina (Lynch, N.J., et al., *J. Immunol. 172*:1198-02, 2004). También se ha demostrado que MBL se une a LTA de *Enterococcus spp* en el que la cadena de poliglicerofosfato se sustituye con grupos glucosilo), pero no a LTA de otras nueve especies, incluyendo *S. aureus* (Polotsky, V.Y., et al., *Infect. Immun. 64*:380, 1996).

Por lo tanto, un aspecto de la divulgación proporciona un método para tratar la septicemia o una afección resultante de la septicemia, mediante la administración de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que padece septicemia o una afección resultante a causa de la septicemia, incluyendo, sin limitación, septicemia grave, choque séptico, síndrome de la dificultad respiratoria aguda resultante de la septicemia y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Se proporcionan métodos relacionados para el tratamiento de otros trastornos sanguíneos, incluyendo choque hemorrágico, anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica trombótica autoinmunitaria (TTP), síndrome hemolítico urémico (SHU), síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa) u otras afecciones destructoras de la médula/sangre, mediante la administración de una composición que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que padece dicha afección. El agente inhibidor de MASP-2 se administra al sujeto por vía sistémica, tal como por vía intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria (particularmente, en el caso del SDRA), subcutánea u otra administración parenteral o potencialmente, mediante administración oral para agentes no peptidérgicos. La composición de agente inhibidor de MASP-2 puede combinarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales para combatir las secuelas de la septicemia y/o el choque. Para la septicemia avanzada o el choque o una afección de distrés a causa de los mismos, la composición inhibidora de MASP-2 puede administrarse de manera adecuada en una forma farmacéutica de acción rápida, tal como por suministro intravenoso o intraarterial de un bolo de una solución que contiene la composición de agente inhibidor de MASP-2. Puede llevarse a cabo una administración repetida según determine un médico hasta que se haya resuelto la afección.

EL PAPEL DE MASP-2 EN LA HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA Y MÉTODOS TERAPÉUTICOS QUE USAN AGENTES INHIBIDORES DE MASP-2

Descripción general de la HPN

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), en ocasiones también citada como síndrome de Marchiafava-Micheli, es una enfermedad hematológica adquirida, potencialmente letal. La HPN se desarrolla por sí sola, citada como "HPN primaria" o en el contexto de otros trastornos de la médula ósea, tales como anemia aplásica, citada como "HPN secundaria". La mayoría de los casos son de HPN primaria. La HPN se caracteriza por una destrucción inducida por complemento de glóbulos rojos (hemólisis), bajos recuentos de glóbulos rojos (anemia), trombosis y fallo de la médula ósea. Los hallazgos de laboratorio en la HPN muestran cambios coherentes con una anemia hemolítica intravascular: hemoglobina baja, aumento de lactato deshidrogenasa, aumento del recuento de reticulocitos (glóbulos rojos inmaduros liberados por la médula ósea para reemplazar las células destruidas), aumento de la bilirrubina (un producto de degradación de la hemoglobina), en ausencia de anticuerpos de unión GRS autorreactivos como causa posible.

La seña de identidad de la HPN es la hemólisis crónica mediada por complemento causada por la activación no regulada de componentes terminales del complemento, incluyendo el complejo de ataque a membranas, sobre la superficie de GRS en circulación. Los GRS de pacientes con HPN se encuentran sometidos a una activación no controlada del complemento y a hemólisis debido a la ausencia de los reguladores de complemento, CD55 y CD59 sobre su superficie (Londorfer, M.A., et al., *Blood* 115(11):2283-91 (2010), Risitano, et al., *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry,* 11:528-535 (2011)). CD55 y CD59 se expresan abundantemente en GRS normales y controlan la activación del complemento. CD55 actúa como regulador negativo de la vía alternativa, inhibiendo el ensamblaje del complejo de C3 convertasa de la vía alternativa (C3bBb) y acelerando la desintegración de la convertasa preformada, bloqueando de este modo la formación del complejo de ataque a membrana (MAC). CD59 inhibe directamente al complejo de ataque a membrana del complemento mediante la unión al complejo C5b678 e impidiendo que se una C9 y polimerice.

Aunque la hemólisis y la anemia son los rasgos clínicos dominantes de la HPN, la enfermedad es un trastorno hematológico complejo que además incluye trombosis y fallo de la médula ósea como parte de los hallazgos clínicos (Risitano et al, *Mini Reviews in Med Chem* 11:528-535 (2011)). A nivel molecular, la HPN está causada por la expansión clonal anormal de células madre hematopoyéticas que carecen de un gen *PIG* A funcional. *PIG* A es un gen ligado a X que codifica una glucosil-fosfatidil inositol (GPI) transferasa necesaria para la expresión estable en la superficie de glucoproteínas de clase A ancladas a GPI, incluyendo CD55 y CD59. Por motivos que en la actualidad se están investigando, las células madre hematopoyéticas con un gen *PIG* A disfuncional que surge como resultado de mutaciones somáticas espontáneas pueden sufrir expansión clonal hasta el punto que su descendencia constituya una parte significativa del grupo de células hematopoyéticas periféricas. Aunque los eritrocitos y linfocitos descendientes del clon de la célula madre carecen de CD55 y CD59, solo los GRS sufren una lisis evidente después de entrar en la circulación.

El tratamiento actual para la HPN incluye transfusiones de sangre para la anemia, anticoagulación para la trombosis y el uso del anticuerpo monoclonal eculizumab (Soliris®), que protege a las células sanguíneas contra la destrucción

inmunitaria mediante la inhibición del sistema de complemento (Hillmen P. et al., *N. Engl. J. Med.* 350(6):552-559 (2004)). Eculizumab (Soliris®) es un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige al componente C5 del complemento, bloqueando su escisión por C5 convertasas, impidiendo de este modo la producción de C5a y el ensamblaje del MAC. El tratamiento de pacientes de HPN con eculizumab ha dado como resultado una reducción de la hemólisis intravascular, medida por la lactato deshidrogenasa (LDH), que da lugar a la estabilización de la hemoglobina y la no dependencia de transfusiones en aproximadamente la mitad de los pacientes (Risitano et al, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry,* 11(6) (2011)). Aunque prácticamente todos los pacientes que se someten a terapia con eculizumab logran niveles de LDH normales o prácticamente normales (debido al control de la hemólisis intravascular), tan solo aproximadamente un tercio de los pacientes logran un valor de hemoglobina de aproximadamente 11 g/dl y el resto de los pacientes en tratamiento con eculizumab siguen mostrando una anemia de moderada a grave (es decir, son dependientes de transfusiones), en proporciones aproximadamente iguales (Risitano A.M. et al., *Blood* 113:4094-100 (2009)). Como se describe en Risitano et al., *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 11:528-535 (2011), se demostró que los pacientes de HPN en tratamiento con eculizumab tenían grandes cantidades de fragmentos de C3 unidos a sus eritrocitos afectados por HPN (mientras que los pacientes no tratados no las tenían). Este hallazgo hizo reconocer que en los pacientes de HPN tratados con eculizumab, los GRS afectados por HPN que ya no se hemolizan debido al bloqueo de C5 pueden acumular cantidades copiosas de fragmentos de C3 unidos a membrana, que funcionan como opsoninas, lo que da como resultado su atrapamiento en las células reticuloendoteliales mediante receptores de C3 específicos y su posterior hemólisis extravascular. Por lo tanto, aunque previene la hemólisis intravascular y las consiguientes secuelas, la terapia con eculizumab únicamente desvía la eliminación de estos GRS de hemólisis intravascular a extravascular, dando como resultado una anemia residual no tratada sustancial en muchos pacientes (Risitano A.M. et al., *Blood* 113:4094-100 (2009)). Por lo tanto, se necesitan estrategias terapéuticas además del uso de eculizumab para aquellos pacientes que desarrollan hemólisis extravascular mediada por fragmento C3, debido a que siguen necesitando transfusiones de glóbulos rojos. Dichas estrategias que actúan de manera selectiva sobre el fragmento C3 han demostrado ser útiles en sistemas experimentales (Lindorfer et al., *Blood* 115:2283-91, 2010).

Mecanismos que inician el complemento en la HPN

El vínculo causal entre la expresión defectuosa de los reguladores negativos del complemento, CD55 y CD59 en la HPN, combinado con la eficacia de eculizumab para prevenir la hemólisis intravascular, define claramente la HPN como una afección causada por el sistema de complemento. Aunque este paradigma se encuentra ampliamente aceptado, queda aún por resolver la naturaleza de los eventos que inician la activación del complemento y las vías de activación del complemento implicadas. Debido a que CD55 y CD59 regulan negativamente las etapas de amplificación terminales en la cascada de complemento comunes a todas las vías de inicio del complemento, una deficiencia de estas moléculas ocasionará una activación de complemento terminal exagerada independientemente de que la activación del complemento se inicie por la vía de lectina, por la vía clásica o por la renovación espontánea de la vía alternativa. Por lo tanto, en pacientes con HPN, cualquier evento de activación del complemento que ocasione la deposición de C3b sobre la superficie de los GRS puede desencadenar una amplificación posterior y una hemólisis patológica (intravascular y/o extravascular) y precipitar crisis hemolíticas. Hasta ahora, ha sido complicado alcanzar una comprensión mecanística de los eventos moleculares que desencadenan las crisis hemolíticas en los pacientes de HPN. Debido a que ningún evento de inicio del complemento es abiertamente evidente en los pacientes con HPN que sufren una crisis hemolítica, la teoría prevalente es que la activación del complemento en la HPN puede producirse de manera espontánea debido al bajo nivel de activación al ralentí de la vía alternativa, que posteriormente se magnifica por un control inadecuado de la activación del complemento terminal debido a la ausencia de CD55 y CD59.

Sin embargo, es importante destacar que en su historia natural, la HPN normalmente se desarrolla o exacerba después de ciertos eventos, tales como una infección o una lesión (Risitano, *Biologics* 2:205-222 (2008)), que se ha demostrado que desencadenan la activación del complemento. Esta respuesta de activación del complemento no depende de una inmunidad previa del hospedador frente al patógeno que la incita y por lo tanto, probablemente no implica a la vía clásica. Más bien, parece ser que esta respuesta de activación del complemento se inicia por la unión de lectinas a patrones de carbohidratos extraños o "propios alterados" expresados sobre la superficie de agentes microbianos o tejidos dañados del hospedador. Por lo tanto, los eventos que precipitan las crisis hemolíticas en la HPN están estrechamente vinculados a la activación del complemento iniciada por las lectinas. Esto hace que sea altamente probable que las vías de activación de lectina proporcionen el desencadenante inicial que en última instancia da lugar a la hemólisis en pacientes con HPN. El documento WO 2005/074607 divulga el tratamiento de enfermedades hemolíticas, tales como la HPN, usando un compuesto que se une o de otro modo bloquea la generación y la actividad de los componentes del complemento.

Inhibidores de MASP-2 para bloquear la opsonización y la hemólisis extravascular en GRS afectados por HPN a través del sistema reticuloendotelial

Esta sección describe los efectos inhibidores de los agentes inhibidores de MASP-2 sobre la hemólisis en un modelo *in vitro* de HPN. Los hallazgos apoyan la utilidad de agentes de bloqueo de MASP-2 (incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos que se unen a y bloquean la función de MASP-2) para tratar a sujetos que padecen aspectos de la HPN y también el uso de inhibidores de MASP-2 para aliviar los efectos de la hemólisis extravascular mediada por el fragmento C3 en pacientes con HPN que se someten a tratamiento con un inhibidor de C5, tal como eculizumab.

Como se ha detallado anteriormente, los pacientes con HPN desarrollan anemia a causa de dos mecanismos distintos de eliminación de GRS de la circulación: hemólisis intravascular mediante la activación del complejo de ataque a membrana (MAC) y hemólisis extravascular después de la opsonización con C3b y la posterior eliminación tras la unión a receptores de complemento y la captación por el sistema reticuloendotelial. La hemólisis intravascular se previene en gran medida cuando se trata a un paciente con eculizumab. Ya que eculizumab bloquea el mecanismo efector lítico terminal que se produce aguas abajo tanto del evento iniciador del complemento como de la consiguiente opsonización, eculizumab no bloquea la hemólisis extravascular (Risitano A.M. et al., *Blood* 113:4094-100 (2009)). En cambio, los GRS que podrían haber sufrido hemólisis en pacientes de HPN no tratados ahora pueden acumular proteínas C3b activadas en su superficie, lo que aumenta la captación por el sistema reticuloendotelial y potencia su hemólisis extravascular. Por lo tanto, el tratamiento con eculizumab desvía de manera eficaz la eliminación de GRS de la hemólisis intravascular a la hemólisis extravascular. Como resultado, algunos pacientes de HPN tratados con eculizumab permanecen anémicos. Se deduce que los agentes que bloquean la activación del complemento aguas arriba y previenen la opsonización de los GRS afectados por HPN pueden ser particularmente adecuados para bloquear la hemólisis extravascular que no se previene por eculizumab.

Los datos presentados en este documento demuestran que la activación de complemento dependiente de MASP-2 es la ruta dominante para la opsonización dependiente de lectina. Por lo tanto, se espera que los agentes inhibidores de MASP-2 sean eficaces para limitar la opsonización e inhibir la hemólisis extravascular en la HPN.

Usando un modelo de HPN *in vitro*, los presentes inventores demostraron que la activación del complemento y la hemólisis resultante en la HPN de hecho se inician, al menos en parte, por la activación de complemento dependiente de MASP-2 y que no es una función independiente de la vía alternativa. Estos estudios usaron GRS de diversas estirpes de ratón sensibilizados con manano, incluyendo GRS de ratones deficientes para Crry (un regulador negativo importante de la vía de complemento terminal en ratones) así como GRS de ratones deficientes para CD55/CD59, que carecen de los mismos reguladores del complemento que se encuentran ausentes en los pacientes con HPN). Cuando se expuso a GRS deficientes para Crry sensibilizados con manano a suero humano suficiente para complemento, los GRS se hemolizaron de manera eficaz a una concentración de suero del 3% (FIGURA 40), mientras que el suero deficiente para complemento (HI: inactivado por calor) no era hemolítico. De manera notable, el suero suficiente para complemento en presencia de anticuerpo anti-MASP-2 tenía una actividad hemolítica reducida y se necesitaba un 6% de suero para una hemólisis eficaz (FIGURA 40). Se efectuaron observaciones similares cuando se probaron GRS deficientes para CD55/CD59 (FIGURA 42). El suero humano suficiente para complemento complementado con anticuerpo monoclonal anti-MASP-2 fue aproximadamente dos veces menos eficaz que el suero no tratado para soportar la hemólisis. Además, se necesitaron concentraciones mayores de suero tratado con anticuerpo monoclonal anti-MASP-2 para promover una hemólisis eficaz de GRS de TS no tratados en comparación con el suero no tratado (FIGURA 40). De manera colectiva, estos datos indican que la activación de complemento dependiente de MASP-2 contribuye de manera significativa a la respuesta de hemólisis. Los datos presentados en la presente memoria revelan los siguientes mecanismos patogénicos para la anemia en la HPN: hemólisis intravascular causada por la activación no regulada de componentes terminales del complemento y la lisis de GRS por formación de MAC y hemólisis extravascular causada por la opsonización de GRS por C3b, que se inicia, predominantemente, por activación de complemento dependiente de MASP-2. Por lo tanto, se espera que los agentes inhibidores de MASP-2 reduzcan de manera significativa la hemólisis intravascular en pacientes con HPN.

La hemólisis extravascular, un mecanismo menos dramático pero igualmente importante para la destrucción de GRS ocasiona anemia en la HPN, es principalmente el resultado de la opsonización por C3b, que está mediada de manera predominante por la activación de complemento dependiente de MASP-2. Por lo tanto, los agentes inhibidores de MASP-2 bloquearán preferencialmente la opsonización de los GRS y C3b y la consiguiente hemólisis extravascular en la HPN. Se espera que esta actividad terapéutica única de los agentes inhibidores de MASP-2 proporcione un beneficio de tratamiento significativo para todos los pacientes de HPN, ya que no existe en la actualidad ningún tratamiento para este proceso patogénico.

Inhibidores de MASP-2 como tratamiento adyuvante a agentes bloqueantes de complemento terminales:

Los datos presentados en la presente memoria detallan dos mecanismos patogénicos para la eliminación de GRS y la anemia en la HPN: la hemólisis intravascular iniciada, al menos en parte, por la activación de complemento dependiente de MASP-2 y por lo tanto, se espera que se inhiba de manera eficaz por un agente inhibidor de MASP-2 y la hemólisis extravascular causada por la opsonización de C3b impulsada por MASP-2 y por lo tanto, prevenida de manera eficaz por un agente inhibidor de MASP-2.

Se ha documentado exhaustivamente que los mecanismos tanto intravasculares como extravasculares de la hemólisis ocasionan anemia en pacientes con HPN (Risitano et al., *Blood* 113:4094-4100 (2009)). Por lo tanto, en el contexto de la HPN, se espera que la inhibición de MASP-2 aborde la hemólisis tanto intravascular como extravascular, proporcionando una ventaja significativa frente al inhibidor de C5, eculizumab. Por consiguiente, se espera que un agente de bloqueo de MASP-2 que inhiba la hemólisis intravascular y prevenga la hemólisis extravascular sea eficaz para prevenir el grado de anemia que desarrollan los pacientes con HPN.

También se sabe que los agentes de bloqueo de C5 (tales como eculizumab) bloquean de manera eficaz la

hemólisis intravascular pero no interfieren con la opsonización. Esto hace que los pacientes de HPN tratados con anti-C5 tengan una anemia residual sustancial debida a la hemólisis extravascular mediada por la activación de complemento dependiente de MASP-2 que queda sin tratar. Por lo tanto, se espera que un agente de bloqueo de C5 (tal como eculizumab) que previene la hemólisis intravascular, en combinación con un agente inhibidor de MASP-2 que previene la hemólisis extravascular sea, por lo tanto, más eficaz que cualquiera de los dos agentes de manera individual para prevenir la anemia que desarrollan los pacientes con HPN. De hecho, se espera que la combinación de un anti-C5 y un agente inhibidor de MASP-2 prevenga todos los mecanismos relevantes de destrucción de GRS en la HPN y por lo tanto, reduzca o bloquee todos los síntomas de la anemia en la HPN.

También se espera que otros agentes que bloquean el bucle de amplificación terminal del sistema de complemento que da lugar a la activación de C5 y la deposición de MAC (incluyendo, pero sin limitación, agentes que bloquean la properdina, el factor B o el factor D o que potencien la actividad inhibidora del factor I, el factor H u otros factores inhibidores del complemento) inhiban la hemólisis intravascular. Sin embargo, no se espera que estos agentes interfieran con la opsonización mediada por MASP-2 en los pacientes con HPN. Esto hace que los pacientes de HPN tratados con dichos agentes tengan una anemia residual sustancial debida a la hemólisis extravascular mediada por la activación de complemento dependiente de MASP-2 que queda sin tratar. Por lo tanto, se espera que el tratamiento con dichos agentes prevenga la hemólisis intravascular, en combinación con un agente inhibidor de MASP-2 que previene la hemólisis extravascular sea, por lo tanto, más eficaz que cualquiera de los dos agentes de manera individual para prevenir la anemia que desarrollan los pacientes con HPN. De hecho, se espera que la combinación de dichos agentes y un agente inhibidor de MASP-2 prevenga la totalidad o una gran mayoría de los mecanismos relevantes de destrucción de GRS en la HPN y por lo tanto, bloquee la totalidad o la gran mayoría de los síntomas de la anemia en la HPN.

La inhibición de MASP-2 mejora la supervivencia en sujetos infectados por *Neisseria meningitidis*

Tal como se describe en los ejemplos 30-32 y como se muestra en las FIGURAS 33-37, la inhibición de MASP-2 no reduce la supervivencia después de la infección por *Neisseria meningitidis*. Al contrario, se ha descubierto sorprendentemente que la inhibición de MASP-2 mejoró significativamente la supervivencia (FIGURAS 33 y 34) así como las puntuaciones de enfermedad (FIGURA 36) en estos estudios. La administración de anticuerpo anti-MASP2 proporcionó el mismo resultado (FIGURA 37), eliminando los efectos secundarios o compensatorios en la estirpe de ratones con supresión génica (*knockout*) como posible causa. Estos resultados favorables en animales con supresión de MASP-2 se asociaron con una eliminación más rápida de *Neisseria* de la sangre (FIGURA 35). Asimismo, como se describe en la presente memoria, la incubación de *Neisseria* con suero humano eliminó a las *Neisseria* (FIGURA 38). Además, la adición de un anticuerpo monoclonal funcional específico para MASP-2 humana que bloquea la vía de activación de complemento de la lectina dependiente de MASP-2, pero no la administración de un anticuerpo monoclonal de control de isotipo, potenció esta respuesta de eliminación. En el contexto de la activación de complemento dependiente de lectina por *Neisseria*, el bloqueo d MASP-2 mejoró la destrucción lítica del organismo *in vitro* (FIGURA 38). Ya que la lisis de *Neisseria* es el principal mecanismo protector en el hospedador sin exposición previa al patógeno, el bloqueo de MASP-2 *in vivo* aumenta la eliminación de *Neisseria* y ocasiona una eliminación mejorada. Estos resultados son sorprendentes y proporcionan una ventaja significativa frente al tratamiento con eculizumab, que se ha demostrado que aumenta la susceptibilidad a infecciones meningocócicas potencialmente letales y fatales (Dmytrijuk A., et al., *The Oncologist* 13:993-1000 (2008)).

De acuerdo con lo anterior, la divulgación proporciona un método para tratar la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) mediante la administración de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que padece HPN o una afección resultante de la HPN (por ejemplo, anemia, hemoglobina en la orina y trombosis). El agente inhibidor de MASP-2 se administra por vía sistémica al sujeto que padece HPN o una afección resultante de la HPN, tal como por vía intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, subcutánea u otra administración parenteral o potencialmente, mediante administración oral para agentes no peptidérgicos.

EL PAPEL DE MASP-2 EN MICROANGIOPATÍAS TROMBÓTICAS, INCLUYENDO SÍNDROME HEMOLÍTICO URÉMICO (SHU), SÍNDROME HEMOLÍTICO URÉMICO ATÍPICO (SHUA) Y PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA TROMBÓTICA (PTT), Y MÉTODOS TERAPÉUTICOS QUE USAN AGENTES INHIBIDORES DE MASP-2

Descripción general

La microangiopatía trombótica (TMA) es una patología por coágulos de sangre en vasos sanguíneos pequeños (Benz, K.; et al., *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19(3):242-7 (2010)). Se cree que una de las principales causas es el estrés o una lesión en el endotelio vascular subyacente. Los hallazgos clínicos y de laboratorio de la TMA incluyen trombocitopenia, anemia, púrpura e insuficiencia renal. Las TMA clásicas son el síndrome hemolítico urémico (SHU) y la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT). El rasgo patológico subyacente característico de las TMA son la activación de plaquetas y la formación de microtrombos en las arteriolas y vénulas pequeñas.

Se proporcionan pruebas directas del papel patológico del complemento en una serie de nefritis por estudios de pacientes con deficiencias genéticas en componentes de complemento específicos. Una serie de estudios han documentado la asociación de la lesión renal con deficiencias del factor H regulador del complemento (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 de factor H d como resultado bajos niveles plasmáticos de factor B y C3 debido al consumo relacionado con la activación de estos componentes. Los niveles circulantes de C5b-9 también se encuentran elevados en el suero de estos pacientes, lo que implica activación del complemento. La glomerulonefritis membranoproliferativa atípica (MPGN) y el síndrome hemolítico urémico (SHU) se encuentran asociados con una deficiencia de factor H. Los cerdos deficientes para factor H (Jansen, J.H., et al., *Kidney Int. 53*:331-49, 1998) y los ratones con supresión génica de factor H (Pickering, M.C., 2002) muestran síntomas similares a MPGN, que confirman la importancia del factor H en la regulación del complemento. Las deficiencias de otros componentes del complemento se asocian con la enfermedad renal, secundaria al desarrollo de lupus eritematoso sistémico (LES) (Walport, M.J., Davies, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci. 815*:267-81, 1997). La deficiencia de C1q, C4 y C2 causa una fuerte predisposición al desarrollo de LES por mecanismos relacionados con una eliminación defectuosa de inmunocomplejos y material apoptótico. En muchos de estos pacientes de LES se produce nefritis lúpica, caracterizada por la deposición de complejos inmunes por todos los glomérulos.

SHUa

El síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa) forma parte de un grupo de afecciones denominadas "microangiopatías trombóticas". En la forma atípica del SHU (SHUa), la enfermedad se asocia con una regulación defectuosa del complemento y puede ser esporádica o familiar. Los casos familiares de SHUa se asocian con mutaciones en genes que codifican proteínas de activación del complemento o reguladoras del complemento, incluyendo factor de complemento H, factor I, factor B, cofactor de membrana CD46, así como la proteína 1 relacionada con el factor de complemento H (CFHR1) y la proteína 3 relacionada con el factor de complemento H (CFHR3). (Zipfel, P.F., et al., *PloS Genetics 3*(3):e41 (2007)). El rasgo unificador de esta diversa serie de mutaciones genéticas asociadas con el SHUa es una predisposición a una mayor activación del complemento en las superficies celulares o tisulares. Por lo tanto, un aspecto de la presente divulgación comprende tratar a un paciente que padece SHUa que está asociado con una deficiencia de factor H mediante la administración de una cantidad eficaz de un agente inhibidor de MASP-2. Otro aspecto de la presente divulgación comprende tratar a un paciente que padece SHU que está asociado con una deficiencia de factor I, factor B, cofactor de membrana CD46, CFHR1 o CFHR3 mediante la administración de una cantidad eficaz de un agente inhibidor de MASP-2.

Se ha efectuado un progreso significativo hacia la comprensión de la patofisiología subyacente al aumento de activación del complemento en el SHUa provocado por el conjunto diverso de factores de complemento mutantes. Este mecanismo se entiende mejor para las mutaciones del factor H. El factor H es una proteína sérica abundante que comprende 20 dominios de repetición consenso corta (SCR) que actúa como regulador negativo de la activación del complemento tanto en solución como en las superficies de células hospedadoras. Se dirige a la forma activada de C3 y, junto con el factor I y otros cofactores, promueve su inactivación, previniendo la activación adicional del complemento. Para controlar de manera eficaz la activación del complemento en las superficies de células hospedadoras, el factor H necesita interactuar con células hospedadoras, lo que está mediado por los dominios SCR 16-20. Todas las mutaciones del factor H asociadas con el SHUa descritas hasta la fecha se agrupan en la región C-terminal que abarca los dominios (SCR) 16-20. Estas proteínas de factor H mutantes son completamente funcionales para controlar la activación de C3 en solución, pero son incapaces de interactuar con superficies de las células hospedadoras y por consiguiente, no pueden controlar la activación de C3 en las superficies celulares (Exp Med 204(6):1249-56 (2007)). Por lo tanto, ciertas mutaciones del factor H se asocian con el SHUa debido a que la proteína de factor H mutante no logra interactuar con las superficies de la célula hospedadora y por lo tanto, no puede modular negativamente de manera eficaz la activación del complemento en las superficies de la célula hospedadora, incluyendo el endotelio microvascular. Como resultado, una vez que se ha producido la activación inicial de C3, la posterior activación del complemento en las superficies endoteliales microvasculares se produce sin freno en pacientes con mutaciones en el factor H. Esta activación no controlada del complemento ocasiona, en última instancia, una lesión progresiva en el endotelio vascular, la posterior agregación de plaquetas y coagulación microvascular y hemólisis causada por el estrés de cizalladura del pase de los GRS a través de los microvasos parcialmente obstruidos. Por lo tanto, las manifestaciones patológicas de la SHUa y los hallazgos clínicos y de laboratorio están vinculados directamente con un defecto en la regulación negativa del complemento en la superficie del endotelio microvascular.

De manera análoga a la mutación del factor H, las mutaciones de pérdida de función en los moduladores negativos del complemento, el factor I y la proteína de cofactor de membrana (CD46) también están vinculadas con la SHUa. Se ha observado lo contrario para el factor B y la proteína C3, ya que se observó que el SHUa estaba asociado con mutaciones de ganancia de función en estas proteínas (Pediatr Nephrol 25(12):2431-42 (2010)). Por lo tanto, una gran cantidad de datos convergentes implican la activación del complemento en la patogénesis del SHUa. Esta noción se ve soportada de manera más convincente por la eficacia terapéutica de ofeculizumab, un anticuerpo monoclonal que bloquea la proteína de complemento terminal C5 en el tratamiento del SHUa.

Aunque se ha aceptado ampliamente el papel central del complemento como mecanismo efector el en SHUa, los desencadenantes que inician la activación del complemento y las vías moleculares se encuentran sin resolver. No todos los individuos que portan las mutaciones anteriormente descritas desarrollan SHUa. De hecho, estudios familiares han sugerido que la penetración del SHUa es tan solo de ~50% (Ann Hum Genet 74(1):17-26 (2010)). La historia natural de la enfermedad sugiere que el SHUa se desarrolla con más frecuencia después de un evento

desencadenante, tal como un episodio infeccioso o una lesión. Es de sobra conocido que los agentes infecciosos activan el sistema de complemento. En ausencia de una inmunidad adaptativa preexistente, la activación del complemento mediante agentes infecciosos puede iniciarse principalmente por la vía de lectina. Por lo tanto, la activación de la vía de lectina desencadenada por una infección puede representar el desencadenante inicial para la posterior amplificación patológica de la activación del complemento en individuos con predisposición al SHUa, que en última instancia puede ocasionar la progresión de la enfermedad. Por consiguiente, otro aspecto de la presente divulgación comprende tratar a un paciente que padece SHUa secundario a una infección mediante la administración de una cantidad eficaz de un agente inhibidor de MASP-2.

Otras formas de lesión al tejido del hospedador activarán el complemento mediante la vía de lectina, en particular, lesión al endotelio vascular. Las células endoteliales vasculares humanas sometidas a estrés oxidativo responden, por ejemplo, expresando restos de superficie que se unen a las lectinas y activan la vía de lectina del complemento (Am J. Pathol 156(6):1549-56 (2000)). La lesión vascular después de isquemia/reperfusión también activa el complemento por la vía de lectina *in vivo* (Scand J Immunol 61(5):426-34 (2005)). La activación de la vía de lectina en esta situación tiene consecuencias patológicas para el hospedador y la inhibición de la vía de lectina mediante el bloqueo de MASP-2 previene una mayor lesión del tejido del hospedador y resultados adversos (Schwaeble PNAS 2011).

Por lo tanto, se sabe que otros procesos que precipitan el SHUa también activan la vía de lectina del complemento. Por lo tanto, es probable que la vía de lectina pueda representar el mecanismo activador del complemento inicial que se amplifica de manera inadecuada de un modo desregulado en individuos predispuestos genéticamente al SHUa, iniciando de este modo la patogénesis del SHUa. Por inferencia, los agentes que bloquean la activación del complemento por la vía de lectina, incluyendo anticuerpos anti-MASP-2, es probable que prevengan la progresión de la enfermedad o reduzcan las exacerbaciones en individuos susceptibles al SHUa.

Para respaldar aún más este concepto, estudios recientes han identificado el *S. pneumoniae* como un agente etiológico importante en los casos pediátricos de SHUa. (Nephrology (Carlton), 17:48-52 (2012); Pediatr Infect Dis J. 30(9):736-9 (2011)). Esta etiología particular parece tener un pronóstico desfavorable, con una mortalidad y morbilidad a largo plazo significativas. De manera destacable, estos casos implicaron infecciones no entéricas que ocasionaron manifestaciones de microangiopatía, uremia y hemólisis sin pruebas de mutaciones concurrentes en los genes del complemento que se sepa que predisponen al SHUa. Cabe destacar que *S. pneumoniae* es particularmente eficaz para activar el complemento y lo hace predominantemente a través de la vía de lectina. Por lo tanto, en los casos de SHU no entérico asociado con infección neumocócica, se espera que las manifestaciones de microagiopatía, uremia y hemólisis estén impulsadas predominantemente por la activación de la vía de lectina y los agentes que bloquean la vía de lectina, incluyendo anticuerpos anti-MASP-2, tienen posibilidades de prevenir la progresión del SHUa o de reducir la gravedad de la enfermedad en estos pacientes. Por consiguiente, otro aspecto de la presente divulgación comprende tratar a un paciente que padece SHUa no entérico que está asociado con una infección por *S. pneumoniae* mediante la administración de una cantidad eficaz de un agente inhibidor de MASP-2.

De acuerdo con lo anterior, en algunos casos, en el caso de un sujeto en riesgo de desarrollar fallo renal asociado con el SHUa, se proporciona un método para reducir las probabilidades de desarrollar SHUa o de desarrollar fallo renal asociado con el SHUa, que comprende administrar una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 durante un periodo de tiempo eficaz para mejorar o prevenir el fallo renal en el sujeto. En algunos casos, el método comprende además la etapa de determinar si un sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar SHUa antes de la aparición de cualquier síntoma asociado con el SHUa. En otros casos, el método comprende determinar si un sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar SHUa tras el inicio de al menos uno o más síntomas que indiquen SHUa (por ejemplo, la presencia de anemia, trombocitopenia y/o insuficiencia renal) y/o la presencia de microangiopatía trombótica en una biopsia obtenida del sujeto. La determinación de si un sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar SHUa comprende determinar si el sujeto tiene una predisposición genética a desarrollar SHUa, que puede llevarse a cabo evaluando información genética (por ejemplo, de una base de datos que contiene el genotipo del sujeto) o llevando a cabo al menos una prueba de exploración genética en el sujeto para determinar la presencia o ausencia de un marcador genético asociado con el SHUa (es decir, determinar la presencia o ausencia de una mutación genética asociada con el SHUa en los genes que codifican el factor H de complemento (CFH), factor I (CFI), factor B (CFB), cofactor de membrana CD46, C3, la proteína 1 relacionada con el factor H de complemento (CFHR1) o THBD (que codifica la proteína anticoagulante, trombodulina) o la proteína 3 relacionada con el factor H de complemento (CFHR3) o la proteína 4 relacionada con el factor H de complemento (CFHR4) ya sea mediante secuenciación genómica o análisis de genes específicos (por ejemplo, análisis por la PCR) y/o determinar si el sujeto tiene historial familiar de SHUa. Están bien establecidos los métodos de exploración genética respecto de la presencia o ausencia de una mutación genética asociada con el SHUa, por ejemplo, véase Noris M et al. "Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome," 16 de noviembre de 2007 [actualizado el 10 de marzo de 2011], en: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editores. GeneReviews™, Seattle (WA): University of Washington, Seattle.

Por ejemplo, en general, la penetración de la enfermedad en sujetos con mutaciones del factor H de complemento (CFH) es del 48% y la penetración para mutaciones en CD46 es del 53%, para mutaciones en CFI es del 50%, para mutaciones en C3 es del 56% y para mutaciones en THBD es del 64% (Caprioli J. et al., Blood, 108:1267-79 (2006); Noris et al., Clin J Am Soc Nephrol 5:1844-59 (2010)). Como se describe en Caprioli et al., (2006), citado anteriormente, un número importante de sujetos con una mutación en el factor H de complemento (CFH) nunca

desarrollan SHUa y se supone que en estos individuos es suficiente una actividad subóptima del CFH para proteger al hospedador contra los efectos de la activación del complemento en condiciones fisiológicas, sin embargo, la actividad subóptima de CFH no es suficiente para impedir la deposición de C3b sobre células endoteliales vasculares cuando la exposición a un agente que activa el complemento produce cantidades por encima de lo normal de C3b. Por consiguiente, en un caso, se proporciona un método para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece o que está en riesgo de desarrollar síndrome hemolítico urémico atípico no dependiente de factor H, que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2. En otro caso, se proporciona un método para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que está en riesgo de desarrollar síndrome hemolítico urémico atípico dependiente de factor H, que comprende monitorizar periódicamente al sujeto para determinar la presencia o ausencia de anemia, trombocitopenia o aumento de la creatinina y tratar con un agente inhibidor de MASP-2 cuando se determine la presencia de anemia, trombocitopenia o aumento de la creatinina. En otro caso, se proporciona un método para reducir las probabilidades de que un sujeto en riesgo de desarrollar SHUa dependiente de factor H sufra síntomas clínicos asociados con el SHUa, que comprende administrar un agente inhibidor de MASP-2 antes de o durante o después de un evento que se sabe que está asociado con el desarrollo de síntomas clínicos del SHUa, por ejemplo, exposición a fármacos (por ejemplo, quimioterapia), infección (por ejemplo, infección bacteriana), neoplasia maligna, una lesión, trasplante de órganos o tejidos o embarazo.

En un caso, se proporciona un método para reducir las probabilidades de que un sujeto en riesgo de desarrollar SHUa sufra síntomas clínicos asociados con el SHUa, que comprende monitorizar periódicamente al sujeto para determinar la presencia o ausencia de anemia, trombocitopenia o aumento de la creatinina y tratar con un agente inhibidor de MASP-2 cuando se determine la presencia de anemia, trombocitopenia o aumento de la creatinina.

En otro caso, se proporciona un método para reducir las probabilidades de que un sujeto en riesgo de desarrollar SHUa sufra síntomas clínicos asociados con el SHUa que comprende administrar un agente inhibidor de MASP-2 antes de o durante o después de un evento que se sabe que está asociado con el desarrollo de síntomas clínicos del SHUa, por ejemplo, exposición a fármacos (por ejemplo, quimioterapia), infección (por ejemplo, infección bacteriana), neoplasia maligna, una lesión, trasplante de órganos o tejidos o embarazo.

En algunos casos, el agente inhibidor de MASP-2 se administra durante un periodo de tiempo de al menos uno, dos, tres, cuatro días o más, antes, durante o después del evento asociado con el desencadenamiento de los síntomas clínicos del SHUa y puede repetirse según determine un médico hasta que se haya resuelto o controlado la afección. En una situación previa al SHUa, el agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto por vía sistémica, tal como por vía intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra administración parenteral.

En algunos casos, en la situación del diagnóstico inicial de SHUa o en un sujeto que muestra uno o más síntomas coherentes con un diagnóstico de SHUa (por ejemplo, presencia de anemia, trombocitopenia y/o insuficiencia renal), se trata al sujeto con una cantidad eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-MASP-2) como terapia de primera línea en ausencia de plasmaféresis o en combinación con plasmaféresis. Como terapia de primera línea, el agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto por vía sistémica, tal como por vía intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra administración parenteral. En algunos casos, el agente inhibidor de MASP-2 se administra a un sujeto como terapia de primera línea en ausencia de plasmaféresis para evitar las potenciales complicaciones de la plasmaféresis, incluyendo hemorragias, infección y exposición a trastornos y/o alergias inherentes en el plasma donante o en un sujeto por lo demás adverso a la plasmaféresis o en una situación donde no hay disponibilidad para efectuar la plasmaféresis.

En algunos casos, el método comprende administrar un agente inhibidor de MASP-2 a un sujeto que padece SHUa a través de un catéter (por ejemplo, por vía intravenosa) durante un primer periodo de tiempo (por ejemplo, de al menos un día hasta una semana o dos semanas) seguido de la administración de un agente inhibidor de MASP-2 al sujeto por vía subcutánea durante un segundo periodo de tiempo (por ejemplo, una fase crónica de al menos dos semanas o más). En algunos casos, la administración en el primer y/o el segundo periodo de tiempo se produce en ausencia de plasmaféresis. En algunos casos, el método comprende además determinar el nivel de al menos un factor de complemento (por ejemplo, C3, C5) en el sujeto antes del tratamiento y opcionalmente, durante el tratamiento, en donde la determinación de un nivel reducido de al menos un factor de complemento en comparación con un valor de referencia o un sujeto de control sano es indicativo de la necesidad de un tratamiento continuado con el agente inhibidor de MASP-2.

En algunos casos, el método comprende administrar un agente inhibidor de MASP-2, tal como un anticuerpo anti-MASP-2, a un sujeto que padece o que se encuentra en riesgo de desarrollar, SHUa ya sea por vía intravenosa, intramuscular o preferentemente, subcutánea. El tratamiento puede ser crónico y administrarse desde a diario hasta mensualmente, pero preferentemente, cada dos semanas. El anticuerpo anti-MASP-2 puede administrarse solo o en combinación con un inhibidor de C5, tal como eculizumab.

SHU

Al igual que el SHU atípico, la forma típica del SHU presenta todos los hallazgos clínicos y de laboratorio de un TMA.

El SHU típico, sin embargo, normalmente es una enfermedad pediátrica y con frecuencia no tiene un componente familiar o una asociación directa con mutaciones en los genes del complemento. La etiología del SHU típico está estrechamente vinculada con la infección por ciertos patógenos intestinales. Los pacientes presentan típicamente fallo renal agudo, hemoglobinuria y trombocitopenia, que normalmente es secundaria a un episodio de diarrea sanguinolenta. La afección está causada por una infección entérica con *Shigella dissenteria, Salmonella* o cepas enterohemorrágicas productoras de toxina similar a shiga de *E. coli,* tales como *E. coli* O157:H7. Los patógenos son adquiridos de alimentos o fuentes de agua contaminados. El SHU es una emergencia médica e implica una mortalidad de un 5-10%. Una parte significativa de los supervivientes desarrollan enfermedad renal crónica (Corrigan y Boineau, *Pediatr Rev* 22 (11): 365-9 (2011)) y pueden requerir un trasplante de riñón.

La coagulación microvascular en el SHU típico se produce de manera predominante, pero no exclusiva, en la microvasculatura renal. La fisiopatología subyacente está mediada por la toxina Shiga (STX). Excretada por microbios enteropáticos en el lumen intestinal, la STX atraviesa la barrera intestinal, entra en el torrente sanguíneo y se une a las células endoteliales vasculares a través del receptor de blobotriaosil ceramida, CD77 (Boyd y Lingwood *Nephron* 51:207 (1989)), que se expresa preferencialmente en el endotelio glomerular y media el efecto tóxico de STX. Una vez unida al endotelio, STX induce una serie de eventos que dañan el endotelio vascular, activan los leucocitos y provocan la formación de trombos dependiente de vWF (Forsyth et al., *Lancet* 2: 411-414 (1989); Zoja et al., *Kidney Int.* 62: 846-856 (2002); Zanchi et al., *J. Immunol.* 181:1460-1469 (2008); Morigi et al., *Blood* 98: 1828-1835 (2001); Guessou et al., *Infect. Immun.,* 73: 8306-8316 (2005)). Estos microtrombos obstruyen u ocluyen las arteriolas y los capilares del riñón y otros órganos. La obstrucción del flujo sanguíneo en las arteriolas y los capilares a causa de los microtrombos aumenta la fuerza de cizalladura aplicada a los GRS a medida que atraviesan con dificultad los vasos sanguíneos estrechados. Esto puede dar como resultado la destrucción de los GRS por fuerza de cizalladura y la formación de fragmentos de GRS denominados esquistocitos. La presencia de esquistocitos es un hallazgo característico del SHU. Este mecanismo se conoce como hemólisis microangiopática. Además, la obstrucción del flujo sanguíneo ocasiona isquemia, que inicia una respuesta inflamatoria mediada por complemento que provoca más daño al órgano afectado.

La vía de lectina del complemento contribuye a la patogénesis del SHU mediante dos mecanismos principales: 1) activación directa mediada por MASP-2 de la cascada de coagulación causada por lesión endotelial y 2) posterior activación del complemento mediada por lectina inducida por la isquemia ocasionada por la oclusión inicial del flujo sanguíneo microvascular.

STX lesiona a las células endoteliales microvasculares y se sabe que estas células endoteliales lesionadas activan el sistema de complemento. Como se ha detallado anteriormente, la activación del complemento después de una lesión de las células endoteliales está dirigida predominantemente por la vía de lectina. Las células endoteliales vasculares humanas sometidas a estrés oxidativo responden expresando restos de superficie que se unen a las lectinas y activan la vía de lectina del complemento (Collard et al., *Am J Pathol.* 156(5):1549-56 (2000)). La lesión vascular después de isquemia/reperfusión también activa el complemento por la vía de lectina *in vivo* (Scand J Immunol 61(5):426-34 (2005)). La activación de la vía de lectina en esta situación tiene consecuencias patológicas para el hospedador y la inhibición de la vía de lectina mediante el bloqueo de MASP-2 previene una mayor lesión del tejido del hospedador y resultados adversos (Schwaeble et al., *PNAS* (2011)). Además de la activación del complemento, se ha demostrado que la activación dependiente de lectina de MASP-2 da como resultado la escisión de la protrombina para formar trombina y promover la coagulación. Por lo tanto, la activación de la vía de lectina del complemento por células endoteliales lesionadas puede activar directamente el sistema de coagulación. La vía de lectina del complemento, gracias a la activación de protrombina mediada por MASP-2, es por tanto probablemente la vía molecular dominante que vincula la lesión endotelial inicial por STX con la coagulación y la trombosis microvascular que se produce en el SHU. Por lo tanto, se espera que los inhibidores de la vía de lectina, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos que bloquean la función de MASP-2, prevendrán o mitigarán la coagulación microvascular, la trombosis y la hemólisis en pacientes que padecen SHU. De hecho, la administración de anticuerpo anti-MASP-2 protege en gran medida a los ratones en un modelo de SHU típico. Como se describe en el ejemplo 36 y se muestra en la FIGURA 45, todos los ratones de control expuestos a XTX y LPS desarrollaron SHU grave y estaban moribundos o muertos a las 48 horas. Por otra parte, como se demuestra además en la FIGURA 45, todos los ratones tratados con un anticuerpo anti-MASP-2 y después expuestos a STX y LPS sobrevivieron ($p<0,01$ en la prueba exacta de Fisher; N=5). Por lo tanto, la terapia anti-MASP-2 protege en gran medida a los ratones en este modelo de SHU. Se espera que la administración de un agente inhibidor de MASP-2, tal como un anticuerpo contra MASP-2, será eficaz en el tratamiento de pacientes con SHU y proporcionará protección frente a la coagulación microvascular, la trombosis y la hemólisis causadas por infección por *E. coli* enteropática u otros patógenos que producen STX.

Aunque en este caso se muestra para SHU causado por STX, se espera que el tratamiento anti-MASP-2 también será beneficioso para síndromes similares al SHU debidos a una lesión endotelial causada por otros agentes tóxicos. Esto incluye agentes tales como mitomicina, ticlopidina, cisplatino, quinina, ciclosporina, bleomicina, así como otros fármacos quimioterapéuticos y fármacos inmunodepresores. Por lo tanto, se espera que el tratamiento con anticuerpo anti-MASP-2 u otras modalidades que inhiban la actividad de MASP-2, prevendrán de manera eficaz o limitarán la coagulación, la formación de trombos y la destrucción de GRS y prevendrán el fallo renal en el SHU y otras enfermedades relacionadas con la TMA (es decir, SHUa y PTT).

Los pacientes que padecen SHU normalmente presentan diarrea y vómitos, sus recuentos de plaquetas se encuentran normalmente reducidos (trombocitopenia) y hay reducción de GRS (anemia). La fase de diarrea previa al SHU dura normalmente cuatro días, durante los cuales los sujetos en riesgo de desarrollar SHU muestran normalmente uno o más de los siguientes síntomas, además de la diarrea grave: un nivel de hematocrito inferior al 30% con indicios mediante frotis de destrucción intravascular de eritrocitos, trombocitopenia (recuento de plaquetas <150 x 10^3/mm^3) y/o la presencia de deterioro de la función renal (concentración sérica de creatinina mayor del límite superior del intervalo de referencia para la edad). La presencia de oligoanuria (producción de orina ≤0,5 ml/kg/h durante >1 día) puede usarse como medida de la progresión hacia el desarrollo de SHU (véase C. Hickey et al., *Arch Pediatr Adolesc Med* 165(10):884-889 (2011)). Normalmente se llevan a cabo pruebas para detectar la presencia de infección por bacterias *E. coli* (*E. coli* O157:H7) o de especies de *Shigella* o *Salmonella*. En un sujeto que dé positivo en la prueba para infección por *E. coli* enterogénica (por ejemplo, *E. coli* 0157:H7), está contraindicado el uso de antibióticos ya que su uso puede aumentar el riesgo de desarrollar SHU por un aumento de la producción de STX (véase Wong C. et al., *N Engl J. Med* 342:1930-1936 (2000). Para sujetos que den positivo en las pruebas para *Shigella* o *Salmonella,* normalmente se administran antibióticos para eliminar la infección. Otra terapia de primera línea bien establecida para el SHU incluye expansión de volumen, diálisis y plasmaféresis.

De acuerdo con lo anterior, en algunos casos, en la situación de un sujeto que padece uno o más síntomas asociados con una fase previa al SHU y en riesgo de desarrollar SHU (es decir, el sujeto muestra uno o más de los siguientes: diarrea, un nivel de hematocrito inferior al 30% con indicios mediante frotis de destrucción intravascular de eritrocitos, trombocitopenia (recuento de plaquetas menor de 150 x 10^3/mm^3) y/o la presencia de deterioro de la función renal (concentración sérica de creatinina mayor del límite superior del intervalo de referencia para la edad), se proporciona un método para reducir el riesgo de desarrollar SHU o para reducir la probabilidad de fallo renal en el sujeto, que comprende administrar una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 durante un periodo de tiempo eficaz para mejorar o prevenir el deterioro de la función renal. En algunos casos, el agente inhibidor de MASP-2 se administra durante un periodo de tiempo de al menos uno, dos, tres, cuatro o más días y puede repetirse según lo determine un médico hasta que se haya resuelto o controlado la afección. En una situación previa al SHU, el agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto por vía sistémica, tal como por vía intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, oral, subcutánea u otra administración parenteral.

El tratamiento de la infección por *E. coli* 0157:H7 con antibióticos bactericidas, en particular β-lactamas, se ha asociado con un riesgo aumentado de desarrollar SHU (Smith et al., *Pediatr Infect Dis J* 31(1):37-41 (2012). En algunos casos, en una situación de un sujeto que padece síntomas asociados con una fase previa al SHU, en donde se sabe que el sujeto tiene una infección por *E. coli* enterogénica para la que está contraindicado el uso de antibióticos (por ejemplo, *E. coli* 0157:H7), se proporciona un método para reducir el riesgo de desarrollar SHU o para reducir la probabilidad de fallo renal en el sujeto, que comprende administrar una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 durante un primer periodo de tiempo eficaz para inhibir o prevenir la presencia de oligoanuria en el sujeto (por ejemplo, al menos uno, dos, tres o cuatro días), en donde la administración del agente inhibidor de MASP-2 durante el primer periodo de tiempo se produce en ausencia de un antibiótico. En algunos casos, el método comprende además administrar el agente inhibidor de MASP-2 al sujeto en combinación con un antibiótico durante un segundo periodo de tiempo (tal como al menos de una a dos semanas).

En otros casos, en una situación de un sujeto que padece síntomas asociados con una fase previa al SHU, en donde se sabe que el sujeto tienen una infección por *Shigella* o *Salmonella,* se proporciona un método para reducir el riesgo de desarrollar SHU o para reducir la probabilidad de fallo renal en el sujeto, que comprende administrar una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 y durante un periodo de tiempo eficaz para inhibir o prevenir la presencia de oligoanuria en el sujeto, en donde la administración del agente inhibidor de MASP-2 se produce en presencia o en ausencia de un antibiótico adecuado.

En algunos casos, en una situación de un diagnóstico inicial de SHU o en un sujeto que muestra uno o más síntomas coherentes con un diagnóstico de SHU (por ejemplo, la presencia de fallo renal o de anemia hemolítica microangiopática en ausencia de bajo fibrinógeno o trombocitopenia) se trata al sujeto con una cantidad eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-MASP-2) como terapia de primera línea en ausencia de plasmaféresis o en combinación con plasmaféresis. Como terapia de primera línea, el agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto por vía sistémica, tal como por vía intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra administración parenteral. En algunos casos, el agente inhibidor de MASP-2 se administra a un sujeto como terapia de primera línea en ausencia de plasmaféresis para evitar las complicaciones de la plasmaféresis, tales como hemorragia, infección y exposición a trastornos y/o alergias inherentes en el plasma donante o en un sujeto por lo demás adverso a la plasmaféresis o en una situación donde no hay disponibilidad para efectuar la plasmaféresis.

En algunos casos, el método comprende administrar un agente inhibidor de MASP-2 a un sujeto que padece SHU a través de un catéter (por ejemplo, por vía intravenosa) durante un primer periodo de tiempo (por ejemplo, una fase aguda que dura al menos un día hasta una semana o dos semanas) seguido de la administración de un agente inhibidor de MASP-2 al sujeto por vía subcutánea durante un segundo periodo de tiempo (por ejemplo, una fase crónica de al menos dos semanas o más). En algunos casos, la administración en el primer y/o el segundo periodo de tiempo se produce en ausencia de plasmaféresis. En algunos casos, el método comprende además determinar el nivel de al menos un factor de complemento (por ejemplo, C3, C5) en el sujeto antes del tratamiento y

opcionalmente, durante el tratamiento, en donde la determinación de un nivel reducido de al menos un factor de complemento en comparación con un valor de referencia o un sujeto de control sano es indicativo de la necesidad de un tratamiento y en donde la determinación de un nivel normal es indicativa de mejora.

En algunos casos, el método comprende administrar un agente inhibidor de MASP-2, tal como un anticuerpo anti-MASP-2, a un sujeto que padece o que se encuentra en riesgo de desarrollar, SHU ya sea por vía subcutánea o intravenosa. El tratamiento es preferentemente diario, pero puede ser tan infrecuente como semanal o mensualmente. El tratamiento continuará durante al menos una semana y hasta 3 meses. El anticuerpo anti-MASP-2 puede administrarse solo o en combinación con un inhibidor de C5, tal como eculizumab.

PTT:

La púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) es un trastorno potencialmente letal del sistema de coagulación de la sangre, provocado por disfunciones autoinmunitarias o hereditarias que activan la cascada de coagulación o el sistema de complemento (George, JN, *N Engl J Med;* 354:1927-35 (2006)). Esto da como resultado numerosos coágulos o trombos microscópicos, en vasos sanguíneos pequeños por todo el organismo. Los glóbulos rojos de la sangre sufren estrés de cizalladura que daña sus membranas, provocando hemólisis intravascular. El flujo sanguíneo reducido resultante y la lesión endotelial da como resultado daño orgánico, incluyendo el cerebro, corazón y riñones. La PTT se caracteriza clínicamente por trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática, cambios neurológicos, fallo renal y fiebre. En la era antes del intercambio de plasma, la tasa de fatalidades era del 90% durante los episodios agudos. Incluso con el intercambio de plasma, la supervivencia a los seis meses es de aproximadamente el 80%.

La PTT puede surgir por la inhibición genética o adquirida de la enzima ADAMTS-13, una metaloproteasa responsable de escindir grandes multímeros de factor de von Willebrand (vWF) en unidades más pequeñas. La inhibición o deficiencia de ADAMTS-13 da como resultado, en última instancia, un aumento de la coagulación (Tsai, H. *J Am Soc Nephrol* 14: 1072-1081, (2003)). ADAMTS-13 regula la actividad del vWF; en su ausencia, el vWF forma grandes multímeros que tienen más probabilidad de unirse a plaquetas y predispone a los pacientes a la agregación plaquetaria y la trombosis en la microvasculatura.

Se han identificado numerosas mutaciones en ADAMTS13 en individuos con PTT. La enfermedad también puede desarrollarse debido a anticuerpos contra ADAMTS-13. Además, la PTT también puede desarrollarse durante el cáncer de mama, tracto gastrointestinal o próstata (George JN., *Oncology* (Williston Park). 25:908-14 (2011)), el embarazo (segundo trimestre o postparto), George JN., *Curr Opin Hematol* 10:339-344 (2003)) o se asocia con enfermedades, tales como el VIH o enfermedades autoinmunitarias, tales como lupus eritematoso sistémico (Hamasaki K, et al., *Clin Rheumatol.*22:355-8 (2003)). La PTT también puede estar causada por ciertas terapias farmacológicas, incluyendo heparina, quinina, ingredientes inmunomediados, agentes quimioterapéuticos para el cáncer (bleomicina, cisplatino, arabinósido de citosina, daunomicina, gemcitabina, mitomicina C y tamoxifeno), ciclosporina A, anticonceptivos orales, penicilina, rifampicina y fármacos antiplaquetarios, incluyendo ticlopidina y clopidogrel (Azarm, T. et al., *J Res Med Sci.,* 16: 353-357 (2011)). Otros factores o afecciones asociados con la PTT son toxinas, tales como venenos de abeja, septicemia, secuestro esplénico, trasplante, vasculitis, cirugía vascular e infecciones, tales como neumonía por *Streptococcus* y citomegalovirus (Moake JL., *N Engl J Med.,* 347:589-600 (2002)). Puede producirse PTT a causa de una deficiencia funcional transitoria de ADAMTS-13 como consecuencia de la lesión de células endoteliales asociada con una infección por *S. pneumoniae* (*Pediatr Nephrol.,* 26:631-5 (2011)).

El intercambio de plasma es el tratamiento convencional para la PTT (Rock GA, et al., *N Engl J Med* 325:393-397 (1991)). El intercambio de plasma reemplaza la actividad de ADAMTS-13 en pacientes con defectos genéticos y elimina los autoanticuerpos para ADAMTS-13 en aquellos pacientes con PTT autoinmunitaria adquirida (Tsai, H-M, *Hematol Oncol Clin North Am.,* 21(4): 609-v (2007)). Normalmente se añaden a la terapia agentes adicionales, tales como fármacos inmunosupresores (George, IN, *N Engl J Med,* 354:1927-35 (2006)). Sin embargo, el intercambio de plasma no tiene éxito para aproximadamente un 20% de los pacientes, se produce una recidiva en más de un tercio de los pacientes y la plasmaféresis es costosa y técnicamente compleja. Además, muchos pacientes no pueden tolerar el intercambio de plasma. Por consiguiente, sigue habiendo una necesidad crítica de tratamientos adicionales y mejores para la PTT.

Debido a que la PTT es un trastorno de la cascada de coagulación sanguínea, el tratamiento con antagonistas del sistema de complemento puede ayudar a estabilizar y corregir la enfermedad. Aunque la activación patológica de la vía de complemento alternativa está vinculada con la SHUa, el papel de la activación de complemento es menos claro. La deficiencia funcional de ADAMTS13 es importancia para la susceptibilidad a la PTT, aunque no es suficiente para causar episodios agudos. Los factores ambientales y/u otras variaciones genéticas pueden contribuir a las manifestaciones de la PTT. Por ejemplo, los genes que codifican proteínas implicadas en la regulación de la cascada de coagulación, vWF, función plaquetaria, componentes de la superficie de vasos endoteliales o el sistema de complemento pueden estar implicados en el desarrollo de microangiopatía trombótica aguda (Galbusera, M. et al., *Haematologica,* 94: 166-170 (2009)). En particular, se ha demostrado que la activación de complemento desempeña un papel crucial; se ha demostrado que el suero de la microangiopatía trombótica asociada con la deficiencia de ADAMTS-13 provoca deposición de C3 y MAC y la posterior activación de neutrófilos, que podría

suprimirse por la activación del complemento (Ruiz-Torres MP, et al., *Thromb Haemost,* 93:443-52 (2005)). Además, se ha demostrado recientemente que durante los episodios agudos de PTT hay niveles aumentados de C4d, C3bBbP y C3a (M. Réti et al., *J Thromb Haemost.* 28 de febrero (2012) doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04674.x. [Publicación electrónica antes de imprenta]), coherentes con la activación de las vías clásica/de lectina y alternativa. Esta cantidad aumentada de activación de complemento en los episodios agudos puede iniciar la activación de la vía terminal y ser responsable de la exacerbación adicional de la PTT.

El papel de ADAMTS-13 y vWF en la PTT es claramente responsable de la activación y la agregación de plaquetas y su posterior papel en el estrés de cizalladura y deposición en microangiopatías. Las plaquetas activadas interactúan con y desencadenan las vías tanto clásica como alternativa del complemento. La activación del complemento mediada por plaquetas aumenta los mediadores inflamatorios C3a y C5a (Peerschke E et al., *Mol Immunol,* 47:2170-5 (2010)). Por lo tanto, las plaquetas pueden servir como dianas de la activación de complemento clásica en la PTT heredada o autoinmunitaria.

Como se ha descrito anteriormente, la vía de lectina del complemento, gracias a la activación de protrombina mediada por MASP-2, es la vía molecular dominante que vincula la lesión endotelial con la coagulación y la trombosis microvascular que se produce en el SHU. De forma análoga, la activación de la vía de lectina del complemento puede dirigir directamente el sistema de coagulación en la PTT. La activación de la vía de lectina puede iniciarse en respuesta a la lesión inicial en el endotelio causada por la deficiencia de ADAMTS-13 en la PTT. Por lo tanto, se espera que los inhibidores de la vía de lectina, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos que bloquean la función de MASP-2, mitigarán las microangiopatías asociadas con la coagulación microvascular, la trombosis y la hemólisis en pacientes que padecen PTT.

Los pacientes que padecen PTT acuden normalmente a urgencias con uno o más de los siguientes: púrpura, fallo renal, plaquetas bajas, anemia y/o trombosis, incluyendo accidente cerebrovascular. El tratamiento convencional para la PTT implica el suministro intra catéter (por ejemplo, intravenoso u otra forma de catéter) de plasmaféresis de reemplazo durante un periodo de dos semanas o más, típicamente tres veces a la semana, pero hasta a diario. En caso de que el sujeto tenga un resultado positivo para la presencia de un inhibidor de ADAMTS13 (es decir, un anticuerpo endógeno contra ADAMTS13) puede llevarse a cabo la plasmaféresis en combinación con terapia inmunosupresora (por ejemplo, corticosteroides, rituxán o ciclosporina). Los sujetos con PTT refractaria (aproximadamente un 20% de los pacientes de PTT) no responden a al menos dos semanas de terapia con plasmaféresis.

De acuerdo con lo anterior, en un caso, en la situación de un diagnóstico inicial de PTT o en un sujeto que muestra uno o más síntomas coherentes con un diagnóstico de PTT (por ejemplo, implicación del sistema nervioso central, trombocitopenia grave (un recuento de plaquetas menor o igual a 5000/µl en caso de no estar en tratamiento con aspirina, menor o igual a 20.000/µl en caso de estar en tratamiento con aspirina), implicación cardíaca grave, implicación pulmonar grave, infarto gastrointestinal o gangrena), se proporciona un método para tratar al sujeto con una cantidad eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-MASP-2) como terapia de primera línea en ausencia de plasmaféresis o en combinación con plasmaféresis. Como terapia de primera línea, el agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto por vía sistémica, tal como por vía intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra administración parenteral. En algunos casos, el agente inhibidor de MASP-2 se administra a un sujeto como terapia de primera línea en ausencia de plasmaféresis para evitar las potenciales complicaciones de la plasmaféresis, tales como hemorragia, infección y exposición a trastornos y/o alergias inherentes en el plasma donante o en un sujeto por lo demás adverso a la plasmaféresis o en una situación donde no hay disponibilidad para efectuar la plasmaféresis. En algunos casos, el agente inhibidor de MASP-2 se administra al sujeto que padece PTT en combinación (incluyendo administración conjunta) con un agente inmunosupresor (por ejemplo, corticosteroides, rituxán o ciclosporina) y/o en combinación con ADAMTS-13 concentrada.

En algunos casos, el método comprende administrar un agente inhibidor de MASP-2 a un sujeto que padece PTT a través de un catéter (por ejemplo, por vía intravenosa) durante un primer periodo de tiempo (por ejemplo, una fase aguda que dura al menos un día hasta una semana o dos semanas) seguido de la administración de un agente inhibidor de MASP-2 al sujeto por vía subcutánea durante un segundo periodo de tiempo (por ejemplo, una fase crónica de al menos dos semanas o más). En algunos casos, la administración en el primer y/o el segundo periodo de tiempo se produce en ausencia de plasmaféresis. En algunos casos, el método se usa para mantener al sujeto para prevenir que el sujeto padezca uno o más síntomas asociados con la PTT.

En otro caso, se proporciona un método para tratar a un sujeto que padece PTT refractaria (es decir, un sujeto que no ha respondido a al menos dos semanas de tratamiento por plasmaféresis), mediante la administración de un inhibidor de MASP-2 eficaz para reducir uno o más síntomas de la PTT. En un caso, el inhibidor de MASP-2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-MASP-2) se administra a un sujeto con PTT refractaria de manera crónica, durante un periodo de tiempo de al menos dos semanas o más mediante administración subcutánea u otra administración parenteral. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que se haya resuelto o controlado la afección.

En algunos casos, el método comprende además determinar el nivel de al menos un factor de complemento (por ejemplo, C3, C5) en el sujeto antes del tratamiento y opcionalmente, durante el tratamiento, en donde la determinación de un nivel reducido de el al menos un factor de complemento en comparación con un valor de referencia o un sujeto de control sano es indicativo de la necesidad de un tratamiento continuado con el agente inhibidor de MASP-2.

En algunos casos, el método comprende administrar un agente inhibidor de MASP-2, tal como un anticuerpo anti-MASP-2, a un sujeto que padece o que se encuentra en riesgo de desarrollar, PTT ya sea por vía subcutánea o intravenosa. El tratamiento es preferentemente diario, pero puede ser tan infrecuente como bisemanalmente. Se continúa el tratamiento hasta que el recuento de plaquetas del sujeto es mayor de 150.000/ml durante al menos dos días consecutivos. El anticuerpo anti-MASP-2 puede administrarse solo o en combinación con un inhibidor de C5, tal como eculizumab.

Otro aspecto de la divulgación proporciona métodos para tratar la crioglobulinemia mediante la administración de una composición que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que padece crioglobulinemia o una afección resultante de la crioglobulinemia. La crioglobulinemia se caracteriza por la presencia de crioglobulinas en el suero, que son inmunoglobulinas individuales o mezcladas (normalmente anticuerpos IgM) que sufren agregación reversible a bajas temperaturas. Las afecciones resultantes de la crioglobulinemia incluyen vasculitis, glomerulonefritis e inflamación sistémica. El agente inhibidor de MASP-2 se administra por vía sistémica al sujeto que padece crioglobulinemia o una afección resultante de la crioglobulinemia, tal como por vía intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, subcutánea u otra administración parenteral o potencialmente, mediante administración oral para agentes no peptidérgicos.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar la enfermedad de las crioaglutininas (CAD) mediante la administración de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que padece CAD o una afección resultante de la CAD. La enfermedad de la CAD se manifiesta y puede estar causada por una enfermedad o trastorno subyacente, citada como "CAD secundaria", tal como una enfermedad infecciosa, enfermedad linfoproliferativa o trastorno del tejido conectivo. Estos pacientes desarrollan anticuerpos IgM contra sus glóbulos rojos que desencadenan una reacción de aglutinación a bajas temperaturas. El agente inhibidor de MASP-2 se administra por vía sistémica al sujeto que padece CAD o una afección resultante de la CAD, tal como por vía intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, subcutánea u otra administración parenteral o potencialmente, mediante administración oral para agentes no peptidérgicos.

COAGULOPATÍAS

Se han desarrollado pruebas del papel del sistema de complemento en la coagulación intravascular diseminada ("CID"), tal como CID secundaria a un traumatismo corporal significativo.

Los estudios previos han demostrado que los ratones C4-/- no están protegidos frente a la lesión por reperfusión renal. (Zhou, W., et al, "Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury," *J Clin Invest 105*:1363-1371 (2000)). Para investigar si los ratones C4-/- siguen siendo capaces de activar el complemento mediante la vía clásica o la de lectina, se midió la renovación de C3 en plasma C4-/- en ensayos específicos para la vía de activación de la vía clásica o la de lectina. Aunque no pudo observarse escisión de C3 cuando se desencadenó la activación por la vía clásica, se observó una activación dependiente de la vía de lectina de C3 en suero deficiente para C4 (FIGURA 30). Puede observarse que la deposición de C3b sobre manano y cimosano se ve gravemente comprometida en ratones MASP-2-/-, incluso en condiciones experimentales, que según muchos artículos previamente publicados acerca de la activación de la vía alternativa, deben ser permisivos para las tres vías. Cuando se usa el mismo suero en pocillos recubiertos con complejos de inmunoglobulina en lugar de manano o cimosano, se observa deposición de C3b y escisión de factor B en sueros de ratón MASP-2+/+ y sueros de ratón MASP-2-/-, pero no en sueros empobrecidos para C1q. Esto indica que la activación de la vía alternativa se facilita en sueros MASP-2-/- cuando C3b inicial se produce mediante actividad clásica. La FIGURA 30C ilustra el hallazgo sorprendente de que puede activarse C3 de manera eficaz de un modo dependiente de la vía de lectina en plasma deficiente para C4.

Esta "derivación de C4" se suprime mediante la inhibición de la activación de la vía de lectina mediante preincubación de plasma con manano o manosa soluble.

La activación aberrante no inmunitaria del sistema de complemento es potencialmente perjudicial para el ser humano y también puede desempeñar un papel importante en la activación de la vía hematológica, en particular en situaciones de traumatismo grave, en donde se activan tanto la vía inflamatoria como la hematológica. Con un estado de salud normal, la conversión de C3 es <5% de la proteína C3 plasmática total. En una infección descontrolada, incluyendo septicemia y enfermedad de inmunocomplejo, la conversión de C3 se reestablece a aproximadamente un 30% con niveles de complemento normalmente menores de lo normal, debido a un aumento de la utilización y a cambios en la distribución de las reservas. Una activación de la vía de C3 inmediata de más del 30% generalmente produce pruebas clínicas de vasodilatación y de pérdida de fluidos en los tejidos. Con una conversión de C3 por encima del 30%, los mecanismos iniciadores son predominantemente no inmunitarios y las manifestaciones clínicas resultantes son dañinas para el paciente. Los niveles de C5 de complemento en los estados

saludable y con enfermedad controlada parecen mucho más estables que los de C3. Una reducción o conversión significativa de los niveles de C5 se asocia con la respuesta del paciente a un politraumatismo anormal (por ejemplo, accidentes de tráfico) y el desarrollo probable de síndromes de edema pulmonar fulminante. Por lo tanto, cualquier prueba de activación de C3 de complemento más allá del 30% de las reservas vasculares o de cualquier implicación de C5 o ambos, puede considerarse un presagio de un cambio patológico dañino en el paciente.

Tanto C3 como C5 liberan anafilotoxinas (C3a y C5a) que actúan sobre los mastocitos y basófilos, liberando agentes químicos vasodilatadores. Forman gradientes quimiotácticos para guiar a las células polimorfonucleares (PMN) al centro de las alteraciones inmunológicas (una respuesta beneficiosa), pero difieren debido a que C5a tiene un efecto de aglomeración (agregación) específico sobre estas células fagocíticas, impidiendo su movimiento aleatorio más allá del sitio de reacción. En el control normal de una infección, C3 activa a C5. Sin embargo, en un politraumatismo, C5 parece estar ampliamente activado, generando anafilotoxinas C5a de manera sistémica. Esta actividad incontrolada provoca la aglomeración de polimorfos dentro del sistema vascular y estos aglomerados son arrastrados hasta los capilares de los pulmones, que quedan ocluidos y generan efectos dañinos locales a consecuencia de la liberación de superóxido. Sin quedar limitados a la teoría, el mecanismo es probablemente importante en la patogénesis del síndrome de la dificultad respiratoria aguda (SDRA), aunque esta teoría se ha rebatido recientemente. Puede demostrarse que las anafilotoxinas C3a *in vitro* son potentes agregadores de plaquetas, pero su implicación *in vivo* está menos definida y la liberación de sustancias plaquetarias y plasmina en la curación de heridas puede implicar únicamente de manera secundaria al complemento C3. Es posible que sea necesaria una elevación prolongada de la activación de C3 para generar CID.

Además de los efectos celulares y vasculares del componente de complemento indicado anteriormente que podría explicar el vínculo entre un traumatismo y CID, una serie de descubrimientos científicos emergentes han identificado vínculos moleculares directos y una señalización cruzada funcional entre los sistemas de complemento y de coagulación. Se han obtenido datos que lo corroboran de estudios en ratones deficientes para C3. Ya que C3 es el componente compartido para cada una de las vías de complemento, se predice que los ratones deficientes para C3 carecen de toda la función del complemento. Sorprendentemente, sin embargo, los ratones deficientes para C3 son perfectamente capaces de activar los componentes de complemento terminales. (Huber-Lang, M., et al., "Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway," *Nat. Med 12*:682-687 (2006)). Algunos estudios en profundidad revelaron que la activación independiente de C3 de los componentes del complemento terminales está mediada por trombina, la enzima limitante de la velocidad de la cascada de coagulación. (Huber et al., 2006). Los componentes moleculares que median la activación de trombina después de la activación inicial del complemento siguen siendo difíciles de determinar.

Los presentes inventores han dilucidado lo que se cree que es la base molecular para la señalización cruzada entre las cascadas de complemento y de coagulación e identificaron MASP-2 como un punto de control central que vincula a los dos sistemas. Estudios bioquímicos acerca de la especificidad de sustrato de MASP-2 han identificado a la protrombina como un posible sustrato, además de las proteínas de complemento C2 y C4 bien conocidas. MASP-2 escinde de manera específica la protrombina en sitios funcionalmente relevantes, generando trombina, la enzima limitante de la velocidad de la cascada de coagulación. (Krarup, A., et al., "Simultaneous Activation of Complement and Coagulation by MBL-Associated Serine Protease 2," *PLoS. ONE. 2*:e623 (2007)). La trombina generada por MASP-2 es capaz de promover la deposición de fibrina en un sistema *in vitro* reconstituido definido, lo que demuestra la relevancia funcional de la escisión por MASP-2. (Krarup et al., 2007). Como se describe en los ejemplos de la presente memoria más adelante, los inventores han corroborado además la importancia fisiológica de este descubrimiento documentando la activación de trombina en suero de roedor normal después de la activación de la vía de lectina y demostraron que este proceso se bloquea por anticuerpos monoclonales neutralizantes de MASP-2.

MASP-2 puede representar un punto de ramificación central en la vía de lectina, capaz de promover la activación de los sistemas tanto de complemento como de coagulación. Debido a que la activación de la vía de lectina es una respuesta fisiológica a muchos tipos de lesión traumática, los presentes inventores creen que la inflamación sistémica concurrente (mediada por componentes de complemento) y la coagulación diseminada (mediada por la vía de coagulación) pueden explicarse por la capacidad de MASP-2 para activar ambas vías. Estos hallazgos sugieren claramente un papel de MASP-2 en la generación de la CID y un beneficio terapéutico de la inhibición de MASP-2 en el tratamiento o prevención de la CID. MASP-2 puede proporcionar el vínculo molecular entre el sistema de complemento y el de coagulación y la activación de la vía de lectina, ya que se produce en situaciones de traumatismo, puede iniciar directamente la activación del sistema de coagulación mediante el eje MASP-2-trombina, lo que proporciona un vínculo mecanístico entre el traumatismo y la CID. De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, la inhibición de MASP-2 podría inhibir la activación de la vía de lectina y reducir la generación de las dos anafilotoxinas, C3a y C5a. Se cree que es necesaria una elevación prolongada de la activación de C3 para generar CID.

Por lo tanto, un aspecto de la divulgación proporciona, por lo tanto, un método para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2 para tratar la coagulación intravascular diseminada u otro trastorno de la coagulación mediado por complemento mediante la administración de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-MASP-2 o un fragmento del mismo, inhibidores peptídicos o inhibidores de molécula pequeña) en un vehículo farmacéutico a un

sujeto que padece o que se encuentra en riesgo de desarrollar dicha afección. En algunos casos, los agentes inhibidores de MASP-2 pueden bloquear a MASP-2 que ya se ha activado. La composición inhibidora de MASP-2 se administra de manera adecuada al sujeto por vía sistémica, tal como por vía intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra administración parenteral o potencialmente, mediante administración oral para agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que se haya resuelto o controlado la afección. Los métodos de este aspecto pueden utilizarse para el tratamiento de CID secundaria a septicemia, traumatismo grave, incluyendo traumatismo neurológico (por ejemplo, traumatismo craneoencefálico agudo, véase Kumura, E., et al., *Acta Neurochirurgica 85*:23-28 (1987), infección (bacteriana, vírica, fúngica, parasítica), cáncer, complicaciones obstétricas, enfermedad hepática, reacción tóxica grave (por ejemplo, mordedura de serpientes, picaduras de insectos, reacción a una transfusión), choque, golpe de calor, rechazo de trasplantes, aneurisma vascular, fallo hepático, tratamiento del cáncer mediante quimioterapia o radioterapia, quemaduras, exposición accidental a radiación y otras causas. Véase, por ejemplo, Becker J.U. y Wira C.R. "Disseminated Intravascular Coagulation" emedicine.medscape.com/9/10/2009. Para la CID secundaria a un traumatismo u otro evento agudo, la composición inhibidora de MASP-2 puede administrarse inmediatamente después de la lesión traumática o de manera profiláctica antes de, durante, inmediatamente después o de uno a siete días o más, tal como entre 24 horas y 72 horas, después de una lesión inductora de traumatismo o de situaciones tales como cirugía en pacientes considerados en riesgo de desarrollar CID. La composición inhibidora de MASP-2 puede administrarse de manera adecuada en una forma farmacéutica de acción rápida, tal como por suministro intravenoso o intraarterial de un bolo de una solución que contiene la composición de agente inhibidor de MASP-2.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para tratar a un sujeto que padece o se encuentra en riesgo de desarrollar trombosis, coagulación microcirculatoria o fallo multiorgánico posterior a la coagulación microcirculatoria. Los trombos fisiológicos (coágulos de sangre) se forman en respuesta a una lesión vascular para impedir escapes de un vaso sanguíneo dañado.

La vía de lectina puede desempeñar un papel en la trombosis patológica desencadenada por una inflamación vascular subyacente ligada a diversas etiologías. Por ejemplo, puede formarse un trombo alrededor de placas ateroescleróticas, que son un iniciador conocido de la vía de lectina. Por lo tanto, puede usarse el tratamiento con un inhibidor de MASP-2 para bloquear la formación de trombos en pacientes con ateroesclerosis subyacente.

La coagulación microcirculatoria (coágulos de sangre en capilares y vasos sanguíneos pequeños) se produce en situaciones tales como el choque séptico. Se ha determinado un papel de la vía de lectina en el choque séptico, según se evidencia por el fenotipo protegido de los modelos de ratón MASP-2 (-/-) para la septicemia, descritos en el ejemplo 17 y las FIGURAS 18 y 19. Además, como se demuestra en el ejemplo 15 y las FIGURAS 16A y 16B, los ratones MASP-2 (-/-) se encuentran protegidos en el modelo de reacción localizada de Schwartzman de coagulación intravascular diseminada (CID), un modelo de coagulación localizada en los vasos microscópicos.

ADMINISTRACIÓN PERIQUIMIOTERAPÉUTICA Y TRATAMIENTO DE NEOPLASIAS MALIGNAS

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

Además, la activación del complemento puede ser una consecuencia de la quimioterapia o la radioterapia y por lo tanto, la inhibición de la activación del complemento podría ser útil como adyuvante en el tratamiento de neoplasias malignas para reducir la inflamación iatrogénica. Cuando la quimioterapia y la radioterapia preceden a la cirugía, los depósitos de C5b-9 eran más intensos y extendidos. Los depósitos de C5b-9 se encontraban ausentes en todas las muestras con lesiones benignas. S-proteína/vitronectina estaba presente en forma de depósitos fibrilares en la matriz de tejido conectivo en forma de depósitos difusos alrededor de las células tumorales, menos intensos y extendidos que la fibronectina. Había presencia de depósitos de IgG, C3 y C4 solo en muestras de carcinoma. La presencia de depósitos de C5b-9 es indicativa de la activación del complemento y es posterior a los efectos patogénicos en el cáncer de mama (Niculescu, F., et al., *Am. J. Pathol. 140*:1039-1043, 1992).

La terapia con láser DYE sintonizable de impulsos (577 nm) (PTDL) induce la coagulación de la hemoglobina y necrosis tisular, que se limita principalmente a los vasos sanguíneos. En un estudio de piel normal irradiada con PTDL, los hallazgos principales fueron los siguientes: 1) se depositaron fragmentos de C3, C8, C9 y MAC en las paredes vasculares; 2) estos depósitos no se debieron a la desnaturalización de las proteínas, ya que fueron evidentes tan solo 7 minutos después de la radiación, a diferencia de la deposición inmediata de la transferrina en los sitios de coágulos de eritrocitos; 3) se demostró que los depósitos de C3 amplifican la activación del complemento por la vía alternativa, una reacción que era específica ya que la necrosis tisular en sí no ocasionó dicha amplificación; y 4) estas reacciones precedieron a la acumulación local de leucocitos polimorfonucleares. La necrosis tisular fue más pronunciada en los hemangiomas. Los vasos angiomatosos mayores en el centro de la

necrosis no fijaron de manera significativa el complemento. Por el contrario, la deposición del complemento en los vasos situados en la periferia era similar a la observada en la piel normal con una excepción: C8, C9 y MAC se detectaron en algunos vasos sanguíneos inmediatamente después del tratamiento láser, un hallazgo consistente con el ensamblaje del MAC que se produce directamente sin la formación de una C5 convertasa. Estos resultados indican que el complemento se activa en la necrosis vascular inducida por PTDL y podría ser responsable del inicio de la respuesta inflamatoria.

La terapia fotodinámica (PDT) de tumores desencadena una fuerte respuesta inmunitaria del hospedador y una de sus manifestaciones es una neutrofilia pronunciada. Además de los fragmentos de complemento (mediadores directos) liberados como consecuencia de la activación del complemento inducida por la PDT, hay al menos un docena de mediadores secundarios que surgen a consecuencia de la actividad del complemento. Estos últimos incluyen las citocinas IL-1beta, TNF-alfa, IL-6, IL-10, G-CSF y KC, tromboxano, prostaglandinas, leucotrienos, histamina y factores de coagulación (Cecic, I., et al., *Cancer Lett. 183*:43-51, 2002).

Finalmente, el uso de inhibidores de la activación de complemento dependiente de MASP-2 puede preverse de manera conjunta con el régimen terapéutico estándar para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, el tratamiento con rituximab, un anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20, puede asociarse con efectos secundarios a la primera dosis de moderados a graves, notablemente en pacientes con altos números de células tumorales en circulación. Estudios recientes durante la primera infusión de rituximab midieron los productos de activación del complemento (C3b/c y C4b/c) y las citocinas (factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina 6 (IL-6) e IL-8) en cinco pacientes con recidiva de linfoma no Hodgkin (NHL) de grado bajo. La infusión de rituximab indujo una rápida activación del complemento, que precede a la liberación de TNF-alfa, IL-6 e IL-8. Aunque el grupo de estudio fue pequeño, el nivel de activación del complemento parecía estar correlacionado tanto con el número de linfocitos B en circulación antes de la infusión ($r = 0,85$; $P = 0,07$) como con la gravedad de los efectos secundarios. Los resultados indicaron que el complemento desempeña un papel central en la patogénesis de los efectos secundarios del tratamiento con rituximab. Ya que no puede impedirse la activación del complemento con corticosteroides, puede ser relevante estudiar el posible papel de los inhibidores de complemento durante la primera administración de rituximab (van der Kolk, L.E., et al., *Br. J. Haematol. 115*:807-811, 2001).

En otro aspecto, se proporcionan métodos para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que se esté tratando con agentes quimioterapéuticos y/o con radioterapia, incluyendo, pero sin limitación, para el tratamiento de afecciones cancerosas. Este método incluye administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un paciente periquimioterapéuicamente, es decir, antes y/o durante y/o después de la administración de agentes quimioterapéuticos y/o radioterapia. Por ejemplo, la administración de una composición de inhibidor de MASP-2 de la presente divulgación puede comenzar antes o de manera concurrente con la administración de la quimioterapia o radioterapia y continuarse durante el transcurso de la terapia, para reducir los efectos perjudiciales de la quimioterapia y/o la radioterapia en los tejidos sanos no diana. Además, puede administrarse la composición de inhibidor de MASP-2 después de la quimioterapia y/o la radioterapia. Se entiende que los regímenes de quimioterapia y radioterapia normalmente implican tratamientos repetidos y, por lo tanto, es posible que la administración de la composición de inhibidor de MASP-2 también sea repetitiva y relativamente coincidente con los tratamientos quimioterapéuticos y de radiación. También se cree que los agentes inhibidores de MASP-2 pueden usarse como agentes quimioterapéuticos, solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos y/o radioterapéuticos, para tratar a pacientes que padecen neoplasias malignas. La administración puede ser, de manera adecuada, por vía oral (para no peptidérgicos), intravenosa, intramuscular u otra vía parenteral.

En otro caso, pueden usarse los agentes inhibidores de MASP-2 para tratar a un sujeto con síndrome agudo por radiación (también conocido como enfermedad por radiación o envenenamiento por radiación) para reducir los efectos perjudiciales de la exposición a radiación ionizante (accidental o de otro tipo). Los síntomas asociados con el síndrome agudo por radiación incluyen náuseas, vómitos, diarrea, daño en la piel, pérdida de cabello, fatiga, fiebre, convulsiones y coma. Para el tratamiento del síndrome agudo por radiación, la composición inhibidora de MASP-2 puede administrarse inmediatamente después de la exposición a la radiación o de manera profiláctica antes de, durante, inmediatamente después o de uno a siete días o más, tal como entre 24 horas y 72 horas, después de la exposición. En algunos casos, los métodos pueden usarse para tratar a un sujeto antes o después de exponerse a una dosis de radiación ionizante suficiente para provocar síndrome agudo por radiación (es decir, una dosis por todo el cuerpo de radiación ionizante de al menos 1 Gy o al menos 2 Gy o al menos 3 Gy o al menos 4 Gy o al menos 5 Gy o al menos 6 Gy o al menos 7 Gy o mayor). En algunos casos, la composición inhibidora de MASP-2 puede administrarse de manera adecuada en una forma farmacéutica de acción rápida, tal como por suministro intravenoso o intraarterial de un bolo de una solución que contiene la composición de agente inhibidor de MASP-2.

AFECCIONES OFTALMOLÓGICAS

La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una enfermedad causante de ceguera que afecta a millones de adultos, aunque las secuelas de los eventos bioquímicos, celulares y/o moleculares que ocasionan el desarrollo de la AMD no se terminan de entender. La AMD da como resultado una destrucción progresiva de la mácula que se ha correlacionado con la formación de depósitos extracelulares denominados drusas ubicados dentro y alrededor de la mácula, por detrás de la retina y entre el epitelio pigmentario retiniano (RPE) y la coroides. Estudios

recientes han revelado que las proteínas asociadas con la inflamación y los procesos inmunomediados son prevalentes entre los constituyentes asociados con las drusas. Se han detectado transcritos que codifican una serie de estas moléculas en células retinales, RPE y coroidales. Estos datos también demuestran que las células dendríticas, que son potentes células presentadoras de antígenos, están íntimamente asociadas con el desarrollo de las drusas y que la activación del complemento es una vía clave que está activa tanto en las drusas como a lo largo de la interfaz RPE-coroides (Hageman, G.S., et al., *Prog. Retin. Eye Res. 20*:705-732, 2001).

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

El inhibidor de complemento asociado a membrana, receptor 1 de complemento, también se localiza en las drusas, pero no se detecta mediante inmunohistoquímica en células del RPE. En cambio, un segundo inhibidor de complemento asociado a membrana, la proteína de cofactor de membrana, está presente en las células del RPE asociado con las drusas, así como en pequeños elementos esféricos subestructurales dentro de las drusas. Estos elementos no identificados previamente también muestran una fuerte reactividad inmunitaria contra fragmentos proteolíticos del componente C3 de complemento que se depositan de manera característica en sitios de activación del complemento. Se ha propuesto que estas estructuras representan restos residuales de células del RPE degeneradas que son las dianas del ataque del complemento (Johnson, L.V., et al., *Exp. Eye Res. 73*:887-896, 2001).

La identificación y localización de estos múltiples reguladores del complemento, así como de productos de activación del complemento (C3a, C5a, C3b, C5b-9) han llevado a los investigadores a la conclusión de que la activación crónica del complemento desempeña un papel importante en el proceso de la biogénesis de las drusas y en la etiología de la AMD (Hageman et al., *Progress Retinal Eye Res. 20*:705-32, 2001). La identificación de los productos de activación de C3 y C5 en las drusas no proporciona indicaciones de si el complemento se encuentra activado por la vía clásica, la vía de lectina o el bucle de amplificación alternativo, tal como se entiende de acuerdo con la presente divulgación, ya que tanto C3 como C5 son comunes para las tres. Sin embargo, dos estudios han empleado marcaje inmunológico de las drusas usando anticuerpos específicos para C1q, el componente de reconocimiento esencial para la activación de la vía clásica (Mullins et al., *FASEB J. 14*:835-846, 2000; Johnson et al., *Exp. Eye Res. 70*:441-449, 2000). Ambos estudios llegaron a la conclusión de que en general no se observaba marcaje inmunológico con C1q en las drusas. Estos resultados negativos con C1q sugieren que la activación del complemento en las drusas no se produce por la vía clásica. Además, se ha comunicado en el estudio de Mullins et al., 2000, que el marcaje inmunológico de las drusas para constituyentes del complejo inmunológico (cadenas ligeras de IgG, IgM) es de débil a variable, lo que además indica que la vía clásica desempeña un papel menor en la activación del complemento que se produce en el proceso de la enfermedad.

Dos estudios recientemente publicados han evaluado el papel del complemento en el desarrollo de neovascularización coroidal (NVC) inducida por láser en ratones, un modelo de NVC en seres humanos. Usando métodos inmunohistológicos, Bora y colaboradores (2005) observaron una deposición significativa de los productos de activación del complemento, C3b y C5b-9 (MAC) en el complejo neovascular después del tratamiento con láser (Bora et al., *J. Immunol. 174*:491-7, 2005). De manera importante, la NVC no se desarrolló en ratones con deficiencia genética para C3 (ratones C3-/-), el componente esencial necesario en todas las vías de activación del complemento. Los niveles de ARN mensajero para VEGF, TGF-β_2 y β-FGF, tres factores angiogénicos implicados en la NVC, se encontraban elevados en tejido ocular de ratones tras la NVC inducida por láser. De manera significativa, el agotamiento del complemento dio como resultado una reducción notable en los niveles de ARN de estos factores angiogénicos.

Usando métodos ELISA, Nozaki y colaboradores demostraron que las potentes anafilotoxinas, C3a y C5a, se generan de manera temprana durante el transcurso de la NVC inducida por láser (Nozaki et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103*:2328-33, 2006). Además, estos dos fragmentos bioactivos de C3 y C5 indujeron expresión de VEGF después de la inyección intravítrea en ratones de tipo silvestre. De manera coherente con estos resultados, Nozaki y colaboradores también demostraron que la ablación genética de receptores para C3a y C5a reduce la expresión de VEGF y la formación de NVC después de la lesión con el láser y que la neutralización mediada por anticuerpos de C3a o C5a o el bloqueo farmacológico de sus receptores también reduce la NVC. Estudios previos han determinado que el reclutamiento de leucocitos y particularmente de macrófagos, desempeña un papel central en la NVC inducida por láser (Sakurai et al., *Invest. Opthomol. Vis. Sci. 44*:3578-85, 2003; Espinosa-Heidmann, et al., *Invest. Opthomol. Vis. Sci. 44*:3586-92, 2003). En su artículo de 2006, Nozaki y colaboradores comunicaron que el reclutamiento de leucocitos se reduce notablemente en ratones C3aR(-/-) y C5aR(-/-) después de la lesión con láser.

Por lo tanto, un aspecto de la divulgación proporciona un método para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2 para tratar la degeneración macular asociada a la edad u otra afección oftalmológica mediada por complemento mediante la administración de una composición que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que padece dicha afección u otra afección oftalmológica mediada por complemento. La composición inhibidora de MASP-2 puede administrarse localmente en el ojo, tal como por irrigación o mediante aplicación de la composición en forma de un gel, salvas o gotas. Como alternativa, el agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto por vía sistémica, tal como por vía intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra administración parenteral o potencialmente, mediante administración oral para agentes no peptidérgicos. La composición de agente inhibidor de MASP-2 puede combinarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como los divulgados en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2004-0072809-A1. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que se haya resuelto o controlado la afección.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2 para tratar a un sujeto que padece o está en riesgo de desarrollar glaucoma. Se ha demostrado que la activación descontrolada del complemento contribuye a la progresión de la lesión degenerativa en las células ganglionales retinales (RGC), sus sinapsis y axones en el glaucoma. Véase Tezel G. et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci 51*:5071-5082 (2010). Por ejemplo, algunos estudios histopatológicos de tejidos humanos e *in vivo* usando diferentes modelos animales han demostrado que los componentes del complemento, incluyendo C1q y C3, son sintetizados y se forma el complejo de complemento terminal en la retina glaucomatosa (véase Stasi K. et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci 47*:1024-1029 (2006), Kuehn M.H. et al., *Exp Eye Res 83*:620-628 (2006)). Como se describe en Tezel G. et al., se ha determinado que además de la vía clásica, es probable que esté implicada la vía de lectina en la activación del complemento durante la neurodegeneración glaucomatosa, facilitando de este modo la progresión de la lesión neurodegenerativa por lisis celular colateral, inflamación y autoinmunidad. Como se describe en Tezel G. et al., el análisis proteómico de muestras retinales humanas obtenidas de ojos de donante con o sin glaucoma detectaron la expresión y la regulación diferencial de varios componentes del complemento. De manera destacable, los niveles de expresión de componentes del complemento de la vía de lectina eran mayores, o solo se detectaban, en muestras glaucomatosas que en controles, incluyendo MASP-1 y MASP-2 y lectina de tipo C. Como además se describe en Kuehn M.H. et al., *Experimental Eye Research 87*:89-95 (2008), la síntesis y deposición del complemento se induce por I/R retiniana y la alteración de la cascada del complemento retrasa la degeneración del RGC. En este estudio, se observó que los ratones que portaban una alteración diana del componente C3 del complemento mostraron degeneración del RGC retrasada después de una I/R retiniana transitoria cuando se comparó con animales normales.

Los hallazgos de estos estudios sugieren que las alteraciones en el equilibrio fisiológico entre la activación del complemento y la regulación intrínseca en condiciones de estrés glaucomatoso pueden tener un impacto importante en la progresión de la lesión neurodegenerativa, lo que indica que la inhibición de la activación del complemento, tal como mediante la administración de anticuerpos anti-MASP-2, puede usarse como terapia para pacientes con glaucoma.

Por lo tanto, un aspecto de la divulgación proporciona un método para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2 para tratar el glaucoma mediante la administración de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en un vehículo farmacéutico a un sujeto que padece glaucoma. La composición inhibidora de MASP-2 puede administrarse localmente en el ojo, tal como por irrigación o mediante aplicación de la composición en forma de un gel, salvas o gotas. Como alternativa, el agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto por vía sistémica, tal como por vía intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra administración parenteral o potencialmente, mediante administración oral para agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que se haya resuelto o controlado la afección.

IV. AGENTES INHIBIDORES DE MASP-2

En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para inhibir los efectos adversos de la activación de complemento dependiente de MASP-2. Los agentes inhibidores de MASP-2 se administran en una cantidad eficaz para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto vivo. En la práctica de este aspecto de la divulgación, los agentes inhibidores de MASP-2 representativos incluyen: moléculas que inhiben la actividad biológica de MASP-2 (tales como inhibidores de molécula pequeña, anticuerpos o péptidos bloqueantes anti-MASP-2 que interactúan con MASP-2 o que interfieren en una interacción proteína-proteína) y moléculas que reducen la expresión de MASP-2 (tales como moléculas de ácido nucleico antisentido para MASP-2, moléculas de ARNi específicas para MASP-2 y ribocimas de MASP-2) previniendo de este modo que MASP-2 active la vía de complemento de la lectina. Los agentes inhibidores de MASP-2 pueden usarse solos como terapia principal o en combinación con otros agentes terapéuticos como terapia adyuvante para mejorar los beneficios terapéuticos de otros tratamientos médicos.

La inhibición de la activación de complemento dependiente de MASP-2 se caracteriza por al menos uno de los siguientes cambios en un componente del sistema de complemento que se produce como resultado de la administración de un agente inhibidor de MASP-2 de acuerdo con los métodos de la divulgación: la inhibición de la

generación o producción de los productos de activación de complemento dependiente 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 de complemento evaluada en un ensayo hemolítico usando glóbulos rojos de conejo o de cobaya insensibilizados (medida, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 33), la reducción de la escisión de C4 y la 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).

De acuerdo con la presente divulgación, se utilizan agentes inhibidores de MASP-2 que son eficaces para inhibir el sistema de activación de complemento dependiente de MASP-2. Los agentes inhibidores de MASP-2 útiles en la práctica de este aspecto de la divulgación incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-MASP-2 y fragmentos de los mismos, péptidos inhibidores de MASP-2, moléculas pequeñas, receptores solubles de MASP-2 e inhibidores de la expresión. Los agentes inhibidores de MASP-2 pueden inhibir el sistema de activación de complemento dependiente de MASP-2 bloqueando la función biológica de MASP-2. Por ejemplo, un agente inhibidor puede bloquear de manera eficaz las interacciones proteína-proteína de MASP-2, interferir con la dimerización o el ensamblaje de MASP-2, bloquear la unión a Ca^{2+}, interferir con el sitio activo de serina proteasa de MASP-2 o puede reducir la expresión de proteína de MASP-2.

Los agentes inhibidores de MASP-2 inhiben de manera selectiva la activación de complemento dependiente de MASP-2, dejando intacto el sistema de activación de complemento dependiente de C1q.

En una realización, un agente inhibidor de MASP-2 útil en los métodos de la divulgación es un agente inhibidor específico para MASP-2 que se une específicamente a un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 6 con una afinidad al menos diez veces mayor que a otros antígenos en el sistema de complemento. En otra realización, un agente inhibidor de MASP-2 se une específicamente a un polipéptido que comprende la SEQ D NO: 6 con una afinidad de unión al menos 100 veces mayor que a otros antígenos en el sistema de complemento. La afinidad de unión del agente inhibidor de MASP-2 puede determinarse usando un ensayo de unión adecuado.

El polipéptido de MASP-2 muestra una estructura molecular similar a MASP-1, MASP-3, C1r y C1s, las proteasas del sistema de complemento C1. La molécula de ADNc expuesta en la SEQ ID NO: 4 codifica un ejemplo representativo de MASP-2 (que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5) y proporciona el polipéptido de MASP-2 humana con una secuencia líder (aa 1-15) que se escinde después de la secreción, dando como resultado la forma madura de MASP-2 humana (SEQ ID NO: 6). Tal como se muestra en la FIGURA 2, el gen *MASP 2* humano abarca doce exones. El ADNc de MASP-2 humana está codificado por los exones B, C, D, F, G, H, I, J, K y L. Un corte y empalme alternativo da como resultado una proteína de 20 kDa denominada proteína 19 asociada a MBL ("MAp19", también citada como "sMAP") (SEQ ID NO: 2), codificada por la (SEQ ID NO: 1) que surge de los exones B, C, D y E, tal como se muestra en la FIGURA 2. La molécula de ADNc expuesta en la SEQ ID NO: 50 codifica MASP-2 murino (que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 51) y proporciona el polipéptido de MASP-2 murino con una secuencia líder que se escinde después de la secreción, dando como resultado la forma madura de MASP-2 murino (SEQ ID NO: 52). La molécula de ADNc expuesta en la SEQ ID NO: 53 codifica MASP-2 de rata (que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 54) y proporciona el polipéptido de MASP-2 de rata con una secuencia líder que se escinde después de la secreción, dando como resultado la forma madura de MASP-2 de rata (SEQ ID NO: 55).

Los expertos en la materia reconocerán que las secuencias divulgadas en la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 50 y la SEQ ID NO: 53 representan alelos individuales de MASP-2 humana, murina y de rata, respectivamente y que se espera que se produzca variación alélica y corte y empalme alternativo. Se encuentran dentro del ámbito de la invención variaciones alélicas de las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 50 y la SEQ ID NO: 53, incluyendo aquellas que contienen mutaciones silentes y aquellas en las que las mutaciones dan como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos. Pueden clonarse las variantes alélicas de la secuencia de MASP-2 sondando ADNc o genotecas de diferentes individuos según procedimientos convencionales.

Los dominios de la proteína MASP-2 humana (SEQ ID NO: 6) se muestran en la FIGURA 1 y 2A e incluyen un dominio de C1r/C1s/VEGF de erizo de mar/proteína morfogénica ósea (CUBI) N-terminal (aa 1-121 de la SEQ ID NO: 6), un dominio de factor de crecimiento epidérmico (aa 122-166), un segundo dominio CUBI (aa 167-293) así como un tándem de dominios de proteína de control de complemento y un dominio de serina proteasa. El corte y empalme alternativo del gen *MASP 2* da como resultado MAp19, mostrado en la FIGURA 1. MAp19 es una proteína no enzimática que contiene la región CUB1-EGF N-terminal de MASP-2 con cuatro restos adicionales (EQSL) procedentes del exón E, tal como se muestra en la FIGURA 1.

Se ha demostrado que varias proteínas se unen a o interactúan con MASP-2 mediante interacciones proteína-proteína. Por ejemplo, se sabe que MASP-2 se une a y forma complejos dependientes de Ca^{2+} con, las proteínas lectinas MBL, H-ficolina y L-ficolina. Se ha demostrado que cada complejo de MASP-2/lectina activa el complemento mediante 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). Algunos estudios han demostrado que los dominios CUB1-EGF de MASP-2 son esenciales para la asociación de MASP-2 con MBL (Thielens, N.M., et al., *J. Immunol. 166*:5068, 2001). También se ha demostrado que los dominios CUB1EGFCUBII median la dimerización de MASP-2, que es necesaria para la formación de un

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

ANTICUERPOS ANTI-MASP-2

El agente inhibidor de MASP-2 comprende un anticuerpo anti-MASP-2 que inhibe el sistema de activación de complemento dependiente de MASP-2. Los anticuerpos anti-MASP-2 incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales o recombinantes procedentes de cualquier mamífero producto de anticuerpos y pueden ser multiespecíficos, quiméricos, humanizados, antiidiotípicos y fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$, fragmentos Fv, fragmentos scFv y anticuerpos monocatenarios, tal como se describe adicionalmente en la presente memoria.

Se han descrito en la bibliografía varios anticuerpos anti-MASP-2, algunos de los cuales se listan a continuación en la TABLA 1. Estos anticuerpos anti-MASP-2 descritos previamente pueden seleccionarse respecto de su capacidad para inhibir el sistema de activación de complemento dependiente de MASP-2 usando los ensayos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se han identificado anticuerpos Fab2 anti-MASP-2 de rata que bloquean la activación de complemento dependiente de MASP-2, como se describe con más detalle en los ejemplos 10 y 11 de la presente memoria. Una vez se ha identificado un anticuerpo anti-MASP-2, que funciona como agente inhibidor de MASP-2, puede usarse para producir anticuerpos anti-idiotipo y usarse para identificar otras moléculas de unión a MASP-2, tal como se describe con más detalle más adelante.

TABLA 1: ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA MASP-2 DE LA BIBLIOGRAFÍA

ANTÍGENO	TIPO DE ANTICUERPO	REFERENCIA
MASP-2 recombinante	Policlonal de rata	Peterson, S.V., et al., *Mol. Immunol.* 37:803-811, 2000
Fragmento CCP1/2-SP humano recombinante (MoAb 8B5)	MoAb de rata (subclase IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., *J. of Immunol. Methods* 282:159-167, 2003
MAp19 humano recombinante (MoAb 6G12) (reacciona de manera cruzada con MASP-2)	MoAb de rata (subclase IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., *J. of Immunol. Methods* 282:159-167, 2003
hMASP-2	MoAb de ratón (S/P) MoAb de ratón (N-term)	Peterson, S.V., et al., *Mol. Immunol.* 35:409, abril de 1998
hMASP-2 (dominio CCP1-CCP2-SP	MoAb de rata: Nimoab101, producido por la línea celular de hibridoma 03050904 (ECACC)	Documento WO 2004/106384
hMASP-2 (de longitud completa, marcado con His)	MoAb murinos: NimoAb104, producido por la línea celular de hibridoma M0545YM035 (DSMZ) NimoAb108, producido por la línea celular de hibridoma M0545YM029 (DSMZ) NimoAb109 producido por la línea celular de hibridoma M0545YM046 (DSMZ) NimoAb110 producido por la línea celular de hibridoma M0545YM048 (DSMZ)	Documento WO 2004/106384

ANTICUERPOS ANTI-MASP-2 CON FUNCIÓN EFECTORA REDUCIDA

En algunos casos, los anticuerpos anti-MASP-2 tienen función efectora reducida para reducir la inflamación que puede surgir de la activación de la vía de complemento clásica. Se ha demostrado que la capacidad de las moléculas de IgG para desencadenar la vía de complemento clásica reside en la porción Fc de la molécula (Duncan, A.R., et al., *Nature 332*:738-740 1988). Las moléculas de IgG en las que la parte Fc de la molécula se ha retirado por

escisión enzimática se encuentran desprovistas de esta función efectora (véase Harlow, *Antibodies: A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988). Por consiguiente, pueden generarse anticuerpos con función efectora reducida como resultado de carecer de la parte Fc de la molécula teniendo una secuencia de Fc modificada por ingeniería genética que minimiza la función efectora o que es de isotipo IgG_2 o IgG_4 humano.

Pueden producirse anticuerpos con función efectora reducida mediante manipulación biológica molecular convencional de la porción Fc de las cadenas pesadas de IgG, como se describe en el ejemplo 9 en la presente memoria y también como se describe en Jolliffe et al., *Int'l Rev. Immunol. 10*:241-250, 1993 y 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 capacidad reducida para activar el complemento y/o interactuar con 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). Pueden producirse anticuerpos humanizados o completamente humanos específicos para MASP-2 humana formados por los isotipos IgG2 o IgG4 mediante uno de diversos métodos conocidos por un experto habitual en la materia, como se describe en Vaughan, T.J., et al., *Nature Biotechnical 16*:535-539, 1998.

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-MASP-2

Pueden producirse anticuerpos anti-MASP-2 usando polipéptidos de MASP-2 (por ejemplo, MASP-2 de longitud completa) o usando péptidos portadores de epítopos antigénicos de MASP-2 (por ejemplo, una parte del polipéptido MASP-2). Los péptidos inmunogénicos pueden ser tan pequeños como de cinco restos de aminoácido. Por ejemplo, puede usarse el polipéptido de MASP-2 que incluye la secuencia de aminoácidos completa de SEQ ID NO: 6 para inducir anticuerpos anti-MASP-2 útiles en el método de la divulgación. Los dominios de MASP-2 concretos que se sabe que están implicados en las interacciones proteína-proteína, tales como los dominios CUBI y CUBIEGF, así como la región que abarca el sitio activo de serina proteasa, pueden expresarse en forma de polipéptidos recombinantes, tal como se describe en el ejemplo 3 y usarse como antígenos. Además, los péptidos que comprenden una porción de al menos 6 aminoácidos del polipéptido MASP-2 (SEQ ID NO: 6) también son útiles para inducir anticuerpos contra MASP-2. En la TABLA 2 a continuación se proporcionan ejemplos adicionales de antígenos procedentes de MASP-2 útiles para inducir anticuerpos contra MASP-2. Los péptidos y polipéptidos de MASP-2 usados para generar anticuerpos pueden aislarse en forma de polipéptidos naturales o péptidos recombinantes o sintéticos y polipéptidos recombinantes catalíticamente inactivos, tales como MASP-2A, tal como se describe adicionalmente en los ejemplos 5-7. En algunos casos, los anticuerpos anti-MASP-2 se obtienen usando una estirpe de ratón transgénica, como se describe en los ejemplos 8 y 9 y como se describe adicionalmente más adelante.

Los antígenos útiles para producir anticuerpos anti-MASP-2 también incluyen polipéptidos de fusión, tales como fusiones de MASP-2 o una porción del mismo con un polipéptido de inmunoglobulina o con proteína de unión a maltosa. El inmunógeno polipeptídico puede ser una molécula de longitud completa o una porción de la misma. En caso de que la porción de polipéptido sea similar a un hapteno, dicha porción puede unirse o ligarse ventajosamente a un vehículo macromolecular (tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), seroalbúmina bovina (BSA) o toxoide tetánico) para la inmunización.

TABLA 2: ANTÍGENOS DERIVADOS DE MASP-2

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

SEQ ID NO: 14 TPLGPKWPEPVFGRL	Péptido CUBI humano
SEQ ID NO: 15: TAPPGYRLRLYFTHFDLEL SHLCEYDFVKLSSGAKVLA TLCGQ	Péptido CUBI humano
SEQ ID NO: 16: TFRSDYSN	Región de unión a MBL en el dominio CUBI humano
SEQ ID NO: 17: FYSLGSSLDITFRSDYSNEK PFTGF	Región de unión a MBL en el dominio CUBI humano
SEQ ID NO: 18 IDECOVAPG	Péptido de EGF
SEQ ID NO: 19 ANMLCAGLESGGKDSCRG DSGGALV	Péptido del sitio activo de serina proteasa

ANTICUERPOS POLICLONALES

Pueden prepararse anticuerpos policlonales contra MASP-2 inmunizando a un animal con polipéptido de MASP-2 o una parte inmunogénica del mismo usando métodos bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Véase, por ejemplo, Green et al., "Production of Polyclonal Antisera," en *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.), página 105 y como se describe adicionalmente en el ejemplo 6. Puede aumentarse la inmunogenicidad de un polipéptido de MASP-2 mediante el uso de un adyuvante, incluyendo geles minerales, tales como hidróxido de aluminio o adyuvante de Freund (completo o incompleto), sustancias tensioactivas, tales como lisolecitina, polioles Pluronics, polianiones, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. Los anticuerpos policlonales normalmente se generan en animales tales como caballos, vacas, perros, pollos, ratas, ratones, conejos, cobayas, cabras u ovejas. Como alternativa, un anticuerpo anti-MASP-2 útil en la presente invención también puede obtenerse de un primate no humano. Las técnicas generales para generar anticuerpos diagnóstica y terapéuticamente útiles en babuinos pueden encontrarse, por ejemplo, en Goldenberg et al., Publicación Internacional de Patente n.º WO 91/11465 y en Losman, M.J., et al., *Int. J. Cancer 46*:310, 1990. Después, se producen sueros que contienen anticuerpos inmunológicamente activos a partir de la sangre de dichos animales inmunizados usando procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica.

ANTICUERPOS MONOCLONALES

En algunas realizaciones, el agente inhibidor de MASP-2 es un anticuerpo monoclonal anti-MASP-2. Los anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 son altamente específicos, dirigiéndose contra un solo epítopo de MASP-2. Como se usa en la presente memoria, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo, que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse que sea necesaria la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse usando cualquier técnica que posibilite la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo, tal como el método de hibridoma descrito por Kohler, G., et al., *Nature 256:495,* 1975 o pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567 de Cabilly). También pueden aislarse anticuerpos monoclonales de fagotecas de anticuerpos 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, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas.

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

Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales humanos mediante el uso de ratones transgénicos que se han modificado para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una exposición a antígeno. En esta técnica, se introducen elementos del locus de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana en estirpes de ratones procedentes de líneas de células madre embrionarias que contienen alteraciones preconfiguradas de los loci de cadena pesada y de cadena ligera de inmunoglobulina endógenos. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, tales como los antígenos de MASP-2 descritos en la

presente memoria y pueden usarse los ratones para producir hibridomas secretores de anticuerpos humanos anti-MASP-2 fusionando los linfocitos B de dichos animales a líneas celulares de mieloma adecuadas usando la tecnología de Kohler-Milstein convencional, tal como se describe con más detalle en el ejemplo 7. Se encuentran disponibles comercialmente ratones transgénicos con un genoma de inmunoglobulina humano (por ejemplo, de Abgenix, Inc., Fremont, CA y Medarex, Inc., Annandale, N.J.). Los métodos para obtener anticuerpos humanos de ratones transgénicos se describen, por ejemplo, por Green, L.L., et al., *Nature Genet.* 7:13, 1994; Lonberg, N., et al., *Nature 368*:856, 1994; y Taylor, L.D., et al., *Int. Immun. 6*:579, 1994.

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

Una vez producidos, se comprueba en primer lugar la especificidad de la unión a MASP-2 de los anticuerpos policlonales, monoclonales o procedentes de fagos. Puede utilizarse una serie de ensayos conocidos por los expertos en la materia para detectar anticuerpos que se unen de manera específica a MASP-2. Los ensayos ilustrativos incluyen transferencia de Western o análisis por inmunoprecipitación mediante métodos convencionales (por ejemplo, como se describe en Ausubel et al.), inmunoelectroforesis, ensayos inmunosorbentes ligados a enzimas, transferencias por puntos, inhibición o ensayos de competición y ensayos de tipo sándwich (tal como se describe en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Una vez se han identificado anticuerpos que se unen específicamente a MASP-2, se comprueba la capacidad de los anticuerpos anti-MASP-2 para funcionar como agente inhibidor de MASP-2 en uno de varios ensayos, tales como, por ejemplo, un ensayo de escisión de C4 específico de lectina (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).

Puede determinarse fácilmente la afinidad de los anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 por un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, 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, preferentemente <10 nM y lo más preferentemente, <2 nM.

ANTICUERPOS QUIMÉRICOS/HUMANIZADOS

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

Una forma de un anticuerpo quimérico es un anticuerpo anti-MASP-2 monoclonal humanizado. Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos, que contienen una secuencia mínima procedente de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos monoclonales humanizados se producen transfiriendo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas (por ejemplo, de ratón), procedentes de las cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de ratón en un dominio variable humano. Normalmente, se sustituyen posteriormente los restos de anticuerpos humanos en las regiones marco conservadas de los homólogos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y típicamente dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco conservadas de Fv proceden de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones, P.T., et al., *Nature 321*:522-525, 1986; Reichmann, L., et al., *Nature 332*:323-329, 1988; y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol. 2*:593-596, 1992.

Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos monoclonales humanos que incluyen al menos una región CDR3 de unión a MASP-2. Además, pueden reemplazarse las partes Fc para producir IgA o IgM, así como anticuerpos IgG humanos. Dichos anticuerpos humanizados tendrán una utilidad clínica particular ya que reconocerán específicamente a MASP-2 humana, pero no generarán una respuesta inmunitaria en seres humanos contra el anticuerpo en sí. Por consiguiente, son adecuados para administración *in vivo* en seres humanos, especialmente cuando se hace necesaria una administración repetida o a largo plazo.

Un ejemplo de la generación de un anticuerpo anti-MASP-2 humanizado a partir de un anticuerpo monoclonal anti-MASP-2 murino se proporciona en la presente memoria en el ejemplo 6. También se describen técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados, por ejemplo, por Jones, P.T., et al., *Nature 321*:522, 1986; Carter,

P., et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89*:4285, 1992; Sandhu, J.S., *Crit. Rev. Biotech. 12*:437, 1992; Singer, I.I., et al., *J. Immun. 150*:2844, 1993; Sudhir (ed.), *Antibody Engineering Protocols,* Humana Press, Inc., 1995; Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies," en *Protein Engineering: Principles and Practice,* Cleland et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., páginas 399-434, 1996; y por la Patente de los Estados Unidos n.º 5.693.762, de Queen, 1997. Además, hay entidades comerciales que sintetizarán anticuerpos humanizados a partir de regiones de anticuerpo murino específicas, tales como Protein Design Labs (Mountain View, CA).

ANTICUERPOS RECOMBINANTES

También pueden producirse anticuerpos anti-MASP-2 usando métodos recombinantes. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos humanos usando bibliotecas de expresión de inmunoglobulinas (disponibles, por ejemplo, de Stratagene, Corp., La Jolla, CA) para producir fragmentos de anticuerpos humanos (V_H. V_L, Fv, Fd, Fab o $F(ab')_2$). Después, estos fragmentos se usan para construir anticuerpos humanos completos usando técnicas similares a las empleadas para producir anticuerpos quiméricos.

ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO

Una vez que se identifican anticuerpos anti-MASP-2 con la actividad inhibidora deseada, estos anticuerpos pueden usarse para generar anticuerpos anti-idiotipo que se asemejan a una porción de MASP-2 usando técnicas que se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Greenspan, N.S., et al., *FASEB J. 7*:437, 1993. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos que se unen a MASP-2 y que inhiben completamente una interacción de la proteína MASP-2 para la activación del complemento para generar anti-idiotipos que se asemejan al sitio de unión de MBL en la proteína MASP-2 y por lo tanto, se unen y neutralizan un ligando de unión de MASP-2, tal como, por ejemplo, MBL.

FRAGMENTOS DE INMUNOGLOBULINA

Los agentes inhibidores de MASP-2 útiles en el método de la divulgación abarcan no solo moléculas de inmunoglobulina intactas, sino también los fragmentos bien conocidos, incluyendo Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$ y fragmentos Fv, fragmentos scFv, diabodies, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenarias y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Es de sobra conocido en la técnica que solo una pequeña proporción de una molécula de anticuerpo, el parátopo, está implicada en la unión del anticuerpo a su epítopo (véase, por ejemplo, Clark, W.R., *The Experimental Foundations of Modern Immunology,* Wiley & Sons, Inc., NY, 1986). Las regiones pFc' y Fc del anticuerpo son efectores de la vía de complemento clásica, pero no están implicadas en la unión al antígeno. Un anticuerpo del cual se ha escindido enzimáticamente la región pFc' o que se ha producido sin la región pFc', se denomina fragmento $F(ab')_2$ y conserva los dos sitios de unión a antígeno de un anticuerpo intacto. Un fragmento $F(ab')_2$ aislado se denomina un fragmento monoclonal bivalente debido a sus dos sitios de unión a antígeno. De forma análoga, un anticuerpo del cual se ha escindido enzimáticamente la región Fc o que se ha producido sin la región Fc, se denomina fragmento Fab y conserva uno de los sitios de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo intacta.

Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo mediante hidrólisis proteolítica, tal como por digestión de pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos de anticuerpo por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado $F(ab')_2$. Este fragmento puede escindirse además usando un agente reductor de tiol para producir fragmento monovalentes Fab' 3.5S. Opcionalmente, puede llevarse a cabo la reacción de escisión usando un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de los enlaces disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmento Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos n.º 4.331.647 de Goldenberg; Nisonoff, A., et al., *Arch. Biochem. Biophys. 89*:230, 1960; Porter, R.R., *Biochem. J. 73*:119, 1959; Edelman, et al., en *Methods in Enzymology 1*:422, Academic Press, 1967; y por Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4.

En algunas realizaciones, se prefiere el uso de anticuerpos que carecen de la región Fc para evitar la activación de la vía de complemento clásica, que se inicia tras la unión de Fc al receptor Fcγ. Hay varios métodos mediante los cuales se puede producir un MoAb que evita las interacciones con el receptor Fcγ. Por ejemplo, puede retirarse químicamente la región Fc de un anticuerpo monoclonal usando digestión parcial por enzimas proteolíticas (tales como digestión por ficina), generando de este modo, por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno, tales como fragmentos Fab o $F(ab)_2$ (Mariani, M., et al., *Mol. Immunol. 28*:69-71, 1991). Como alternativa, el isotipo γ4 de IgG humano, que no se une a receptores Fcγ, puede usarse durante la construcción de un anticuerpo humanizado como se describe en la presente memoria. También pueden diseñarse por ingeniería genética anticuerpos, anticuerpos monocatenarios y dominios de unión a antígeno que carecen del dominio Fc usando técnicas recombinantes como se describen en la presente memoria.

FRAGMENTOS DE ANTICUERPO MONOCATENARIOS

Como alternativa, se pueden crear moléculas de unión de una sola cadena peptídica específicas para MASP-2 en las que se encuentran conectadas las regiones Fc de cadena ligera y pesada. Los fragmentos Fv pueden conectarse mediante un enlazador peptídico para formar una proteína de unión a antígeno monocatenaria (scFv). Estas

proteínas de unión a antígeno monocatenarias se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L que se conectan mediante un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula hospedadora, tal como *E. coli.* Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una sola cadena polipeptídica con un péptido enlazador que puentea los dos dominios V. Se describen métodos para producir scFv, por ejemplo, por Whitlow, et al., "Methods: A Companion to Methods in Enzymology" 2:97, 1991; Bird, et al., *Science 242*:423, 1988; la Patente de los Estados Unidos n.º 4.946.778, de Ladner; Pack, P., et al., *Bio/Technology 11*:1271, 1993.

A modo de ejemplo ilustrativo, puede obtenerse un scFv específico para MASP-2 exponiendo linfocitos a polipéptido de MASP-2 *in vitro* y seleccionando bibliotecas de presentación de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, mediante el uso de proteína o péptido de MASP-2 inmovilizado o marcado). Pueden obtenerse genes que codifican polipéptidos que tienen dominios de unión al polipéptido de MASP-2 potenciales mediante la exploración de bibliotecas de péptidos aleatorias presentadas sobre fagos o sobre bacterias, tales como *E. coli.* Estas bibliotecas de presentación de péptidos aleatorios pueden usarse para seleccionar péptidos que interactúan con MASP-2. Se conocen bien en la especialidad técnicas para crear y seleccionar dichas bibliotecas de presentación de péptidos aleatorias (Patente de los Estados Unidos n.º 5.223.409, de Lardner; la Patente de los Estados Unidos n.º 4.946.778, de Ladner; la Patente de los Estados Unidos n.º 5.403.484, de Lardner; la Patente de los Estados Unidos n.º 5.571.698, de Lardner; y Kay et al., *Phage Display of Peptides and Proteins* Academic Press, Inc., 1996) y se encuentran disponibles comercialmente bibliotecas de presentación de péptidos aleatorias y kits para explorar dichas bibliotecas, 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 es un péptido que codifica una sola región determinante de la complementariedad (CDR) que se une a un epítopo en un antígeno de MASP-2 e inhibe la activación de complemento dependiente de MASP-2. Los péptidos de CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") pueden obtenerse 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 a partir del ARN de células productoras de anticuerpo (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 contra MASP-2 descritos en la presente memoria se administran a un sujeto que lo necesite para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2. En algunas realizaciones, el agente inhibidor de MASP-2 es un anticuerpo monoclonal anti-MASP-2 humanizado o humano de alta afinidad con función efectora reducida.

INHIBIDORES PEPTÍDICOS

En algunos casos, el agente inhibidor de MASP-2 comprende inhibidores peptídicos de MASP-2 aislados, incluyendo inhibidores peptídicos naturales aislados e inhibidores peptídicos sintéticos que inhiben el sistema de activación de complemento dependiente de MASP-2. Como se usa en la presente memoria, la expresión "inhibidores peptídicos de MASP-2 aislados" se refiere a péptidos que inhiben la activación de complemento dependiente de MASP-2 mediante la unión a, compitiendo con MASP-2 por la unión a otra molécula de reconocimiento (por ejemplo, MBL, H-ficolina, M-ficolina o L-ficolina) en la vía de lectina y/o interactuando directamente con MASP-2 para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2, que son sustancialmente puros y se encuentran sustancialmente libres de otras sustancias con las que puedan encontrarse en la naturaleza hasta un grado práctico y adecuado para su uso previsto.

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

INHIBIDORES PEPTÍDICOS SINTÉTICOS DE MASP-2

Los péptidos inhibidores de MASP-2 útiles en los métodos de este aspecto de la divulgación se ilustran por secuencias de aminoácidos que imitan las regiones diana importantes para la función de MASP-2. Los péptidos inhibidores útiles en la práctica de los métodos de la divulgación tienen un tamaño en el intervalo de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 300 aminoácidos. La TABLA 3 proporciona una lista de péptidos inhibidores ilustrativos que pueden ser útiles en la práctica de este aspecto de la presente divulgación. Puede evaluarse la capacidad de un candidato a péptido inhibidor de MASP-2 para funcionar como agente inhibidor de MASP-2 en uno de varios ensayos, incluyendo, por ejemplo, un ensayo de escisión de C4 específico de lectina (descrito en el ejemplo 2) y un ensayo de deposición de C3b (descrito en el ejemplo 2).

En algunos casos, los péptidos inhibidores de MASP-2 proceden de polipéptidos de MASP-2 y se seleccionan de la proteína MASP-2 madura de longitud completa (SEQ ID NO: 6) o de un dominio particular de la proteína MASP-2, tal como, por ejemplo, el dominio CUBI (SEQ ID NO: 8), el dominio CUBIEGF (SEQ ID NO: 9), el dominio EGF (SEQ ID NO: 11) y el dominio de serina proteasa (SEQ ID NO: 12). Como se ha descrito anteriormente, se ha demostrado que las regiones CUBEGFCUBII son necesarias para la dimerización y la unión a MBL (Thielens et al., citado anteriormente). En particular, se ha demostrado que la secuencia peptídica TFRSDYN (SEQ ID NO: 16) en el dominio CUBI de MASP-2 está implicada en la unión a MBL en un estudio que identificó un ser humano que portaba una mutación homocigótica en Aspl05 a Glyl05, que daba como resultado la pérdida de MASP-2 del complejo de MBL (Stengaard-Pedersen, K., et al., *New England J. Med. 349*:554-560, 2003).

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

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

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

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

TABLA 3: PÉPTIDOS INHIBIDORES DE MASP-2 EJEMPLARES

SEQ ID NO	Fuente
SEQ ID NO: 6	Proteína MASP-2 humana
SEQ ID NO: 8	Dominio CUBI de MASP-2 (aa 1-121 de la SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 9	Dominios CUBIEGF de MASP-2 (aa 1-166 de la SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 10	Dominios CUBIEGFCUBII de MASP-2 (aa 1-293 de la SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 11	Dominio de EGF de MASP-2 (aa 122-166)
SEQ ID NO: 12	Dominio de serina proteasa de MASP-2 (aa 429-671)
SEQ ID NO: 16	Región de unión a MBL en MASP-2
SEQ ID NO: 3	MAp19 humano
SEQ ID NO: 21	Proteína MBL humana
SEQ ID NO: 22 OGK-X-GP, Donde "O" = hidroxiprolina y "X" es un resto de aminoácido hidrófobo	Péptido sintético de sitio de unión consenso de MBL humano y de ficolinas humanas
SEQ ID NO:23 OGKLG	Núcleo de sitio de unión de MBL humano
SEQ ID NO: 24 GLR GLQ GPO GKL GPOG	Los tripletes 6-10 de MBP humana demostraron unión a MASP-2
SEQ ID NO: 25 GPOGPOGLRGLQGPOGKLGP OGGPOGPO	Tripletes de MBP humana con GPO añadido para mejorar la formación de triples hélices
SEQ ID NO: 26 GKDGRDGTKGEKGEPGQGLR GLQGPOGKLGPOGNOGPSGS OGPKGQKGDOGKS	Tripletes 1-17 de MBP humana
SEQ ID NO: 27 GAOGSOGEKGAOGPQGPOGP OGKMGPKGEOGDO	H-ficolina humana (Hataka)
SEQ ID NO: 28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGK RGERGPOGPOGKAGPOGPNG AOGEO	L-ficolina P35 humana
SEQ ID NO: 29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI	Sitio de escisión de C4 humano
Nota: La letra "O" representa hidroxiprolina. La letra "X" es un resto hidrófobo.	

Pueden modificarse químicamente los péptidos derivados del sitio de escisión de C4 así como otros péptidos que inhiben el sitio de serina proteasa de MASP-2 de tal forma que son inhibidores de proteasa irreversibles. Por ejemplo, las modificaciones adecuadas pueden incluir, pero no se limitan necesariamente a, halometilcetonas (Br, Cl, I, F) en el extremo C-terminal, Asp o Glu o adjuntas a cadenas laterales funcionales; grupos haloacetilo (u otro α-haloacetilo) en los grupos amino u otras cadenas laterales funcionales; grupos que contienen epóxido o imina en los extremos amino o carboxilo o en cadenas laterales funcionales; o ésteres de imidato en los extremos amino o carboxilo o en cadenas laterales funcionales. Dichas modificaciones podrían tener la ventaja de inhibir de manera permanente la enzima mediante unión covalente del péptido. Esto podría dar como resultado dosis eficaces menores y/o la necesidad de una administración menos frecuente del inhibidor peptídico.

Además de los péptidos inhibidores descritos anteriormente, los péptidos inhibidores de MASP-2 útiles en el método de la divulgación incluyen péptidos que contienen la región CDR3 de unión a MASP-2 de un MoAb anti-MASP-2 obtenido como se describe en la presente memoria. La secuencia de las regiones CDR para su uso en la síntesis de péptidos puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica. La región variable de cadena pesada es un péptido que generalmente oscila entre 100 a 150 aminoácidos de longitud. La región variable de cadena ligera es un péptido que generalmente oscila entre 80 a 130 aminoácidos de longitud. Las secuencias de CDR dentro de las regiones variables de cadena pesada y ligera incluyen únicamente aproximadamente 3-25 secuencias de

aminoácidos que pueden secuenciarse fácilmente por una persona normalmente versada en la materia.

Los expertos en la materia reconocerán que las variaciones sustancialmente homólogas de los péptidos inhibidores de MASP-2 descritos anteriormente también mostrarán actividad inhibidora de MASP-2. Las variaciones ejemplares incluyen, pero no se limitan necesariamente a, péptidos que tienen inserciones, eliminaciones, reemplazos y/o aminoácidos adicionales en las porciones del extremo carboxilo o el extremo amino de los presentes péptidos y mezclas de las mismas. Por consiguiente, aquellos péptidos homólogos que tengan actividad inhibidora de MASP-2 se consideran útiles en los métodos de la presente divulgación. Los péptidos descritos también pueden incluir motivos de duplicación y otras modificaciones con sustituciones conservativas. Se describen variantes conservativas en otras partes del presente documento e incluyen el intercambio de un aminoácido por otro con similar carga, tamaño o carácter hidrófobo y similares.

Pueden modificarse los péptidos inhibidores de MASP-2 para aumentar la solubilidad y/o para maximizar la carga positiva o negativa para asemejarse lo más posible al segmento en la proteína intacta. El derivado puede tener o no la estructura de aminoácidos principal exacta de un péptido divulgado en la presente memoria, en tanto que el derivado conserve de manera funcional la propiedad deseada de inhibición de MASP-2. Las modificaciones pueden incluir la sustitución de aminoácidos por uno de los veinte aminoácidos comúnmente conocidos o con otro aminoácido, con un aminoácido derivatizado o sustituido con características auxiliares deseables, tales como resistencia a la degradación enzimática o con un D-aminoácido o sustitución con otra molécula o compuesto, tal como un carbohidrato, que imita la conformación y la función natural del aminoácido, los aminoácidos o el péptido; eliminación de aminoácidos; inserción de aminoácidos con uno de los veinte aminoácidos comúnmente conocidos o con otro aminoácido, con un aminoácido derivatizado o sustituido con características auxiliares deseables, tales como resistencia a la degradación enzimática o con un D-aminoácido o sustitución con otra molécula o compuesto, tal como un carbohidrato, que imita la conformación y la función natural del aminoácido, los aminoácidos o el péptido; o sustitución con otra molécula o compuesto, tal como un carbohidrato o monómero de ácido nucleico, que imita la conformación natural, la distribución de carga y la función del péptido parental. Los péptidos también pueden modificarse por acetilación o amidación.

La síntesis de derivados de péptidos inhibidores puede basarse en técnicas conocidas de biosíntesis de péptidos, biosíntesis de carbohidratos y similares. Como punto de partida, el experto puede basarse en un programa informático adecuado para determinar la conformación de un péptido de interés. Una vez que se conoce la conformación del péptido divulgado en la presente memoria, el experto puede determinar mediante diseño racional qué tipo de sustituciones pueden efectuarse en uno o más sitios para modelar un derivado que conserve la conformación básica y la distribución de carga del péptido parental pero que pueda poseer características que no están presentes o que están mejoradas respecto de las halladas en el péptido parental. Una vez que se han identificado los candidatos a moléculas derivadas, pueden probarse los derivados para determinar si funcionan como agentes inhibidores de MASP-2 usando los ensayos descritos en la presente memoria.

SELECCIÓN DE PÉPTIDOS INHIBIDORES DE MASP-2

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

A modo de ejemplo ilustrativo, a continuación se describe un método para preparar miméticos de péptidos de unión a MASP-2. Se polimerizan monómeros funcionales de un péptido de unión a MASP-2 conocido o la región de unión de un anticuerpo anti-MASP-2 que muestra inhibición de MASP-2 (el molde). Después se retira el molde, seguido de la polimerización de una segunda clase de monómeros en el hueco dejado por el molde, para proporcionar una nueva molécula que muestra una o más propiedades deseadas que son similares a las del molde. Además de preparar péptidos de este modo, también pueden prepararse otras moléculas de unión a MASP-2 que son agentes inhibidores de MASP-2, tales como polisacáridos, nucleósidos, fármacos, nucleoproteínas, lipoproteínas, carbohidratos, glucoproteínas, esteroides, lípidos y otros materiales biológicamente activos. Este método es útil para diseñar una gran variedad de miméticos biológicos que son más estables que sus homólogos naturales ya que normalmente se preparan mediante polimerización de radicales libres o monómeros funcionales, dando como resultado un compuesto con una cadena principal no biodegradable.

SÍNTESIS PEPTÍDICA

Pueden prepararse péptidos inhibidores de MASP-2 usando técnicas bien conocidas en la materia, tales como la técnica sintética en fase sólida descrita inicialmente por Merrifield, en *J. Amer. Chem. Soc. 85*:2149-2154, 1963.

Puede lograrse la síntesis automatizada, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos 431A de Applied Biosystems (Foster City, Calif.) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Pueden encontrarse otras técnicas, por ejemplo, en Bodanszky, M., et al., *Peptide Synthesis,* segunda edición, John Wiley & Sons, 1976, así como en otros trabajos de referencia conocidos por los expertos en la materia.

Los péptidos también pueden prepararse usando técnicas de ingeniería genética convencionales conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, puede producirse el péptido enzimáticamente insertando el ácido nucleico que codifica el péptido en un vector de expresión, expresando el ADN y traduciendo el ADN en el péptido en presencia de los aminoácidos necesarios. Después, se purifica el péptido usando técnicas cromatográficas o electroforéticas o mediante una proteína transportadora que puede fusionarse y posteriormente escindirse del péptido insertando en el vector de expresión en fase con la secuencia codificante del péptido, una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína transportadora. La fusión de proteína-péptido puede aislarse usando técnicas cromatográficas, electroforéticas o inmunológicas (tales como unión a una resina mediante un anticuerpo para la proteína transportadora). El péptido puede escindirse usando metodología química o enzimáticamente, como mediante, por ejemplo, hidrolasas.

Los péptidos inhibidores de MASP-2 que son útiles en el método de la divulgación también pueden producirse en células hospedadoras recombinantes siguiendo técnicas convencionales. Para expresar una secuencia codificante de péptido inhibidor de MASP-2, ha de unirse operativamente una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido a secuencias reguladoras que controlan la expresión transcripcional en un vector de expresión y después introducirse en una célula hospedadora. Además de secuencias reguladoras de la transcripción, tales como promotores y potenciadores, los vectores de expresión pueden incluir secuencias reguladoras de la traducción y un gen marcador, que son adecuadas para la selección de células que portan el vector de expresión.

Pueden sintetizarse moléculas de ácido nucleico que codifican un péptido inhibidor de MASP-2 con "máquinas génicas" usando protocolos tales como el método de fosforamidita. En caso de que se necesite ADN bicatenario sintetizado químicamente para una aplicación, tal como la síntesis de un gen o de un fragmento génico, cada hebra complementaria se prepara por separado. La producción de genes cortos (60 a 80 pares de bases) es técnicamente sencilla y puede lograrse sintetizando las hebras complementarias y después hibridándolas. Para la producción de genes más largos, los genes sintéticos (bicatenarios) se ensamblan de manera modular a partir de fragmentos monocatenarios que tienen de 20 a 100 nucleótidos de longitud. Para una revisión de la síntesis de polinucleótidos, véase, por ejemplo, Glick y Pasternak, "*Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA",* ASM Press, 1994; Itakura, K., et al., *Annu. Rev. Biochem. 53*:323, 1984; y Climie, S., et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87*:633, 1990.

INHIBIDORES DE MOLÉCULA PEQUEÑA

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

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

La lista de estructuras de molécula pequeña que se identifican mediante un método computacional como potenciales inhibidores de MASP-2 se explora usando un ensayo de unión a MASP-2 como se describe en el ejemplo 10. Después, se ensayan las moléculas pequeñas que se observa que se unen a MASP-2 en un ensayo funcional, tal como se describe en el ejemplo 2 para determinar si inhiben la activación de complemento dependiente de MASP-2.

RECEPTORES SOLUBLES DE MASP-2

Se cree que otros agentes inhibidores de MASP-2 incluyen los receptores solubles de MASP-2, que pueden producirse usando técnicas conocidas por las personas normalmente versadas en la materia.

INHIBIDORES DE LA EXPRESIÓN DE MASP-2

En otro caso, el agente inhibidor de MASP-2 es un inhibidor de la expresión de MASP-2 capaz de inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2. En la práctica de este aspecto de la divulgación, los inhibidores

de la expresión de MASP-2 representativos incluyen moléculas de ácido nucleico antisentido para MASP-2 (tales como ARN antisentido, ADN antisentido u oligonucleótidos antisentido), ribocimas de MASP-2 y moléculas de ARNi para MASP-2.

Las moléculas de ARN y ADN antisentido actúan mediante el bloqueo directo de la traducción del ARNm de MASP-2 hibridándose con el ARNm de MASP-2 e impidiendo la traducción de la proteína MASP-2. Puede construirse de diversos modos una molécula de ácido nucleico antisentido a condición de que sea capaz de interferir con la expresión de MASP-2. Por ejemplo, puede construirse una molécula de ácido nucleico invirtiendo la región codificante (o una parte de la misma) del ADNc de MASP-2 (SEQ ID NO: 4) en relación a su orientación normal de transcripción para permitir la transcripción de su complemento.

Normalmente, la molécula de ácido nucleico antisentido es sustancialmente idéntica a al menos una parte del gen o los genes diana. El ácido nucleico, sin embargo, no es necesariamente perfectamente idéntico para inhibir la expresión. En general, puede usarse una mayor homología para compensar el uso de una molécula de ácido nucleico antisentido más corta. El porcentaje mínimo de identidad es normalmente mayor de aproximadamente el 65%, pero un mayor porcentaje de identidad puede ejercer una represión de la expresión más eficaz de la secuencia endógena. Normalmente se prefiere un porcentaje de identidad sustancialmente mayor de aproximadamente el 80%, aunque típicamente se prefiere una identidad absoluta de aproximadamente el 95%.

La molécula de ácido nucleico antisentido no tiene necesariamente el mismo patrón de intrones o exones que el gen diana y pueden ser igualmente eficaces segmentos no codificantes del gen diana para lograr la supresión antisentido de la expresión del gen diana que los segmentos codificantes. Puede usarse una secuencia de ADN de al menos aproximadamente 8 nucleótidos como molécula de ácido nucleico antisentido, aunque es preferible una secuencia más larga. Un ejemplo representativo de un agente inhibidor de MASP-2 útil es una molécula de ácido nucleico de MASP-2 antisentido que es al menos un noventa por ciento idéntica al complemento del ADNc de MASP-2 que consiste en la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 4. La secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 4 codifica la proteína MASP-2 que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5.

El dirigir oligonucleótidos antisentido para que se unan al ARNm de MASP-2 es otro mecanismo que puede usarse para reducir el nivel de síntesis de proteína MASP-2. Por ejemplo, se inhibe la síntesis de poligalacturonasa y del receptor de acetilcolina de tipo 2 muscarínico mediante oligonucleótidos antisentido dirigidos contra sus respectivas secuencias de ARNm (Patente de los Estados Unidos n.º 5.739.119, de Cheng y Patente de los Estados Unidos n.º 5.759.829, de Shewmaker). Además, se han demostrado ejemplos de inhibición antisentido con la proteína nuclear, cilina, el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDG1), ICAM-1, E-selectina, STK-1, el receptor GABAa estriatal y EGF humano (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.801.154, de Baracchini; la Patente de los Estados Unidos n.º 5.789.573, de Baker; la Patente de los Estados Unidos n.º 5.718.709, de Considine; y la Patente de los Estados Unidos n.º 5.610.288, de Reubenstein).

Se ha descrito un sistema que permite a una persona normalmente versada en la materia determinar qué oligonucleótidos son útiles en la divulgación, que implica sondar respecto de sitios adecuados en el ARNm diana usando escisión con RNasa H como indicador para la accesibilidad de las secuencias dentro de los transcritos. Scherr, M., et al., *Nucleic Acids Res. 26*:5079-5085, 1998; Lloyd, et al., *Nucleic Acids Res. 29*:3665-3673, 2001. Se añade una mezcla de oligonucleótidos antisentido que son complementarios para ciertas regiones del transcrito de MASP-2 a extractos celulares que expresan MASP-2, tales como hepatocitos y se hibridan para crear un sitio vulnerable a la RNasa H. Este método puede combinarse con selección de secuencias asistida por ordenador que puede predecir una selección de secuencia óptima para composiciones antisentido basándose en su capacidad relativa para formar dímeros, horquillas u otras estructuras secundarias que podrían reducir o impedir la unión específica al ARNm diana en una célula hospedadora. Este análisis de estructura secundaria y las consideraciones de selección del sitio diana puede llevare a cabo usando el programa de análisis de cebadores OLIGO (Rychlik, I., 1997) y el programa informático del algoritmo BLASTN 2.0.5 (Altschul, S.F., et al., *Nucl. Acids Res. 25*:3389-3402, 1997). Los compuestos antisentido dirigidos contra la secuencia diana comprenden preferentemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. Se prefieren particularmente oligonucleótidos antisentido que comprenden de aproximadamente 9 a aproximadamente 35 nucleótidos. Los inventores contemplan todas las composiciones de oligonucleótidos en el intervalo de 9 a 35 nucleótidos (es decir, aquellas con 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 bases de longitud) como altamente preferidas para la práctica de métodos basados en oligonucleótidos antisentido de la divulgación. Las regiones diana altamente preferidas del ARNm de MASP-2 son aquellas que se encuentran en o próximas al codón de inicio de la traducción AUG y aquellas secuencias que son sustancialmente complementarias a regiones 5' del ARNm, por ejemplo, entre las regiones de -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen *MASP-2* (SEQ ID NO: 4). En la TABLA 4 se proporcionan inhibidores de la expresión de MASP-2 ejemplares.

TABLA 4: INHIBIDORES DE LA EXPRESIÓN DE MASP-2 EJEMPLARES

SEQ ID NO: 30 (nucleótidos 22-680 de la SEQ ID NO: 4)	Secuencia de ácido nucleico de ADNc de MASP-2 (SEQ ID NO: 4) que codifica CUBIEGF
SEQ ID NO: 31 5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC3	Nucleótidos 12-45 de la SEQ ID NO:4, incluyendo el sitio de inicio de la traducción de MASP-2 (sentido)
SEQ ID NO: 32 5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3'	Nucleótidos 361-396 de la SEQ ID NO:4 que codifica una región que comprende el sitio de unión a MBL de MASP-2 (sentido)
SEQ ID NO: 33 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAAA3'	Nucleótidos 610-642 de la SEQ ID NO:4 que codifica una región que comprende el dominio CUBII

Como se ha indicado anteriormente, el término "oligonucleótido", como según se usa en la presente memoria, se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término también abarca las oligonucleobases formadas por nucleótidos de origen natural, azúcares y engarces internucleósido covalentes (armazón), así como oligonucleótidos que tienen modificaciones de origen no natural. Estas modificaciones permiten introducir ciertas propiedades deseables que no se ofrecen mediante los oligonucleótidos de origen natural, tales como propiedades tóxicas reducidas, aumento de la estabilidad frente a la degradación por proteasas y mejor captación celular. En casos ilustrativos, los compuestos antisentido de la divulgación diferentes del ADN nativo por la modificación del armazón de fosfodiéster para prolongar la vida del oligonucleótido antisentido en el que los sustituyentes fosfato se reemplazan por fosforotioatos. Igualmente, puede sustituirse uno o ambos extremos del oligonucleótido mediante uno o más derivado de acridina que se intercalan entre pares de bases adyacentes dentro de una hebra de ácido nucleico.

Otra alternativa al antisentido es el uso de "interferencia de ARN" (iARN). Los ARN bicatenarios (ARNbc) pueden provocar silenciamiento génico en mamíferos *in vivo*. La función natural de la iARN y la co-supresión parece ser la protección del genoma contra la invasión por elementos genéticos móviles, tales como retrotransposones y virus que producen ARN o ARNbc aberrante en la célula hospedadora cuando se activan (véase, por ejemplo, Jensen, J., et al., *Nat. Genet. 21*:209-12, 1999). La molécula de ARN bicatenario puede prepararse sintetizando dos hebras de ARN capaces de formar una molécula de ARN bicatenario, teniendo cada una de ellas una longitud de aproximadamente 19 a 25 (por ejemplo, 19-23) nucleótidos. Por ejemplo, una molécula de ARNbc útil en los métodos de la divulgación puede comprender el ARN correspondiente a una secuencia y su complemento listado en la TABLA 4. Preferentemente, al menos una hebra de ARN tiene un saliente 3' de 1-5 nucleótidos. Las hebras de ARN sintetizadas se combinan en condiciones que forman una molécula bicatenaria. La secuencia de ARN puede comprender al menos una porción de 8 nucleótidos de la SEQ ID NO: 4 con una longitud total de 25 nucleótidos o menos. Se encuentra dentro de las capacidades de una persona normalmente versada en la materia el diseño de secuencias de ARNpi para una diana dada. Hay disponibles servicios comerciales que diseñan la secuencia de ARNpi y garantizan un silenciamiento génico de al menos el 70% de la expresión (Qiagen, Valencia, Calif).

El ARNbc puede administrarse como una composición farmacéutica y llevarse a cabo por métodos conocidos, en donde se introduce un ácido nucleico en una célula diana deseada. Los métodos de transferencia génica comúnmente usados incluyen fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, microinyección y métodos víricos. Dichos métodos se enseñan en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology,* John Wiley & Sons, Inc., 1993.

También pueden utilizarse ribocimas para reducir la cantidad y/o la actividad biológica de MASP-2, tal como ribocimas que se dirigen al ARNm de MASP-2. Las ribocimas son moléculas catalíticas del ARN que pueden escindir moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia que es completa o parcialmente homóloga a la secuencia de la ribocima. Es posible diseñar transgenes de ribocimas que codifican ribocimas de ARN que se emparejan específicamente con un ARN diana y escinden el armazón fosfodiéster en una ubicación específica, inactivando de este modo el ARN diana. Al llevar a cabo esta escisión, la ribocima en sí no se altera y es por lo tanto capaz de reciclarse y escindir otras moléculas. La inclusión de secuencias de ribocima en los ARN antisentido les confiere actividad escisora de ARN, aumentando de este modo la actividad de las construcciones antisentido.

Las ribocimas útiles en la práctica de la divulgación comprenden normalmente una región de hibridación de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a al menos parte del ARNm de MASP-2 diana y una región catalítica que está adaptada para escindir el ARNm de MASP-2 diana (véase, de manera general, los documentos EPA n.º 0 321 201; WO88/04300; Haseloff, J., et al., *Nature 334*:585-591, 1988; Fedor, M.J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8*7:1668-1672, 1990; Cech, T.R., et al., *Ann. Rev. Biochem. 55*:599-629, 1986).

Las ribocimas pueden dirigirse directamente a células en forma de oligonucleótidos de ARN que incorporan secuencias de ribocima o introducirse en la célula en forma de un vector de expresión que codifica el ARN de

ribocima deseado. Pueden usarse y aplicarse las ribocimas prácticamente del mismo modo al descrito para los polinucleótidos antisentido.

Las moléculas de ARN y ADN antisentido, ribocimas y ARNi útiles en los métodos de la divulgación pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de ADN y ARN. Estos incluyen técnicas para sintetizar químicamente oligodesoxirribonucleótidos y oligorribonucleótidos bien conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, síntesis química de fosforamidita en fase sólida. Como alternativa, las moléculas de ARN pueden generarse mediante la transcripción *in vitro* e *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN antisentido. Dichas secuencias de ADN pueden incorporarse en una gran variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados, tales como los promotores de polimerasa T7 y SP6. Como alternativa, pueden introducirse de manera estable en líneas celulares construcciones de ADNc antisentido que sintetizan ARN antisentido de manera constitutiva, dependiendo del promotor usado.

Pueden introducirse diversas modificaciones bien conocidas de las moléculas de ADN como medio para aumentar la estabilidad y la semivida. Las modificaciones útiles incluyen, pero sin limitación, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos en los extremos 5' y/o 3' de la molécula o el uso de fosforotioato o 2' O-metilo en lugar de engarces fosfodiesterasa dentro de la cadena principal del oligodesoxirribonucleótido.

V. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

DOSIFICACIÓN

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones para inhibir los efectos adversos de la activación de complemento dependiente de MASP-2 en un sujeto que padece una enfermedad o afección divulgada en la presente memoria, que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los agentes inhibidores de MASP-2 pueden administrarse a un sujeto que lo necesite, en dosis terapéuticamente eficaces para tratar o mejorar las afecciones asociadas con la activación de complemento dependiente de MASP-2. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad del agente inhibidor de MASP-2 suficiente para dar como resultado una mejora de los síntomas asociados con la enfermedad o afección.

Puede determinarse la toxicidad y la eficacia terapéutica de los agentes inhibidores de MASP-2 mediante procedimientos farmacéuticos estándar que emplean modelos animales experimentales, tales como el modelo de ratón MASP-2 -/- murino que expresa el transgén de MASP-2 humana descrito en el ejemplo 1. Usando dichos modelos animales, pueden determinarse el NOAEL (nivel sin efectos adversos observados) y la MED (la dosis mínima eficaz) usando métodos convencionales. La relación de dosis entre NOAEL y MED es la relación terapéutica, que se expresa como la relación NOAEL/MED. Se prefieren especialmente agentes inhibidores de MASP-2 que muestran grandes relaciones terapéuticas. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y los estudios en animales pueden usarse para formular una serie de dosis para su uso en seres humanos. La dosis del agente inhibidor de MASP-2 se encuentra preferentemente dentro del intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la MED con poca o nula toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada.

Para cualquier formulación del compuesto, puede estimarse la dosis terapéuticamente eficaz usando modelos animales. Por ejemplo, puede formularse una dosis en un modelo animal para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluye la MED. También pueden medirse los niveles cuantitativos de agente inhibidor de MASP-2 en el plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

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

En general, la dosis de composiciones administradas que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 varía dependiendo de factores tales como la edad, el peso, la altura, el sexo, el estado médico general y el historial médico previo del sujeto. A modo ilustrativo, se pueden administrar agentes inhibidores de MASP-2, tales como anticuerpos anti-MASP-2, a intervalos de dosis de aproximadamente 0,010 a 10,0 mg/kg, preferentemente de 0,010 a 1,0 mg/kg, más preferentemente, de 0,010 a 0,1 mg/kg de peso corporal del sujeto. En algunos casos, la composición comprende una combinación de anticuerpos anti-MASP-2 y péptidos inhibidores de MASP-2.

La eficacia terapéutica de las composiciones inhibidoras de MASP-2 y los métodos de la presente divulgación en un sujeto dado y las dosis adecuadas, pueden determinarse de acuerdo con ensayos de complemento bien conocidos por los expertos en la materia. El complemento genera numerosos productos específicos. Durante la última década, se han desarrollado ensayos sensibles y específicos y se encuentran disponibles comercialmente para la mayoría de estos producto de activación, incluyendo los pequeños fragmentos de activación C3a, C4a y C5a y los grandes fragmentos de activación, iC3b, C4d, Bh y sC5b-9. La mayoría de estos ensayos utiliza anticuerpos monoclonales

que reaccionan con nuevos antígenos (neoantígenos) expuestos sobre el fragmento, pero no sobre las proteínas nativas en las que se forman, haciendo que estos ensayos sean muy sencillos y específicos. La mayoría se basan en la tecnología de ELISA, aunque en ocasiones se sigue usando radioinmunoensayo para C3a y C5a. Estos últimos ensayos miden tanto los fragmentos no procesados como sus fragmentos "desArg", que son las principales formas encontradas en la circulación. Los fragmentos no procesados y $C5a_{desArg}$ se eliminan rápidamente por la unión a receptores de la superficie celular y por lo tanto, se encuentran a muy bajas concentraciones, mientras que $C3a_{desArg}$ no se une a las células y se acumula en el plasma. La medición de C3a proporciona un indicador sensible independiente de la vía para la activación del complemento. Puede evaluarse la activación de la vía alternativa midiendo el fragmento Bb. La detección del producto en fase fluida de la activación de la vía de ataque a membrana, sC5b-9, proporciona pruebas de que se está activando el complemento hasta la compleción. Debido a que las vías tanto de lectina como la clásica generan los mismos productos de activación, C4a y C4d, la medición de estos dos fragmentos no proporciona información acerca de cuál de estas dos vías ha generado los productos de activación.

La inhibición de la activación de complemento dependiente de MASP-2 se caracteriza por al menos uno de los siguientes cambios en un componente del sistema de complemento que se produce como resultado de la administración de un agente inhibidor de MASP-2 de acuerdo con los métodos de la divulgación: la inhibición de la generación o producción de los productos de activación de complemento dependiente 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 escisión de C4 y la deposición de C4b (medida, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 10) o la reducción de la escisión de C3 y la deposición de C3b (medida, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 10).

AGENTES ADICIONALES

Las composiciones y métodos que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 pueden comprender opcionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales, que pueden aumentar la actividad del agente inhibidor de MASP-2 o que proporcionan funciones terapéuticas relacionadas de una manera aditiva o sinérgica. Por ejemplo, en el contexto del tratamiento de un sujeto que padece PTT, en donde el sujeto es positivo para un inhibidor de ADAM-TS13, pueden administrarse uno o más agentes inhibidores de MASP-2 en combinación (incluyendo coadministración) con uno o más agentes inmunosupresores. Los agentes inmunosupresores adecuados incluyen: corticosteroides, rituxán, ciclosporina y similares. En el contexto del tratamiento de un sujeto que padece o está en riesgo de desarrollar, SHU o SHUa, pueden administrarse uno o más agentes inhibidores de MASP-2 en combinación (incluyendo coadministración) con un antibiótico adecuado. En el contexto del tratamiento de un sujeto que padece o está en riesgo de desarrollar SHUa, pueden administrarse uno o más agentes inhibidores de MASP-2 en combinación (incluyendo coadministración) con otros agentes inhibidores del complemento, tales como eculizumab (Soliris), TT-30, anticuerpo para el factor B u otros agentes que inhiben los componentes terminales del complemento o la amplificación de la vía alternativa.

La inclusión y selección de agentes adicionales se determinará para lograr un resultado terapéutico deseado. En algunos casos, el agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse en combinación con uno o más agentes antiinflamatorios y/o analgésicos. Los agentes antiinflamatorios y/o analgésicos incluyen: antagonistas del receptor de serotonina; agonistas del receptor de serotonina; antagonistas del receptor de histamina; antagonistas del receptor de bradiquinina; inhibidores de calicreína; antagonistas del receptor de taquicinina, incluyendo antagonistas del subtipo de receptor de $neurocinina_1$ y $neurocinina_2$; antagonistas del receptor de péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP); antagonistas del receptor de interleucina; inhibidores de enzimas activas en la vía sintética para los metabolitos del ácido araquidónico, incluyendo inhibidores de fosfolipasa, incluyendo inhibidores de la isoforma PLA_2 e inhibidores de la isoforma PLC_γ, inhibidores de ciclooxigenasa (COX) (que pueden ser inhibidores de COX-1, COX-2 o inhibidores no selectivos de COX-1 y -2), inhibidores de lipooxigenasa; antagonistas del receptor de prostanoides, incluyendo antagonistas del subtipo de receptor EP-1 y EP-4 de eicosanoides y antagonistas del subtipo de receptor de tromboxano; antagonistas del receptor de leucotrienos, incluyendo antagonistas del subtipo de receptor B_4 de leucotrienos y antagonistas del subtipo de receptor D_4 de leucotrienos; agonistas del receptor opioide, incluyendo agonistas del subtipo de receptor μ-opioide, δ-opioide y κ-opioide; agonistas y antagonistas de receptor de purina, incluyendo antagonistas del receptor P_{2X} y agonistas del receptor P_{2Y}; abridores de canales de potasio sensibles a adenosín trifosfato (ATP); inhibidores de MAP cinasa; inhibidores nicotínicos de acetilcolina; y agonistas del receptor alfa-adrenérgico (incluyendo agonistas de alfa-1, alfa-2 y agonistas no selectivos de alfa-1 y 2).

Los agentes inhibidores de MASP-2 de la presente divulgación también pueden administrarse en combinación con uno o más inhibidores del complemento diferentes, tales como un inhibidor de C5. Hasta la fecha, Eculizumab (Solaris®), un anticuerpo contra C5, es el único fármaco que actúa de manera selectiva sobre el complemento que ha sido aprobado para su uso en seres humanos. Sin embargo, se ha demostrado que algunos agentes farmacológicos bloquean el complemento *in vivo*. El K76COOH y el mesilato de nafamstat son dos agentes que han mostrado cierta eficacia en modelos animales de trasplante (Miyagawa, S., et al., *Transplant Proc. 24*:483-484, 1992). También se ha demostrado que las heparinas de bajo peso molecular son eficaces para regular la actividad del complemento (Edens, R.E., et al., *Complement Today,* págs. 96-120, Basilea: Karger, 1993). Se cree que estos inhibidores de molécula pequeña pueden ser útiles como agentes para su uso en combinación con los agentes inhibidores de MASP-2 de la presente divulgación.

Pueden ser útiles otros inhibidores del complemento de origen natural en combinación con los agentes inhibidores de MASP-2 de la presente divulgación. Los inhibidores biológicos del complemento incluyen factor 1 de complemento soluble (sCR1). Este es un inhibidor de origen natural que puede hallarse en la membrana externa de células humanas. Otros inhibidores de membrana incluyen DAF, MCP y CD59. Se han probado respecto de su actividad anti-complemento *in vitro* e *in vivo* formas recombinantes. Se ha demostrado que sCR1 es eficaz en xenotrasplantes, en donde el sistema de complemento (tanto alternativo como clásico) proporciona el desencadenante para un síndrome de rechazo hiperactivo a los pocos minutos de perfundir sangre por el órgano recién trasplantado (Platt, J.L., et al., *Immunol. Today 11*:450-6, 1990; Marino, I.R., et al., *Transplant Proc. 1071*:6, 1990; Johnstone, P.S., et al., *Transplantation 54*:573-6, 1992). El uso de sCR1 es protector y prolonga el tiempo de supervivencia del órgano trasplantado, lo que implica a la vía de complemento en la patogénesis de la supervivencia del órgano (Leventhal, J.R., et al., *Transplantation* 55:857-66, 1993; Pruitt, S.K., et al., *Transplantation* 57:363-70, 1994).

Los inhibidores del complemento adicionales adecuados para su uso en combinación con las composiciones de la presente divulgación también incluyen, a modo de ejemplo, MoAb tales como un anticuerpo anti-C5 (por ejemplo, eculizumab) que se encuentra en desarrollo por Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut, y MoAb anti-properdina.

PORTADORES FARMACÉUTICOS Y VEHÍCULOS DE SUMINISTRO

En general, las composiciones de agente inhibidor de MASP-2 de la presente divulgación, combinadas con cualquier otro agente terapéutico seleccionado, están contenidas de manera adecuada en un portador farmacéuticamente aceptable. El portador es no tóxico, biocompatible y se selecciona para que no afecte de manera perjudicial a la actividad del agente inhibidor de MASP-2 (y cualquier otro agente terapéutico combinado con el mismo). Se describen portadores farmacéuticamente aceptables ejemplares para péptidos en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.211.657 de Yamada. Los anticuerpos anti-MASP-2 y los péptidos inhibidores útiles en la divulgación pueden formularse en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, en gel, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inhalantes e inyecciones que permiten la administración oral, parenteral o quirúrgica. La divulgación también contempla la administración local de las composiciones mediante el recubrimiento de dispositivos médicos y similares.

Los portadores adecuados para suministro parenteral mediante suministro inyectable, por infusión o irrigación y tópico incluyen agua destilada, suero salino fisiológico tamponado con fosfato, solución de Ringer normal o lactada, solución de dextrosa, solución de Hank o propanodiol. Además, pueden usarse aceites estériles no volátiles como disolvente o medio de suspensión. A tal efecto, puede emplearse cualquier aceite biocompatible, incluyendo mono o diglicéridos estériles. Además, los ácidos grasos, tales como el ácido oleico, son útiles en la preparación de inyectables. El portador y el agente pueden formularse en forma de líquido, suspensión, gel polimerizable o no polimerizable, pasta o salva.

El portador también puede comprender un vehículo de suministro para mantener (es decir, extender, retrasar o regular) el suministro de los agentes o para mejorar el suministro, la captación, la estabilidad o la farmacocinética de los agentes terapéuticos. Dicho vehículo de suministro puede incluir, a modo de ejemplo no limitante, micropartículas, microesferas, nanoesferas o nanopartículas formadas por proteínas, liposomas, carbohidratos, compuestos orgánicos sintéticos, compuestos inorgánicos, hidrogeles poliméricos o copoliméricos y micelas poliméricas. Los sistemas de suministro en hidrogel y micelares adecuados incluyen los copolímeros de PEO:PHB:PEO y complejos de copolímero/ciclodextrina divulgados en el documento WO 2004/009664 A2 y los complejos de PEO y PEO/ciclodextrina divulgados en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 2002/0019369 A1. Dichos hidrogeles pueden inyectarse localmente en el sitio de acción previsto o por vía subcutánea o intramuscular para formar un depósito de liberación sostenida.

Para suministro intraarticular, el agente inhibidor de MASP-2 puede portarse en los portadores líquidos o en gel anteriormente descritos que sean inyectables, los vehículos de suministro de liberación sostenida anteriormente descritos que sean inyectables o un ácido hialurónico o un derivado del ácido hialurónico.

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

Para administración tópica, el agente inhibidor de MASP-2 puede portarse en pomada, loción, crema, gel, gotas, supositorios, pulverizador, líquido o polvo o en sistemas de suministro en gel o microcapsulares mediante un parche transdérmico.

Se encuentran en desarrollo diversos sistemas de suministro nasal y pulmonar, incluyendo aerosoles, inhaladores de dosis medida, inhaladores de polvo seco y nebulizadores y pueden adaptarse de manera adecuada para el suministro de la presente divulgación en un vehículo de suministro en aerosol, inhalante o nebulizado, respectivamente.

Para el suministro intratecal (IT) o intracerebroventricular (ICV), pueden usarse sistemas de suministro adecuadamente estériles (por ejemplo, líquidos, geles, suspensiones, etc.) para administrar la presente divulgación.

Las composiciones de la presente divulgación también pueden incluir excipientes biocompatibles, tales como agentes dispersantes o humectantes, agentes de suspensión, diluyentes, tampones, mejoradores de la penetración, emulsionantes, aglutinantes, espesantes, agentes aromatizantes (para administración oral).

PORTADORES FARMACÉUTICOS PARA ANTICUERPOS Y PÉPTIDOS

Más específicamente, con respecto a anticuerpos anti-MASP-2 y péptidos inhibidores, las formulaciones ejemplares pueden administrarse por vía parenteral en forma de dosis inyectables de una solución o suspensión del compuesto en un diluyente fisiológicamente aceptable con un portador farmacéutico que puede ser un líquido estéril, tal como agua, aceites, suero salino, glicerol o etanol. Además, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH y similares en las composiciones que comprenden anticuerpos anti-MASP-2 y péptidos inhibidores. Algunos 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 portadores líquidos preferidos para soluciones inyectables.

Los anticuerpos anti-MASP-2 y los péptidos inhibidores también pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o una preparación de implante que puede formularse de tal modo que permita la liberación sostenida o por impulsos de los principios activos.

PORTADORES FARMACÉUTICAMENTE ACEPTABLES PARA INHIBIDORES DE LA EXPRESIÓN

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

Las composiciones farmacéuticas que incluyen inhibidores de la expresión pueden incluir, pero sin limitación, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una serie de componentes que incluyen, pero sin limitación, líquidos preformados, sólidos auto-emulsionantes y semisólidos auto-emulsionantes. La preparación de dichas composiciones implica normalmente combinar el inhibidor de la expresión con uno o más de los siguientes: tampones, antioxidantes, polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas, aminoácidos, carbohidratos, incluyendo glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes, tales como EDTA, glutatión y otros estabilizantes y excipientes. Son ejemplos de diluyentes adecuados el suero salino tamponado neutro o el suero salino mezclado con seroalbúmina inespecífica.

En algunas realizaciones, las composiciones pueden prepararse y formularse en forma de emulsiones que son típicamente sistemas heterogéneos de un líquido disperso en otro en forma de microgotas (véase, Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms,* Vol. 1, Rieger y Banker (eds.), Marcek Dekker, Inc., N.Y., 1988). Los ejemplos de emulsionantes de origen natural usados en formulaciones en emulsión incluyen goma arábiga, cera de abejas, lanolina, lecitina y fosfatidas.

En un caso, las composiciones que incluyen ácidos nucleicos pueden formularse en forma de microemulsiones. Una microemulsión, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un sistema de agua, aceite y un anfífilo, que es una solución líquida individual ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable (véase Rosoff en *Pharmaceutical Dosage Forms,* Vol. 1). El método de la divulgación también puede usar liposomas para la transferencia y suministro de oligonucleótidos antisentido al sitio deseado.

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

MODOS DE ADMINISTRACIÓN

Las composiciones farmacéuticas que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 pueden administrarse de diversas formas dependiendo de si es más adecuado un modo de administración local o sistémico para la afección que se esté tratando. Además, como se describe en la presente memoria con respecto a los procedimientos de reperfusión extracorpórea, los agentes inhibidores de MASP-2 pueden administrarse mediante la introducción de las composiciones de la presente invención en la sangre o plasma en recirculación. Además, las composiciones de la presente invención pueden suministrarse recubriendo o incorporando las composiciones sobre o dentro de un dispositivo médico implantable.

SUMINISTRO SISTÉMICO

Como se usa en la presente memoria, se pretende que las expresiones "suministro sistémico" y "administración sistémica" incluyan, pero sin limitación, las vías oral y parenteral, incluyendo intramuscular (IM), subcutánea, intravenosa (IV), intra-arterial, inhalatoria, sublingual, bucal, tópica, transdérmica, nasal, rectal, vaginal y otras vías

de administración que dan como resultado de manera eficaz la dispersión del agente suministrado en uno solo o en múltiples sitios de acción terapéutica prevista. Las vías de suministro sistémico preferidas para las presentes composiciones incluyen intravenosa, intramuscular, subcutánea e inhalatoria. Se apreciará que la vía de administración sistémica exacta para los agentes seleccionados utilizado en las composiciones particulares de la presente divulgación se determinará, en parte, para tener en cuenta la susceptibilidad del agente a las vías de transformación metabólica asociadas con una vía de administración concreta. Por ejemplo, los agentes peptidérgicos pueden administrarse de manera más adecuada por vías distintas de la oral.

Los anticuerpos y polipéptidos inhibidores de MASP-2 pueden suministrarse a un sujeto que lo necesite por cualquier medio adecuado. Los métodos para suministrar anticuerpos y polipéptidos contra MASP-2 incluyen administración por las vías de administración oral, pulmonar, parenteral (por ejemplo, inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (IV) o subcutánea), inhalación (tal como mediante una formulación en polvo fino), transdérmica, nasal, vaginal, rectal o sublingual y pueden formularse en formas farmacéuticas adecuadas para cada vía de administración.

A modo de ejemplo representativo, los anticuerpos y péptidos inhibidores de MASP-2 pueden introducirse en un organismo vivo mediante aplicación a una membrana corporal capaz de absorber los polipéptidos, por ejemplo, las membranas nasal, gastrointestinal y rectal. Los polipéptidos se aplican normalmente a la membrana absorbente junto con un potenciador de la permeación. (Véase, por ejemplo, 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 del ácido fusídico, un tensioactivo esteroideo que tiene una estructura similar a las sales biliares y se ha usado como potenciador de la permeación para suministro nasal. (Lee, W.A., *Biopharm. 22,* noviembre/diciembre. 1990.)

Los anticuerpos y polipéptidos inhibidores de MASP-2 pueden introducirse en asociación con otra molécula, tal como un lípido, para proteger a los polipéptidos frente a la degradación enzimática. Por ejemplo, la unión covalente de polímeros, especialmente de polietilenglicol (PEG), se ha usado para proteger a ciertas proteínas frente a la hidrólisis enzimática en el organismo, prolongando de este modo su semivida (Fuertges, F., et al., *J. Controlled Release 11*:139, 1990). Se ha informado de diversos sistemas poliméricos para el suministro 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 estabilidad en suero y semividas en circulación mejoradas (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.741.516, de Webb). Además, se han revisado diversos métodos para preparaciones liposómicas y similares a liposómicas como potenciales portadores farmacológicos (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.567.434, de Szoka; la Patente de los Estados Unidos n.º 5.552.157, de Yagi; la Patente de los Estados Unidos n.º 5.565.213, de Nakamori; la Patente de los Estados Unidos n.º 5.738.868, de Shinkarenko; y la Patente de los Estados Unidos n.º 5.795.587, de Gao).

Para aplicaciones transdérmicas, los anticuerpos y polipéptidos inhibidores de MASP-2 pueden combinarse con otros ingredientes adecuados, tales como portadores y/o adyuvantes. No hay límites en cuanto a la naturaleza de dichos otros ingredientes, salvo que han de ser farmacéuticamente aceptables para su administración prevista y no pueden degradar la actividad de los principios activos de la composición. Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen pomadas, cremas, geles o suspensiones, con o sin colágeno purificado. Los anticuerpos y polipéptidos inhibidores de MASP-2 también pueden impregnarse en parches transdérmicos, emplastos y vendajes, preferentemente en forma líquida o semilíquida.

La composición de la presente invención puede administrarse por vía sistémica de manera periódica a intervalos determinados para mantener un nivel deseado de efecto terapéutico. Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse, tal como por inyección subcutánea, cada dos a cuatro semanas o intervalos con menor frecuencia. La pauta posológica la determinará el médico tomando en consideración diversos factores que pueden afectar a la acción de la combinación de agentes. Estos factores incluirán el alcance del progreso de la afección que se esté tratando, la edad del paciente, su sexo y peso y otros factores clínicos. La dosis para cada agente individual variará en función del agente inhibidor de MASP-2 que se incluya en la composición, así como de la presencia y la naturaleza de cualquier vehículo de suministro farmacológico (por ejemplo, un vehículo de suministro de liberación sostenida). Además, puede ajustarse la cantidad de dosis para tener en cuenta la variación en la frecuencia de administración y el comportamiento farmacocinético de los agentes suministrados.

SUMINISTRO LOCAL

Como se usa en la presente memoria, el término "local" abarca la aplicación de un fármaco dentro o alrededor de un sitio de acción localizada previsto y puede incluir, por ejemplo, suministro tópico a la piel u otros tejidos afectados, suministro oftálmico, y administración, colocación o irrigación intratecal (IT), intracerebroventricular (ICV), intraarticular, intracavidad, intracraneal o intravesicular. Puede preferirse la administración local para posibilitar la

administración de una dosis menor, para evitar efectos secundarios sistémicos y posibilitar un control más preciso de la pauta de suministro y la concentración de los principios activos en el sitio de suministro local. La administración local proporciona una concentración conocida en el sitio diana, independientemente de la variabilidad en el metabolismo entre pacientes, el flujo sanguíneo, etc. También se proporciona un control mejorado de la dosis mediante el modo de suministro directo.

El suministro local de un agente inhibidor de MASP-2 puede lograrse en el contexto de métodos quirúrgicos para tratar una enfermedad o afección, tal como, por ejemplo, durante procedimientos tales como cirugía de derivación arterial, aterectomía, procedimientos con láser, procedimientos con ultrasonidos, angioplastia de balón y colocación de un stent. Por ejemplo, puede administrarse un inhibidor de MASP-2 a un sujeto junto con un procedimiento de angioplastia de balón. Un procedimiento de angioplastia de balón implica insertar un catéter que tiene un balón deshinchado en una arteria. El balón deshinchado se posiciona próximo a la placa ateroesclerótica y se hincha, de tal modo que la placa queda comprimida contra la pared vascular. Como resultado, la superficie del balón queda en contacto con la capa de células endoteliales vasculares sobre la superficie del vaso sanguíneo. El agente inhibidor de MASP-2 puede unirse al catéter para angioplastia de balón de un modo que permita la liberación del agente en el sitio de la placa ateroesclerótica. El agente puede unirse al catéter de balón de acuerdo con procedimientos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, el agente puede almacenarse en un compartimento del catéter de balón hasta que se hincha el balón, momento en el cual se libera al ambiente local. Como alternativa, el agente puede estar impregnado sobre la superficie del balón, de tal forma que entra en contacto con las células de la pared arterial a medida que se hincha el balón. El agente también puede suministrarse en un catéter de balón perforado, tal como los divulgados en Flugelman, M.Y., et al., *Circulation 85*:1110-1117, 1992. Véase también la Solicitud PCT publicada WO 95/23161 para un procedimiento ejemplar para unir una proteína terapéutica a un catéter para angioplastia de balón. Igualmente, el agente inhibidor de MASP-2 puede incluirse en un gel o un recubrimiento polimérico aplicado a un stent o puede incorporarse en el material del stent, de tal forma que el stent eluye el agente inhibido de MASP-2 tras su colocación vascular.

Las composiciones inhibidoras de MASP-2 usadas en el tratamiento de la artritis y otros trastornos musculoesqueléticos pueden suministrarse de manera local mediante inyección intraarticular. Dichas composiciones pueden incluir de manera adecuada un vehículo de suministro de liberación sostenida. A modo de ejemplo adicional de casos en los que puede desearse el suministro local, las composiciones inhibidoras de MASP-2 usadas en el tratamiento de afecciones urogenitales pueden instilarse de manera adecuada por vía intravesical o en otra estructura urogenital.

RECUBRIMIENTOS SOBRE UN DISPOSITIVO MÉDICO

Los agentes inhibidores de MASP-2, tales como anticuerpos y péptidos inhibidores, pueden inmovilizarse sobre (o dentro de) una superficie de un dispositivo médico implantable o acoplable. La superficie modificada se encontrará normalmente en contacto con tejido vivo después de su implante en un cuerpo animal. Por "dispositivo médico implantable o acoplable" se entiende cualquier dispositivo que se implante o se acople con, tejidos de un organismo animal, durante el funcionamiento normal del dispositivo (por ejemplo, stents y dispositivos de suministro de farmacológico implantables). Dichos dispositivos médicos implantables o acoplables pueden estar hechos de, por ejemplo, nitrocelulosa, diazocelulosa, vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, dextrano, sefarosa, agar, almidón, nilón, acero inoxidable, titanio y polímeros biodegradables y/o biocompatibles. La unión de la proteína a un dispositivo puede lograrse mediante cualquier técnica que no destruya la actividad biológica de la proteína unida, por ejemplo, uniendo uno o ambos de los extremos N y/o C-terminales de la proteína al dispositivo. La unión también puede efectuarse en uno o más sitios internos de la proteína. También pueden usarse múltiples uniones (tanto internas como en los extremos de la proteína). Puede modificarse una superficie de un dispositivo médico implantable o acoplable para que incluya grupos funcionales (por ejemplo, carboxilo, amida, amino, éter, hidroxilo, ciano, nitrido, sulfanamido, acetilínico, epóxido, silánico, anhídrico, succinímico o azido) para inmovilizar la proteína sobre los mismos. Las químicas de acoplamiento incluyen, pero sin limitación, la formación de ésteres, éteres, amidas, azido y derivados sulfanamido, cianato y otros engarces a los grupos funcionales disponibles en los anticuerpos o péptidos inhibidores de MASP-2. También pueden unirse de manera no covalente anticuerpos o fragmentos inhibidores de MASP-2 mediante la adición de una secuencia marcadora de afinidad a la proteína, tal como GST (D.B. Smith y K.S. Johnson, *Gene 67*:31, 1988), polihistidinas (E. Hochuli et al., *J. Chromatog. 411*:77, 1987) o biotina. Dichos marcadores de afinidad pueden usarse para el acoplamiento reversible de la proteína a un dispositivo.

También pueden unirse covalentemente proteínas a la superficie del cuerpo de un dispositivo, por ejemplo, mediante activación covalente de la superficie del dispositivo médico. A modo de ejemplo representativo, pueden unirse proteínas matricelulares al cuerpo del dispositivo mediante cualquiera de los siguientes pares de grupos reactivos (estando presente un miembro del par sobre la superficie del cuerpo del dispositivo y estando presente el otro miembro del par en las proteínas matricelulares): hidroxilo/ácido carboxílico para proporcionar un enlace de tipo éster; hidroxilo/anhídrido para proporcionar un enlace de tipo éster; hidroxilo/isocianato para proporcionar un enlace de tipo uretano. Puede tratarse una superficie del cuerpo de un dispositivo que no posea grupos reactivos útiles con ranurado de plasma de descarga de radiofrecuencia (RFGD) para generar grupos reactivos para permitir la deposición de proteínas matricelulares (por ejemplo, tratamiento con plasma de oxígeno para introducir grupos que contienen oxígeno; tratamiento con plasma de aminopropilo para introducir grupos amina).

Los agentes inhibidores de MASP-2 que comprenden moléculas de ácido nucleico, tales como inhibidores peptídicos codificantes de antisentido, ARNi o ADN pueden incluirse en matrices porosas acopladas al cuerpo de un dispositivo. Las matrices porosas representativas útiles para producir la capa superficial son las preparadas a partir de colágeno de tendón o dérmico, que pueden obtenerse de diversas fuentes comerciales (por ejemplo, Sigma y Collagen Corporation) o matrices de colágeno preparadas como se describe en las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.394.370, de Jefferies y 4.975.527, de Koezuka. Un material colagenoso se denomina UltraFiber™ y puede obtenerse de Norian Corp. (Mountain View, California).

También pueden emplearse ciertas matrices poliméricas si se desea e incluyen polímeros acrílicos de éster y polímeros de ácido láctico, como se divulga, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.526.909 y 4.563.489, de Urist. Son ejemplos particulares de polímeros útiles aquellos de ortoésteres, anhídridos, cofumaratos de propileno o un polímero de uno o más monómeros de ácido α-hidroxicarboxílico (por ejemplo, ácido α-hidroxiacético (ácido glicólico) y/o ácido α-hidroxipropiónico (ácido láctico)).

PAUTAS POSOLÓGICAS

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto susceptible o de otro modo en riesgo de, una afección asociada con la activación de 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 que se sospecha o que ya padece, una afección asociada con la activación de complemento dependiente de MASP-2 en una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para aliviar o al menos reducir parcialmente, los síntomas de la afección. En los regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, pueden administrarse composiciones que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 en varias dosis hasta que se ha logrado un resultado terapéutico suficiente en el sujeto. La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente divulgación puede llevarse a cabo mediante una sola administración de la composición o de una secuencia limitada de administraciones, para el tratamiento de una afección aguda, por ejemplo, lesión por reperfusión u otra lesión traumática. Como alternativa, las composiciones pueden administrarse a intervalos periódicos a lo largo de un periodo de tiempo prolongado para el tratamiento de afecciones crónicas, por ejemplo, artritis o psoriasis.

Los métodos y composiciones de la presente divulgación pueden usarse para inhibir la inflamación y procesos relacionados que normalmente son el resultado de procedimientos médicos y quirúrgicos de diagnóstico y terapéuticos. Para inhibir dichos procesos, puede administrarse la composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación de manera periprocedimental. Tal como se usa en la presente memoria, "periprocedimental" se refiere a la administración de la composición inhibidora de manera preprocedimental y/o intraprocedimental y/o posprocedimental, es decir, antes del procedimiento, antes y durante el procedimiento, antes y después del procedimiento, antes, durante y después del procedimiento, durante el procedimiento, durante y después del procedimiento o después del procedimiento. La aplicación periprocedimental puede llevarse a cabo mediante administración local de la composición en el sitio quirúrgico o procedimental, tal como mediante inyección o irrigación continua o intermitente del sitio o mediante administración sistémica. Los métodos adecuados para el suministro perioperativo local de soluciones de agente inhibidor de MASP-2 se divulgan en las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.420.432 de Demopoulos y 6.645.168 de Demopoulos. Los métodos adecuados para el suministro local de composiciones condroprotectoras que incluyen agentes inhibidores de MASP-2 se divulgan en la Solicitud de Patente Internacional PCT WO 01/07067 A2. Los métodos y composiciones adecuados para el suministro sistémico dirigido de composiciones condroprotectoras que incluyen agentes inhibidores de MASP-2 se divulgan en la Solicitud de Patente Internacional PCT WO 03/063799 A2.

Las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto susceptible o de otro modo en riesgo de, HPN 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 que se sospecha o que ya padece, HPN en una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para aliviar o al menos reducir parcialmente, los síntomas de la afección.

En un caso, se opsonizan los glóbulos rojos del sujeto mediante fragmentos de C3 en ausencia de la composición y la administración de la composición que comprende un agente inhibidor de MASP-2 al sujeto aumenta la supervivencia de los glóbulos rojos en el sujeto. En una realización, el sujeto muestra uno o más síntomas en ausencia de la composición seleccionados entre el grupo que consiste en (i) niveles por debajo de lo normal de hemoglobina, (ii) niveles por debajo de lo normal de plaquetas; (iii) niveles por debajo de lo normal de reticulocitos y (iv) niveles por encima de lo normal de bilirrubina y la administración de la composición al sujeto mejora al menos uno o más de los síntomas, dando como resultado (i) niveles aumentados, normales o prácticamente normales de hemoglobina, (ii) niveles aumentados, normales o prácticamente normales de plaquetas, (iii) niveles reducidos, normales o prácticamente normales de reticulocitos y/o (iv) niveles reducidos, normales o prácticamente normales de bilirrubina.

En los regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, pueden administrarse composiciones que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 en varias dosis hasta que se ha logrado un resultado terapéutico suficiente en el sujeto. El agente inhibidor de MASP-2 comprende un anticuerpo anti-MASP-2, que puede administrarse de manera

adecuada a un paciente adulto (por ejemplo, un peso medio de adulto de 70 kg) en una dosis de 0,1 mg a 10.000 mg, más adecuadamente, de 1,0 mg a 5.000 mg, más adecuadamente, de 10,0 mg a 2.000 mg, más adecuadamente, de 10,0 mg a 1.000 mg y aún más adecuadamente, de 50,0 mg a 500 mg. Para pacientes pediátricos, puede ajustarse la dosis proporcionalmente al peso del paciente. La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente invención puede llevarse a cabo mediante una sola administración de la composición o de una secuencia limitada de administraciones, para el tratamiento de la HPN. Como alternativa, la composición puede administrarse a intervalos periódicos, tal como a diario, bisemanalmente, semanalmente, cada dos semanas, mensualmente o bimensualmente a lo largo de un periodo de tiempo prolongado para el tratamiento de la HPN.

En algunas realizaciones, el sujeto que padece HPN se ha sometido previamente o se está sometiendo en la actualidad a tratamiento con un inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína de complemento C5. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto una composición de la invención que comprende un inhibidor de MASP-2 y administrar además al sujeto un inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína de complemento C5. En algunas realizaciones, el inhibidor de complemento terminal es un anticuerpo anti-C5 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el inhibidor de complemento terminal es eculizumab.

En un aspecto de la divulgación, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto susceptible o de otro modo en riesgo de, SHUa 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 que se sospecha o que ya padece, SHUa en una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para aliviar o al menos reducir parcialmente, los síntomas de la afección. En un aspecto de la divulgación, antes de la administración, puede examinarse al sujeto para determinar si el sujeto muestra uno o más síntomas de SHUa, incluyendo (i) anemia, (ii) trombocitopenia (iii) insuficiencia renal y (iv) aumento de creatinina y la composición de la presente divulgación se administra entonces en una cantidad eficaz y durante un periodo de tiempo suficiente para mejorar estos síntomas.

En otro aspecto de la divulgación, las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente divulgación pueden usarse para tratar profilácticamente a un sujeto que tiene un riesgo elevado de desarrollar SHUa y de este modo reducir la probabilidad de que el sujeto desarrolle SHUa. La presencia de un marcador genético en el sujeto que se sabe que está asociado con el SHUa se determina en primer lugar llevando a cabo una prueba de exploración genética en una muestra obtenida del sujeto e identificando la presencia de al menos un marcador genético asociado con el SHUa, factor H de complemento (CFH), factor I (CFI), factor B (CFB), cofactor de membrana CD46, C3, proteína relacionada con el factor H de complemento (CFHR1), la proteína anticoagulante trombondulina (THBD), la proteína 3 relacionada con el factor de complemento H (CFHR3) o la proteína 4 relacionada con el factor de complemento H (CFHR4). Después, se monitoriza periódicamente al sujeto (por ejemplo, mensualmente, trimestralmente, dos veces al año o anualmente) para determinar la presencia o ausencia de al menos un síntoma de SHUa, tal como anemia, trombocitopenia, insuficiencia renal y aumento de la creatinina. Tras determinarse la presencia de al menos uno de estos síntomas, puede administrarse al sujeto una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2, en una cantidad eficaz y durante un periodo de tiempo suficiente para mejorar dichos uno o más síntomas. En otro aspecto adicional de la presente divulgación, puede monitorizarse a un sujeto con riesgo aumentado de desarrollar SHUa debido a que se le ha explorado y se ha determinado que tiene uno de los marcadores genéticos asociados con el SHUa respecto de la aparición de un evento asociado con el desencadenamiento de síntomas clínicos de SHUa, incluyendo exposición a fármacos, infección (por ejemplo, infección bacteriana), neoplasia maligna, lesión, trasplante de órganos o tejidos y embarazo.

Puede administrarse una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de MASP-2 eficaz para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2 a un sujeto que padece o se encuentra en riesgo de desarrollar síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa) secundario a una infección. Por ejemplo, puede tratarse a un paciente que padece o se encuentra en riesgo de desarrollar SHUa no entérico asociado con una infección por *S. pneumoniae* con las composiciones de la presente divulgación.

Puede tratarse inicialmente a un sujeto que padece SHUa con una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación que se administra por una línea de catéter, tal como una línea de catéter intravenoso o una línea de catéter subcutáneo, durante un primer periodo de tiempo, tal como una hora, doce horas, un día, dos días o tres días. Después, puede tratarse al sujeto durante un segundo periodo de tiempo con la composición inhibidora de MASP-2 administrada mediante inyecciones subcutáneas regulares, tales como a inyecciones a diario, bisemanalmente, semanalmente, cada dos semanas, mensualmente o bimensualmente.

Puede administrarse una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación a un sujeto que padece SHUa en ausencia de plasmaféresis (es decir, un sujeto cuyos síntomas de SHUa no se han tratado con plasmaféresis y no se les trata con plasmaféresis en el momento de tratamiento con la composición inhibidora de MASP-2), para evitar las potenciales complicaciones de la plasmaféresis, incluyendo hemorragia, infección y exposición a trastornos y/o alergias inherentes en el plasma donante o en un sujeto por lo demás adverso a la plasmaféresis o en una situación donde no hay disponibilidad para efectuar la plasmaféresis.

Puede administrarse una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación a un sujeto que padece SHUa coincidente con el tratamiento del paciente con plasmaféresis. Por ejemplo, puede administrarse posteriormente a un sujeto que recibe tratamiento con plasmaféresis las composiciones inhibidoras de MASP-2 después de o alternando con el intercambio de plasma.

Puede monitorizarse a un sujeto que padece o que se encuentra en riesgo de desarrollar SHUa y que se encuentra en tratamiento con una composición inhibidora de MASP-2 determinando de manera periódica, tal como cada doce horas o a diario, el nivel de al menos un factor de complemento, en donde la determinación de un nivel reducido de el al menos un factor de complemento en comparación con un valor estándar o con un sujeto sano es indicativa de la necesidad de continuar el tratamiento con la composición.

En los regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, pueden administrarse composiciones que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 en varias dosis hasta que se ha logrado un resultado terapéutico suficiente en el sujeto. En un caso, el agente inhibidor de MASP-2 comprende un anticuerpo anti-MASP-2, que puede administrarse de manera adecuada a un paciente adulto (por ejemplo, un peso medio de adulto de 70 kg) en una dosis de 0,1 mg a 10.000 mg, más adecuadamente, de 1,0 mg a 5.000 mg, más adecuadamente, de 10,0 mg a 2.000 mg, más adecuadamente, de 10,0 mg a 1.000 mg y aún más adecuadamente, de 50,0 mg a 500 mg. Para pacientes pediátricos, puede ajustarse la dosis proporcionalmente al peso del paciente. La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente divulgación puede llevarse a cabo mediante una sola administración de la composición o de una secuencia limitada de administraciones, para el tratamiento del SHUa. Como alternativa, la composición puede administrarse a intervalos periódicos, tales como a diario, bisemanalmente, semanalmente, cada dos semanas, mensualmente o bimensualmente, a lo largo de un periodo de tiempo prolongado para el tratamiento del SHUa.

En algunos casos, el sujeto que padece SHUa se ha sometido previamente o se está sometiendo en la actualidad a tratamiento con un inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína de complemento C5. El método comprende administrar al sujeto una composición de la divulgación que comprende un inhibidor de MASP-2 y administrar además al sujeto un inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína de complemento C5. En algunos casos, el inhibidor de complemento terminal es un anticuerpo anti-C5 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el inhibidor de complemento terminal es eculizumab.

En un caso, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto susceptible o de otro modo en riesgo de, SHU 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 que se sospecha o que ya padece, SHU en una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para aliviar o al menos reducir parcialmente, los síntomas de la afección.

En otro caso, puede reducirse la probabilidad de desarrollar deterioro de la función renal en un sujeto en riesgo de desarrollar SHU mediante la administración al sujeto de una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación en una cantidad eficaz para inhibir la activación de complemento dependiente de MASP-2. Por ejemplo, un sujeto en riesgo de desarrollar SHU y que se vaya a tratar con una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación puede presentar uno o más síntomas asociados con el SHU, incluyendo diarrea, un nivel de hematocrito inferior al 30% con indicios mediante frotis de destrucción intravascular de eritrocitos, trombocitopenia y aumento de los niveles de creatinina. A modo de ejemplo adicional, un sujeto en riesgo de desarrollar SHU y que se vaya a tratar con las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente divulgación puede estar infectado por *E. coli*, *Shigella* o *Salmonella*. Dichos sujetos infectados por *E. coli*, *Shigella* o *Salmonella* pueden tratarse con una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación de manera concurrente con tratamiento antibiótico o como alternativa, pueden tratarse con una composición inhibidora de MASP-2 sin tratamiento concurrente con un antibiótico, en particular, para *E. coli* enterogénica, para la que el tratamiento con antibiótico está contraindicado. Un sujeto infectado por *E. coli* enterogénica que se ha tratado con un antibiótico puede encontrarse en alto riesgo de desarrollar SHU y puede tratarse de manera adecuada con una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación para reducir ese riesgo. Un sujeto infectado por *E. coli* enterogénica puede tratarse durante un primer periodo de tiempo con una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación en ausencia de un antibiótico y después durante un segundo periodo de tiempo tanto con una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación como con un antibiótico.

En otro aspecto adicional de la presente divulgación, puede tratarse inicialmente a un sujeto que padece SHU con una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación que se administra por una línea de catéter, tal como una línea de catéter intravenoso o una línea de catéter subcutáneo, durante un primer periodo de tiempo, tal como una hora, doce horas, un día, dos días o tres días. Después, puede tratarse al sujeto durante un segundo periodo de tiempo con la composición inhibidora de MASP-2 administrada mediante inyecciones subcutáneas regulares, tales como a inyecciones a diario, bisemanalmente, semanalmente, cada dos semanas, mensualmente o bimensualmente.

Puede administrarse una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación a un sujeto que padece SHU en ausencia de plasmaféresis (es decir, un sujeto cuyos síntomas de SHU no se han tratado con plasmaféresis y no

se les trata con plasmaféresis en el momento de tratamiento con la composición inhibidora de MASP-2), para evitar las potenciales complicaciones de la plasmaféresis, incluyendo hemorragia, infección y exposición a trastornos y/o alergias inherentes en el plasma donante o en un sujeto por lo demás adverso a la plasmaféresis o en una situación donde no hay disponibilidad para efectuar la plasmaféresis.

Puede administrarse una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación a un sujeto que padece SHU coincidente con el tratamiento del paciente con plasmaféresis. Por ejemplo, puede administrarse posteriormente a un sujeto que recibe tratamiento con plasmaféresis las composiciones inhibidoras de MASP-2 después de o alternando con el intercambio de plasma.

Puede monitorizarse a un sujeto que padece o que se encuentra en riesgo de desarrollar SHU y que se encuentra en tratamiento con una composición inhibidora de MASP-2 determinando de manera periódica, tal como cada doce horas o a diario, el nivel de al menos un factor de complemento, en donde la determinación de un nivel reducido de el al menos un factor de complemento en comparación con un valor estándar o con un sujeto sano es indicativa de la necesidad de continuar el tratamiento con la composición.

En los regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, pueden administrarse composiciones que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 en varias dosis hasta que se ha logrado un resultado terapéutico suficiente en el sujeto. En un caso, el agente inhibidor de MASP-2 comprende un anticuerpo anti-MASP-2, que puede administrarse de manera adecuada a un paciente adulto (por ejemplo, un peso medio de adulto de 70 kg) en una dosis de 0,1 mg a 10.000 mg, más adecuadamente, de 1,0 mg a 5.000 mg, más adecuadamente, de 10,0 mg a 2.000 mg, más adecuadamente, de 10,0 mg a 1.000 mg y aún más adecuadamente, de 50,0 mg a 500 mg. Para pacientes pediátricos, puede ajustarse la dosis proporcionalmente al peso del paciente. La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente divulgación puede llevarse a cabo mediante una sola administración de la composición o de una secuencia limitada de administraciones, para el tratamiento del SHU. Como alternativa, la composición puede administrarse a intervalos periódicos, tales como a diario, bisemanalmente, semanalmente, cada dos semanas, mensualmente o bimensualmente, a lo largo de un periodo de tiempo prolongado para el tratamiento del SHU.

En algunos casos, el sujeto que padece SHU se ha sometido previamente o se está sometiendo en la actualidad a tratamiento con un inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína de complemento C5. En algunos casos, el método comprende administrar al sujeto una composición de la divulgación que comprende un inhibidor de MASP-2 y administrar además al sujeto un inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína de complemento C5. En algunos casos, el inhibidor de complemento terminal es un anticuerpo anti-C5 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el inhibidor de complemento terminal es eculizumab.

En un caso, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto susceptible o de otro modo en riesgo de, PTT 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 que se sospecha o que ya padece, PTT en una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para aliviar o al menos reducir parcialmente, los síntomas de la afección.

En otro caso, un sujeto que muestra uno o más de los síntomas de PTT, incluyendo implicación del sistema nervioso central, trombocitopenia, implicación cardíaca grave, implicación pulmonar grave, infarto gastrointestinal y gangrena, puede tratarse con una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación. En otro aspecto de la presente divulgación, puede tratarse a un sujeto en el que se determina que tiene un nivel deprimido de ADAMTS13 y que también da positivo para la presencia de un inhibidor (es decir, un anticuerpo) de ADAMTS13 con una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación. En otro aspecto adicional de la presente divulgación, puede tratarse a un sujeto que da positivo para la presencia de un inhibidor de ADAMTS13 con un inmunosupresor (por ejemplo, corticosteroides, rituxán o ciclosporina) de manera concurrente con tratamiento con una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación. En otro aspecto adicional de la presente divulgación, puede tratarse a un sujeto en el que se determina que tiene un nivel reducido de ADAMTS13 y que da positivo para la presencia de un inhibidor de ADAMTS13 con ADAMTS13 de manera concurrente con el tratamiento con una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación.

En otro aspecto adicional de la presente divulgación, puede tratarse inicialmente a un sujeto que padece PTT con una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación que se administra por una línea de catéter, tal como una línea de catéter intravenoso o una línea de catéter subcutáneo, durante un primer periodo de tiempo, tal como una hora, doce horas, un día, dos días o tres días. Después, puede tratarse al sujeto durante un segundo periodo de tiempo con la composición inhibidora de MASP-2 administrada mediante inyecciones subcutáneas regulares, tales como a inyecciones a diario, bisemanalmente, semanalmente, cada dos semanas, mensualmente o bimensualmente.

En otro aspecto adicional de la presente divulgación, puede administrarse una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación a un sujeto que padece PTT en ausencia de plasmaféresis (es decir, un sujeto cuyos síntomas de PTT no se han tratado con plasmaféresis y no se les trata con plasmaféresis en el momento de

tratamiento con la composición inhibidora de MASP-2), para evitar las potenciales complicaciones de la plasmaféresis, incluyendo hemorragia, infección y exposición a trastornos y/o alergias inherentes en el plasma donante o en un sujeto por lo demás adverso a la plasmaféresis o en una situación donde no hay disponibilidad para efectuar la plasmaféresis.

En otro aspecto adicional de la presente divulgación, puede administrarse una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación a un sujeto que padece PTT coincidente con el tratamiento del paciente con plasmaféresis. Por ejemplo, puede administrarse posteriormente a un sujeto que recibe tratamiento con plasmaféresis las composiciones inhibidoras de MASP-2 después de o alternando con el intercambio de plasma.

En otro aspecto adicional de la presente divulgación, un sujeto que padece PTT refractaria, es decir, síntomas de PTT que no han respondido de manera adecuada a otro tratamiento, tal como plasmaféresis, puede tratarse con una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación, con o sin plasmaféresis adicional.

En otro aspecto adicional de la presente divulgación, puede monitorizarse a un sujeto que padece o que se encuentra en riesgo de desarrollar PTT y que se encuentra en tratamiento con una composición inhibidora de MASP-2 determinando de manera periódica, tal como cada doce horas o a diario, el nivel de al menos un factor de complemento, en donde la determinación de un nivel reducido de el al menos un factor de complemento en comparación con un valor estándar o con un sujeto sano es indicativa de la necesidad de continuar el tratamiento con la composición.

En los regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, pueden administrarse composiciones que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 en varias dosis hasta que se ha logrado un resultado terapéutico suficiente en el sujeto. En un caso, el agente inhibidor de MASP-2 comprende un anticuerpo anti-MASP-2, que puede administrarse de manera adecuada a un paciente adulto (por ejemplo, un peso medio de adulto de 70 kg) en una dosis de 0,1 mg a 10.000 mg, más adecuadamente, de 1,0 mg a 5.000 mg, más adecuadamente, de 10,0 mg a 2.000 mg, más adecuadamente, de 10,0 mg a 1.000 mg y aún más adecuadamente, de 50,0 mg a 500 mg. Para pacientes pediátricos, puede ajustarse la dosis proporcionalmente al peso del paciente. La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente divulgación puede llevarse a cabo mediante una sola administración de la composición o de una secuencia limitada de administraciones, para el tratamiento de la PTT. Como alternativa, la composición puede administrarse a intervalos periódicos, tales como a diario, bisemanalmente, semanalmente, cada dos semanas, mensualmente o bimensualmente, a lo largo de un periodo de tiempo prolongado para el tratamiento de la PTT.

En algunos casos, el sujeto que padece PTT se ha sometido previamente o se está sometiendo en la actualidad a tratamiento con un inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína de complemento C5. En algunos casos, el método comprende administrar al sujeto una composición de la divulgación que comprende un inhibidor de MASP-2 y administrar además al sujeto un inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína de complemento C5. En algunos casos, el inhibidor de complemento terminal es un anticuerpo anti-C5 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el inhibidor de complemento terminal es eculizumab.

En un aspecto de la divulgación, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto susceptible o de otro modo en riesgo de, enfermedad de las crioaglutininas o crioglobulinemia 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 que se sospecha o que ya padece, enfermedad de las crioaglutininas o crioglobulinemia en una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para aliviar o al menos reducir parcialmente, los síntomas de la afección.

En otro aspecto adicional de la presente divulgación, puede monitorizarse a un sujeto que padece o que se encuentra en riesgo de desarrollar enfermedad de las crioaglutininas o crioglobulinemia y que se encuentra en tratamiento con una composición inhibidora de MASP-2 determinando de manera periódica, tal como cada doce horas o a diario, el nivel de al menos un factor de complemento, en donde la determinación de un nivel reducido de el al menos un factor de complemento en comparación con un valor estándar o con un sujeto sano es indicativa de la necesidad de continuar el tratamiento con la composición.

En los regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, pueden administrarse composiciones que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 en varias dosis hasta que se ha logrado un resultado terapéutico suficiente en el sujeto. En un caso de la divulgación, el agente inhibidor de MASP-2 comprende un anticuerpo anti-MASP-2, que puede administrarse de manera adecuada a un paciente adulto (por ejemplo, un peso medio de adulto de 70 kg) en una dosis de 0,1 mg a 10.000 mg, más adecuadamente, de 1,0 mg a 5.000 mg, más adecuadamente, de 10,0 mg a 2.000 mg, más adecuadamente, de 10,0 mg a 1.000 mg y aún más adecuadamente, de 50,0 mg a 500 mg. Para pacientes pediátricos, puede ajustarse la dosis proporcionalmente al peso del paciente. La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente divulgación puede llevarse a cabo mediante una sola administración de la composición o de una secuencia limitada de administraciones, para el tratamiento de la enfermedad de las crioaglutininas o crioglobulinemia. Como alternativa, la composición puede administrarse a intervalos periódicos, tales como a diario, bisemanalmente, semanalmente, cada dos semanas, mensualmente o

bimensualmente, a lo largo de un periodo de tiempo prolongado para el tratamiento de la enfermedad de las crioaglutininas o crioglobulinemia.

En algunos casos, el sujeto que padece enfermedad de las crioaglutininas o crioglobulinemia se ha sometido previamente o se está sometiendo en la actualidad a tratamiento con un inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína de complemento C5. En algunos casos, el método comprende administrar al sujeto una composición de la divulgación que comprende un inhibidor de MASP-2 y administrar además al sujeto un inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína de complemento C5. En algunos casos, el inhibidor de complemento terminal es un anticuerpo anti-C5 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el inhibidor de complemento terminal es eculizumab.

En un aspecto de la divulgación, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto susceptible o de otro modo en riesgo de, glaucoma 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 que se sospecha o que ya padece, glaucoma en una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para aliviar o al menos reducir parcialmente, los síntomas de la afección.

En otro aspecto adicional de la presente divulgación, puede monitorizarse a un sujeto que padece o que se encuentra en riesgo de desarrollar glaucoma y que se encuentra en tratamiento con una composición inhibidora de MASP-2 determinando de manera periódica, tal como cada doce horas o a diario, el nivel de al menos un factor de complemento, en donde la determinación de un nivel reducido de el al menos un factor de complemento en comparación con un valor estándar o con un sujeto sano es indicativa de la necesidad de continuar el tratamiento con la composición.

En los regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, pueden administrarse composiciones que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 en varias dosis hasta que se ha logrado un resultado terapéutico suficiente en el sujeto. En un caso de la divulgación, el agente inhibidor de MASP-2 comprende un anticuerpo anti-MASP-2, que puede administrarse de manera adecuada a un paciente adulto (por ejemplo, un peso medio de adulto de 70 kg) en una dosis de 0,1 mg a 10.000 mg, más adecuadamente, de 1,0 mg a 5.000 mg, más adecuadamente, de 10,0 mg a 2.000 mg, más adecuadamente, de 10,0 mg a 1.000 mg y aún más adecuadamente, de 50,0 mg a 500 mg. Para pacientes pediátricos, puede ajustarse la dosis proporcionalmente al peso del paciente. La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente divulgación puede llevarse a cabo mediante una sola administración de la composición o de una secuencia limitada de administraciones, para el tratamiento del glaucoma. Como alternativa, la composición puede administrarse a intervalos periódicos, tales como a diario, bisemanalmente, semanalmente, cada dos semanas, mensualmente o bimensualmente, a lo largo de un periodo de tiempo prolongado para el tratamiento de la enfermedad de las crioaglutininas.

En algunos casos, el sujeto que padece glaucoma se ha sometido previamente o se está sometiendo en la actualidad a tratamiento con un inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína de complemento C5. En algunos casos, el método comprende administrar al sujeto una composición de la divulgación que comprende un inhibidor de MASP-2 y administrar además al sujeto un inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína de complemento C5. En algunos casos, el inhibidor de complemento terminal es un anticuerpo anti-C5 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el inhibidor de complemento terminal es eculizumab.

En un aspecto de la divulgación, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto que padece o está en riesgo de desarrollar síndrome agudo por radiación, 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 que se sospecha o que ya padece, síndrome agudo por radiación en una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para aliviar o al menos reducir parcialmente, los síntomas de la afección. Puede tratarse a un sujeto con una composición inhibidora de MASP-2 de la presente divulgación antes o después de la exposición a la radiación, tal como exposición a la radiación para el tratamiento de afecciones cancerosas, durante la limpieza de un sitio contaminado por radiación, en el trabajo con materiales radiactivos en una planta de generación de energía o un laboratorio o a causa de exposición a radiación a consecuencia de un accidente nuclear, una acción terrorista o un acto de guerra. En un caso de la presente divulgación, la composición inhibidora de MASP-2 se administra de 24 a 48 horas después de la exposición a la radiación.

En otro aspecto adicional de la presente divulgación, puede monitorizarse a un sujeto que padece o que se encuentra en riesgo de desarrollar síndrome agudo por radiación y que se encuentra en tratamiento con una composición inhibidora de MASP-2 determinando de manera periódica, tal como cada doce horas o a diario, el nivel de al menos un factor de complemento, en donde la determinación de un nivel reducido de el al menos un factor de complemento en comparación con un valor estándar o con un sujeto sano es indicativa de la necesidad de continuar el tratamiento con la composición.

En los regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, pueden administrarse composiciones que comprenden agentes inhibidores de MASP-2 en varias dosis hasta que se ha logrado un resultado terapéutico suficiente en el sujeto. En un caso de la divulgación, el agente inhibidor de MASP-2 comprende un anticuerpo anti-MASP-2, que

puede administrarse de manera adecuada a un paciente adulto (por ejemplo, un peso medio de adulto de 70 kg) en una dosis de 0,1 mg a 10.000 mg, más adecuadamente, de 1,0 mg a 5.000 mg, más adecuadamente, de 10,0 mg a 2.000 mg, más adecuadamente, de 10,0 mg a 1.000 mg y aún más adecuadamente, de 50,0 mg a 500 mg. Para pacientes pediátricos, puede ajustarse la dosis proporcionalmente al peso del paciente. La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente divulgación puede llevarse a cabo mediante una sola administración de la composición o de una secuencia limitada de administraciones, para el tratamiento del glaucoma. Como alternativa, la composición puede administrarse a intervalos periódicos, tales como a diario, bisemanalmente, semanalmente, cada dos semanas, mensualmente o bimensualmente, a lo largo de un periodo de tiempo prolongado para el tratamiento del síndrome agudo por radiación.

En algunos casos, el sujeto que padece síndrome agudo por radiación se ha sometido previamente o se está sometiendo en la actualidad a tratamiento con un inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína de complemento C5. En algunos casos, el método comprende administrar al sujeto una composición de la divulgación que comprende un inhibidor de MASP-2 y administrar además al sujeto un inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína de complemento C5. En algunos casos, el inhibidor de complemento terminal es un anticuerpo anti-C5 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el inhibidor de complemento terminal es eculizumab.

VI. Ejemplos

Los siguientes ejemplos simplemente ilustran el mejor modo contemplado en la actualidad para poner en práctica la divulgación.

Ejemplo 1

Este ejemplo describe la generación de una estirpe de ratón deficiente en MASP-2 (MASP-2-/-) pero suficiente para MAp19 (MAp19+/+).

Materiales y métodos: Se diseñó el vector de direccionamiento pKO-NTKV 1901 para alterar los tres exones que codifican el extremo C-terminal de MASP-2 murino, incluyendo el exón que codifica el dominio de serina proteasa, como se muestra en la **FIGURA 3.** Se usó PKO-NTKV 1901 para transfectar la línea celular ES murina E14.1a (SV129 Ola). Se seleccionaron los clones resistentes a neomicina y sensibles a timidina cinasa. Se seleccionaron 600 clones de ES y, de estos, se identificaron cuatro clones diferentes y se verificaron mediante transferencia de Southern para que contuviesen el evento de direccionamiento selectivo y recombinación esperado, tal como se muestra en la **FIGURA 3.** Se generaron quimeras a partir de estos cuatro clones positivos mediante transferencia embrionaria. Después, se retrocruzaron las quimeras en el fondo genético de C57/BL6 para crear machos transgénicos. Los machos transgénicos se cruzaron con hembras para generar F1 con un 50% de la descendencia que mostraba heterocigocidad para el gen *MASP-2* alterado. Se intercruzaron los ratones heterocigotos para generar descendencia homocigótica deficiente para MASP-2, dando como resultado ratones heterocigotos y de tipo silvestre en una proporción de 1:2:1, respectivamente.

Resultados y fenotipos: Se observó que los ratones homocigotos resultantes deficientes para MASP-2-/- eran viables y fértiles y se verificó que eran deficientes para MASP-2 mediante transferencia de Southern para confirmar el efecto de direccionamiento correcto, mediante transferencia de Northern para confirmar la ausencia de ARNm de MASP-2 y mediante transferencia de Western para confirmar la ausencia de proteína MASP-2 (datos no mostrados). Se confirmaron adicionalmente la presencia de ARNm de MAp19 y la ausencia de ARNm de MASP-2 usando RT-PCR resuelta en tiempo en una máquina LightCycler. Los ratones MASP-2-/- continúan expresando, como se esperaba, ARNm y proteína de MAp19, MASP-1 y MASP-3 (datos no mostrados). La presencia y abundancia de ARNm en los ratones MASP-2-/- para properdina, Factor B, Factor D, C4, C2 y C3 se evaluó mediante análisis LighCycler y se observó que era idéntica a la de los controles de camada de tipo silvestre (datos no mostrados). El plasma de los ratones homocigotos MASP-2-/- es totalmente deficiente para la activación de complemento mediada por la vía de lectina, tal como se describe adicionalmente en el **ejemplo 2.**

Generación de una estirpe MASP-2-/- en un fondo C57BL6 puro: Se retrocruzaron los ratones MASP-2-/- con una línea C57BL6 pura durante nueve generaciones antes de usar la estirpe MASP-2-/- como modelo animal experimental.

Se generó del siguiente modo una estirpe de ratón que es MASP-2-/-, MAp19+/+ murina y que expresa un transgén de MASP-2 humana (una supresión génica de MASP-2 murino y una inserción génica de MASP-2 humana):

Materiales y métodos: Se construyó un minigen que codifica MASP-2 humana, denominado "mini hMASP-2" (SEQ ID NO: 49) tal como se muestra en la **FIGURA 4** que incluye la región promotora del gen *MASP 2* humano, que incluye los primeros 3 exones (del exón 1 al exón 3) seguido de la secuencia de ADNc que representa la secuencia codificante de los 8 exones siguientes, codificando de este modo la proteína MASP-2 de longitud completa dirigida por su promotor endógeno. Se inyectó la construcción mini hMASP-2 en ovocitos fertilizados de MASP-2-/- para reemplazar el gen *MASP 2* murino defectuoso por MASP-2 humana expresada de manera transgénica.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra que MASP-2 es necesario para la activación del complemento por la vía de lectina.

Materiales y métodos:

Ensayo de escisión de C4 específico de la vía de lectina: 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 lectina resultante del ácido lipoteicoico (LTA) de *S. aureus,* que se une a L-ficolina. El ensayo descrito por Petersen et al., (2001) se adaptó para medir la activación de la vía de lectina mediante MBL recubriendo la placa con LPS y manano o cimosano antes de añadir suero de ratones MASP-2-/- como se describe más adelante. También se modificó el ensayo para eliminar la posibilidad de la escisión de C4 por la vía clásica. Esto se logró usando un tampón de dilución de muestra que contenía NaCl 1 M, que permite la unión de alta afinidad de componentes de reconocimiento de la vía de lectina a sus ligandos pero impide la activación de C4 endógeno, excluyendo de este modo la participación de la vía clásica disociando el complejo de C1. Descrito de manera breve, en el ensayo modificado se añaden muestras de suero (diluidas en tampón alto salino (NaCl 1 M) a placas recubiertas de ligando, seguido de la adición de una cantidad constante de C4 purificado en un tampón con una concentración fisiológica de sal. Los complejos de reconocimiento unidos que contienen MASP-2 escinden a C4, dando como resultado la deposición de C4b.

Métodos de ensayo:

1) Se recubrieron placas de microtitulación Nunc Maxisorb (Maxisorb, Nunc, n.º de cat. 442404, Fisher Scientific) con 1 µg/ml de manano (M7504 Sigma) o cualquier otro ligando (por ejemplo, tal como los listados más adelante) diluido en tampón de recubrimiento (Na_2CO_3 15 mM, $NaHCO_3$ 35 mM, pH 9,6).

Se usaron los siguientes reactivos en el ensayo:

a. manano (1 µg/pocillo de manano (M7504 Sigma) en 100 µl de tampón de recubrimiento):
b. cimosano (1 µg/pocillo de cimosano (Sigma) en 100 µl de tampón de recubrimiento);
c. LTA (1 µg/pocillo en 100 µl de tampón de recubrimiento o 2 µg/pocillo en 20 µl de metanol)
d. 1 µg del Mab 4H5 específico para H-ficolina en tampón de recubrimiento
e. PSA de *Aerococcus viridans* (2 µg/pocillo en 100 µl de tampón de recubrimiento)
f. 100 µl/pocillo de *S. aureus* fijado en formalina DSM20233 (DO_{550}=0,5) en tampón de recubrimiento.

2) Se recubrieron las placas durante una noche a 4°C.

3) Tras incubar durante una noche, se saturaron los sitios de unión a proteína residuales incubando las placas con tampón de bloqueo de HSA-TBS al 0,1% (HSA al 0,1% (p/v) en Tris-CL 10 mM, NaCl 140 mM, NaN_3 1,5 mM, pH 7,4) durante 1-3 horas, después lavando las placas 3X con TBS/tween/Ca^{2+} (TBS con Tween 20 al 0,05% y $CaCl_2$ 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 7,4).

4) Las muestras de suero que se iban a ensayar se diluyeron en tampón de unión a MBL (NaCl 1 M) y se añadieron las muestras diluidas a las placas y se incubaron durante una noche a 4°C. Como controles negativos se usaron pocillos que recibieron solo tampón.

5) Después de incubar durante una noche a 4°C, se lavaron las placas 3X con TBS/tween/Ca2+. Después, se añadió a las placas C4 humano (100 µl/pocillo de 1 µg/ml diluido en BBS (barbital 4 mM, NaCl 145 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 7,4)) y se incubó durante 90 minutos a 37°C. Las placas se lavaron nuevamente 3X con TBS/tween/Ca^{2+}.

6) Se detectó la deposición de C4b con un anticuerpo de pollo anti-C4c humano conjugado a fosfatasa alcalina (diluido a 1:1000 en TBS/tween/Ca^{2+}), que se añadió a las placas y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después, se lavaron nuevamente las placas 3X con TBS/tween/Ca^{2+}.

7) La fosfatasa alcalina se detectó añadiendo 100 µl de solución de sustrato de fosfato de *p*-nitrofenilo, incubando a temperatura ambiente durante 20 minutos y leyendo la DO_{405} en un lector de microtitulación.

Resultados: Las FIGURAS 5A-B muestran la cantidad de deposición de C4b sobre manano (FIGURA 5A) y cimosano (FIGURA 5B) en diluciones de suero de MASP-2+/+ (cruces), MASP-2+/- (círculos cerrados) y MASP-2-/- (triángulos cerrados). La FIGURA 5C muestra la actividad relativa de C4 convertasa en placas recubiertas con cimosano (barras blancas) o manano (barras sombreadas) de ratones MASP-2-/+ (n=5) y ratones MASP-2-/- (n=4) en relación a los ratones de tipo silvestre (n=5) basándose en la medida de deposición de C4b normalizada al suero de tipo silvestre. Las barras de error representan la desviación estándar. Tal como se muestra en las FIGURAS 5A-C, el plasma de ratones MASP-2-/- es totalmente deficiente en activación de complemento mediado por la vía de lectina en placas recubiertas con manano y cimosano. Estos resultados demuestran claramente que MASP-2 es un componente efector de la vía de lectina.

MASP-2 recombinante reconstituye la activación de C4 dependiente de la vía de lectina en suero de los ratones MASP-2-/-

Para determinar que la ausencia de MASP-2 era la causa directa de la pérdida de la activación de C4 dependiente de la vía de lectina en los ratones MASP-2-/-, se examinó el efecto de añadir proteína MASP-2 recombinante a muestras de suero en el ensayo de escisión de C4 descrito anteriormente. Se produjeron proteínas recombinantes MASP-2 murina funcionalmente activa y MASP-2A murina catalíticamente inactiva (en el que el resto de serina del sitio activo en el dominio de serina proteasa se sustituyó por el resto de alanina) como se describe más adelante en el **ejemplo 3.** Se preincubó suero agrupado de 4 ratones MASP-2 -/- con concentraciones crecientes de proteína de MASP-2 murino recombinante o MASP-2A murino recombinante inactivo y se evaluó la actividad de C4 convertasa como se ha descrito anteriormente.

Resultados: Tal como se muestra en la **FIGURA 6,** la adición de proteína MASP-2 recombinante murina funcionalmente activa (mostrada como triángulos abiertos) a suero obtenido de ratones MASP-2-/- restauró la activación de C4 dependiente de la vía de lectina de una manera dependiente de la concentración de proteína, mientras que la proteína MASP-2A murina catalíticamente inactiva (mostrada como asteriscos) no restauró la activación de C4. Los resultados mostrados en la **FIGURA 6** están normalizados para la activación de C4 observada con suero de ratón de tipo silvestre agrupado (mostrado como una línea de puntos).

Ejemplo 3

Este ejemplo describe la expresión recombinante y la producción de proteína MASP-2 humana, de rata y murina de longitud completa, polipéptidos derivados de MASP-2 y formas mutantes catalíticamente inactivadas de MASP-2.

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

También se subclonó la secuencia de ADNc de longitud completa de MASP-2 humana (SEQ ID NO: 4) en el vector de expresión de mamífero pCI-Neo (Promega), que dirige la expresión en eucariotas bajo el control de la región potenciadora/promotora de CMV (descrito en Kaufman R.J. et al., *Nucleic Acids Research 19*:4485-90, 1991; Kaufman, *Methods in Enzymology, 185*:537-66 (1991)). Se subclonaron el ADNc de ratón (SEQ ID NO: 50) y ADNc de rata (SEQ ID NO: 53) de MASP-2 de longitud completa, cada uno, en el vector de expresión pED. Después, se transfectaron los vectores de expresión de MASP-2 en la línea celular de ovario de hámster chino DXB1 usando el procedimiento de transfección con fosfato de calcio convencional descrito en Maniatis et al., 1989. Las células transfectadas con estas construcciones crecieron muy lentamente, lo que implica que la proteasa codificada es citotóxica.

En otra estrategia, se transfectó de manera transitoria la construcción de minigen (SEQ ID NO: 49) que contiene el ADNc humano de MASP-2 dirigido por su promotor endógeno en células de ovario de hámster chino (CHO). La proteína MASP-2 humana se secreta en el medio de cultivo y se aísla como se describe más adelante.

Expresión de MASP-2 catalíticamente inactivo de longitud completa:

Base lógica: MASP-2 se activa por escisión autocatalítica después de que los subcomponentes de reconocimiento MBL o ficolinas (ya sea L-ficolina, H-ficolina o M-ficolina) se unan a su patrón de carbohidratos respectivo. La escisión autocatalítica que da como resultado la activación de mASP-2 se produce con frecuencia durante el procedimiento de aislamiento de MASP-2 del suero o durante la purificación después de la expresión recombinante. Para obtener una preparación más estable para su uso como antígeno, se creó una forma catalíticamente inactiva de MASP-2 denominada MASP-2A reemplazando el resto de serina que está presente en la tríada catalítica del dominio de proteasa con un resto de alanina en rata (SEQ ID NO: 55, Ser617 a Ala617); en ratón (SEQ ID NO: 52, Ser617 a Ala617); o en ser humano (SEQ ID NO: 3, Ser618 a Ala618).

Para generar proteínas MASP-2A humanas y murinas catalíticamente inactivas, se llevó a cabo mutagénesis de sitio dirigido usando los oligonucleótidos mostrados en la **TABLA 5.** Los oligonucleótidos en la **TABLA 5** se diseñaron para que se hibridasen con la región del ADNc humano y murino que codifica la serina enzimáticamente activa y el oligonucleótido contiene un desemparejamiento para cambiar el codón de serina por un codón de alanina. Por ejemplo, se usaron oligonucleótidos para PCR, SEQ ID NO: 56-59, en combinación con ADNc de MASP-2 (SEQ ID NO: 4) para amplificar la región del codón de inicio para la serina enzimáticamente activa y de la serina para el codón de parada para generar la fase abierta de lectura completa de la MASP-2A mutada que contiene la mutación Ser618 a Ala618. Los productos de la PCR se purificaron tras la electroforesis en gel de agarosa y se generaron preparaciones de bandas y solapamientos individuales de adenosina usando un procedimiento de adición de cola convencional. Después, se clonó la MASP-2A con cola de adenosina se clonó en el vector pGEM-T easy, transformado en *E. coli.*

Se generó una proteína MASP-2A de rata catalíticamente inactiva mediante cinasas e hibridando la SEQ ID NO: 64 y la SEQ ID NO: 65 combinando estos dos oligonucleótidos en cantidades equimolares, calentando a 100°C durante 2 minutos y enfriando lentamente hasta temperatura ambiente. El fragmento hibridado resultante tiene extremos compatibles con Pst1 y Xba1 y se insertó en lugar del fragmento Pst1-Xba1 del ADNc de MASP-2 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 53) para generar MASP-2A de rata.

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

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

Cada una de MASP-2A humana, murina y de rata se subclonaron adicionalmente en los vectores de expresión de mamífero pED o pCI-Neo y se transfectaron en la línea celular de ovario de hámster chino DXB1 como se describe más adelante.

En otra estrategia, se construyó una forma catalíticamente inactiva de MASP-2 usando el método descrito en Chen et al., *J. Biol. Chem., 276*(28):25894-25902, 2001. Brevemente, se digirió el plásmido que contenía el ADNc de MASP-2 humana de longitud completa (descrito en Thiel et al., *Nature 386*:506, 1997) con *Xho*1 t *EcoR*1 y el ADNc de MASP-2 (descrito en la presente memoria como la SEQ ID NO: 4) se clona en los sitios de restricción correspondientes del vector de transferencia de baculovirus pFastBac1 (Life Technologies, NY). Después, se alteró el sitio activo de serina proteasa de MASP-2 en Ser618 a Ala618 sustituyendo los oligonucleótidos bicatenarios que codifican la región peptídica de los aminoácidos 610-625 (SEQ ID NO: 13) con la región nativa de los aminoácidos 610 a 625 para crear un polipéptido de MASP-2 de longitud completa con un dominio de proteasa inactivo. Construcción de plásmidos de expresión que contienen regiones de polipéptido derivadas de MASP-2 humana.

Las siguientes construcciones se producen usando el péptido de señal de MASP-2 (restos 1-15 de la SEQ ID NO: 5) para secretar diversos dominios de MASP-2. Se prepara una construcción que expresa el dominio CUBI de MASP-2 humana (SEQ ID NO: 8) mediante la PCR amplificando los restos 1-121 de la región codificante de MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (correspondiente al dominio CUB1 N-terminal). Se prepara una construcción que expresa el dominio CUBIEGF de MASP-2 humana (SEQ ID NO: 9) mediante la PCR amplificando los restos 1-166 de la región codificante de MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (correspondiente al dominio CUB1EGF N-terminal). Se prepara una construcción que expresa el dominio CUBIEGFCUBII de MASP-2 humana (SEQ ID NO: 10) mediante la PCR amplificando los restos 1-293 de la región codificante de MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (correspondiente al dominio CUBIEGFCUBII N-terminal). Los dominios anteriormente mencionados e amplifican mediante la PCR usando VentR polimerasa y pBS-MASP-2 como molde, de acuerdo con métodos PCR establecidos. La secuencia de cebador 5' del cebador sentido (5'-CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' SEQ ID NO:34) introduce un sitio de restricción de *Bam*HI (subrayado) en el extremo 5' de los productos de la PCR. Los cebadores antisentido para cada uno de los dominios de MASP-2, mostrados a continuación en la TABLA 5, se diseñan para introducir un codón de parada (negrita) seguido de un sitio de *Eco*RI (subrayado) en el extremo de cada producto de la PCR. Una vez amplificado, los fragmentos de ADN se digieren con *Bam*HI y *Eco*RI y se clonan en los sitios correspondientes del vector pFastBac1. Las construcciones resultantes se caracterizan mediante mapeo de restricción y se confirman mediante secuenciación de ADNbc.

TABLA 5: CEBADORES PARA PCR DE MASP-2

Dominio de MASP-2	Cebador para PCR 5'	Cebador para PCR 3'
SEQ ID NO: 8 CUBI (aa 1-121 de la SEQ ID NO: 6)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO: 34)	5'GGAATTCCTAGGCTGCATA (SEQ ID NO: 35)
SEQ ID NO: 9 CUBIEGF (aa 1-166 de la SEQ ID NO: 6)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO: 34)	5'GGAATTCCTACAGGGCGCT-3' (SEQ ID NO: 36)
SEQ ID NO: 10 CUBIEGFCUBII (aa 1-293 de la SEQ ID NO: 6)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO: 34)	5'GGAATTCCTAGTAGTGGAT 3' (SEQ ID NO: 37)
SEQ ID NO: 4 MASP-2 humana	5'ATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGCCTTC 3' (SEQ ID NO: 56) hMASP-2_directo	5'TTAAAATCACTAATTATGTTCTCGATC 3' (SEQ ID NO: 59) hMASP-2_reverso
SEQ ID NO: 4 ADNc de MASP-2 humana	5'CAGAGGTGACGCAGGAGGGGCAC 3' (SEQ ID NO: 58) hMASP-2_ala_directo	5'GTGCCCCTCCTGCGTCACCTCTG 3' (SEQ ID NO: 57) hMASP-2_ala_reverso
SEQ ID NO: 50 ADNc de MASP-2 murino	5ATGAGGCTACTCATCTTCCTGG3' (SEQ ID NO: 60) mMASP-2_directo	5'TTAGAAATTACTTATTATGTTCTCAATCC3' (SEQ ID NO: 63) mMASP-2_reverso

Dominio de MASP-2	Cebador para PCR 5'	Cebador para PCR 3'
SEQ ID NO: 50 ADNc de MASP-2 murino	5'CCCCCCCTGCGTCACC TCTGCAG3' (SEQ ID NO: 62) mMASP-2_ala_directo	5'CTGCAGAGGTGACGCAGGGGGGG 3' (SEQ ID NO: 61) mMASP-2_ala_reverso

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

Se transfectaron las construcciones de expresión MASP-2 y MASP-2A descritas anteriormente en células DXB1 usando el procedimiento de transfección con fosfato de calcio convencional (Maniatis et al., 1989). Se produjo MASP-2A en medio asérico para garantizar que las preparaciones no estaban contaminadas con otras proteínas séricas. Se recogió el medio de células confluentes cada dos días (cuatro veces en total). Sel nivel de MASP-2A recombinante se promedió a aproximadamente 1,5 mg/litro de medio de cultivo para cada una de las tres especies.

Purificación de proteína MASP-2A: Se purificó MASP-2A (mutante de Ser-Ala descrito anteriormente) mediante cromatografía de afinidad en columnas de MBP-A-agarosa. Esta estrategia permitió una rápida purificación sin usar marcadores extraños. Se cargó MASP-2A (100-200 ml de medio diluido con un volumen igual de tampón de carga (Tris-Cl 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 150 mM y $CaCl_2$ 25 mM) en una columna de afinidad de MBP-agarosa (4 ml) pre-equilibrada con 10 ml de tampón de carga. Después de lavar con 10 ml adicionales de tampón de carga, se eluyó la proteína 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 mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. En los casos necesarios, MASP-2A se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico en una columna MonoQ (HR 5/5). La proteína se dializó con Tris-Cl 50 mM, pH 7,5, que contenía NaCl 50 mM y se cargó en la columna equilibrada en el mismo tampón. Después del lavado, se eluyó MASP-2A unido con un gradiente de NaCl de 0,05-1 M en 10 ml.

Resultados: Se obtuvieron rendimientos de 0,25-0,5 mg de proteína MASP-2A a partir de 200 ml de medio. La masa molecular de 77,5 kDa determinada mediante MAFDI-MS es mayor que el valor calculado del polipéptido no modificado (73,5 kDa) debido a la glucosilación. La unión de glucanos en cada uno de los sitios de *N*-glucosilación es responsable de la masa observada. MASP-2A migra en forma de una sola banda sobre geles de SDS-poliacrilamida, lo que demuestra que no se procesa proteolíticamente durante la biosíntesis. La masa molecular media en peso determinada mediante ultracentrifugación de equilibrio es acorde con el valor calculado para homodímeros del polipéptido glucosilado.

PRODUCCIÓN DE POLIPÉPTIDOS MASP-2 HUMANOS RECOMBINANTES

Otro método para producir polipéptidos derivados de MASP-2 y MASP2A se describe en Thielens, N.M., et al., *J. Immunol.* 166:5068-5077, 2001. Brevemente, se cultivan células de insecto de *Spodoptera frugiperda* (células Sf9 preparadas para placa obtenidas de Novagen, Madison, WI) y se mantienen en medio asérico Sf900II (Life Technologies) complementado con 50 UI/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomicina (Life Technologies). Se mantienen células de insecto de *Trichoplusia ni* (High Five) (proporcionadas por Jadwiga Chroboczek, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, Francia) en medio TC100 (Life Technologies) que contiene FCS al 10% (Dominique Dutscher, Brumath, Francia) complementado con 50 UI/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomicina. Se generan baculovirus recombinantes usando el sistema Bac-to-Bac (Life Technologies). El ADN de bácmido se purifica usando el sistema de purificación Midiprep de Qiagen (Qiagen) y se usa para transfectar células de insecto Sf9 usando cellfectin en medio Sf900 II SFM (Life Technologies) como se describe en el protocolo del fabricante. Se recogen partículas de virus recombinantes 4 días después, se titulan mediante ensayo en placa de virus y se amplifican como se describe por King y Possee, en *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide,* Chapman and Hall Ltd., Londres, págs. 111-114, 1992.

Se infectan células High Five (1,75 x 10^7 células/matraz de cultivo tisular de 175-cm^2) con los virus recombinantes que contienen polipéptidos de MASP-2 con una multiplicidad de infección de 2 en medio Sf900 II SFM a 28°C durante 96 h. Los sobrenadantes se recogen por centrifugación y se añade fosfofluoridato de diisopropilo a una concentración final de 1 mM.

Los polipéptidos de MASP-2 se secretan en el medio de cultivo. Los sobrenadantes de cultivo se n contra NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 1 mM, clorhidrato de trietanolamina 50 mM, pH 8,1 y se carga a 1,5 ml/min en una columna Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) (2,8 x 12 cm) equilibrada en el mismo tampón. La elución se lleva a cabo aplicando un gradiente lineal de 1,2 litros hasta NaCl 350 mM en el mismo tampón. Las fracciones que contienen los polipéptidos de MASP-2 recombinantes se identifican mediante análisis de transferencia de Western, se precipitan mediante la adición de $(NH_4)_2SO_4$ al 60% (p/v), y se dejan reposar durante una noche a 4°C. Los sedimentos se resuspenden en NaCl 145 mM, $CaCl_2$ 1 mM, clorhidrato 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. Después, se concentran los polipéptidos purificados hasta 0,3 mg/ml mediante ultrafiltración en microconcentradores

Microsep (corte de peso molecular = 10.000) (Filtron, Karlstein, Alemania).

Ejemplo 4

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

Materiales y métodos:

Antígenos de MASP-2: Se produce antisuero policlonal anti-MASP-2 humano inmunizando a conejos con los siguientes polipéptidos de MASP-2 aislados: MASP-2 humana (SEQ ID NO: 6) aislado de suero; MASP-2 humana recombinante (SEQ ID NO: 6), MASP-2A que contiene el dominio de proteasa inactivo (SEQ ID NO: 13), como se describe en el **ejemplo 3;** y CUBI recombinante (SEQ ID NO: 8), CUBEGFI (SEQ ID NO: 9) y CUBEGFCUBII (SEQ ID NO: 10) expresados como se describe anteriormente en el **ejemplo 3.**

Anticuerpos policlonales: Se inmuniza a ratones de seis semanas de edad, cebados con BCG (vacuna para bacilo de Calmette-Guerin) inyectando 100 µg de polipéptido de MASP-2 a 100 µg/ml en solución salina estéril. Las inyecciones se efectúan cada 4 semanas, controlándose el título de anticuerpo mediante ensayo ELISA, tal como se describe en el **ejemplo 5.** Se recogen los sobrenadantes de cultivo para la purificación de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad de proteína A.

Ejemplo 5

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

Materiales y métodos:

Se inyecta a ratones A/J macho (Harlan, Houston, Tex.) de 8-12 semanas de edad por vía subcutánea con 100 µg de polipéptidos rMASP-2 o rMASP-2A humanos o de rata (producidos como se describe en el **ejemplo 3**) en adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) en 200 µl de suero salino tamponado con fosfato (PBS), pH 7,4. A intervalos de dos semanas, se inyectó dos veces a los ratones por vía subcutánea con 50 µg de polipéptido de rMASP-2 o rMASP-2A de humano o de rata en adyuvante incompleto de Freund. En la cuarta semana, se inyecta a los ratones 50 µg de polipéptido rMASP-2 o rMASP-2A humano o de rata en PBS y se fusionan 4 días después.

Para cada fusión, se preparan suspensiones de células individuales a partir del bazo de un ratón inmunizado y se usan para la fusión con células de mieloma Sp2/0. Se fusionan $5x10^8$ de las células Sp2/0 y $5x10^8$ células de bazo en un medio que contiene polietilenglicol al 50% (P.M. 1450) (Kodak, Rochester, N.Y.) y dimetilsulfóxido al 5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Después, se ajustan las células a una concentración de $1,5x10^5$ células de bazo por cada 200 µl de la suspensión en medio Iscove (Gibco, Grand Island, N.Y.), complementado con suero fetal bovino al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, hipoxantina 0,1 mM, aminopterina 0,4 µM y timidina 16 µM. Se añaden doscientos microlitros de la suspensión celular a cada pocillo de placas de microcultivo de aproximadamente 96 pocillos. Después de aproximadamente diez días, se retiran los sobrenadantes de cultivo para evaluar la reactividad con factor de MASP-2 purificado en un ensayo ELISA.

Ensayo ELISA: Se recubren placas de microensayo Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.) añadiendo 50 µl de hMASP-2 purificado a 50 ng/ml o rMASP-2 de rata (o rMASP-2A) durante una noche a temperatura ambiente. La baja concentración de MASP-2 para recubrimiento permite la selección de anticuerpos de alta afinidad. Después de retirar la solución de recubrimiento sacudiendo la placa, se añaden 200 µl de BLOTTO (leche deshidratada desgrasada) en PBS a cada pocillo durante una hora para bloquear los sitios no específicos. Una hora después, se lavan los pocillos con tampón PBST (PBS que contiene Tween 20 al 0,05%). Se recogen cincuenta microlitros de sobrenadantes de cultivo de cada pocillo de fusión y se mezclan con 50 µl de BLOTTO y después se añaden a los pocillos individuales de las placas de microensayo. Después de una hora de incubación, los pocillos se lavan con PBST. Después, se detectan los anticuerpos murinos unidos mediante reacción con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (específico para Fc) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.) y se diluyen a 1:2.000 en BFOTTO. Se añade solución de sustrato de peroxidasa que contiene 3,3,5,5-tetrametilbencidina al 0,1% (Sigma, St. Louis, Mo.) y peróxido de hidrógeno al 0,0003% (Sigma) a los pocillos para revelar el color durante 30 minutos. La reacción se termina mediante la adición de 50 µl de H_2SO_4 2M por pocillo. La densidad óptica a 450 nm de la mezcla de reacción se lee con un lector de ELISA BioTek (BioTek Instruments, Winooski, Vt.).

Ensayo de unión a MASP-2:

Los sobrenadantes de cultivo que dan positivo en el ensayo ELISA de MASP-2 descritos anteriormente pueden probarse en un ensayo de unión para determinar la afinidad de unión que tienen los agentes inhibidores de MASP-2 por MASP-2. También puede usarse un ensayo similar para determinar si los agentes inhibidores se unen a otros antígenos en el sistema de complemento.

Se recubren placas de microtitulación de poliestireno (placas de unión de medio de 96 pocillos, Corning Costar, Cambridge, MA) con MASP-2 (20 ng/100 µl/pocillo, Advanced Research Technology, San Diego, CA) en suero salino tamponado con fosfato (PBS) a pH 7,4 durante una noche a 4°C. Después de aspirar la solución de MASP-2, los pocillos se bloquean con PBS que contiene seroalbúmina bovina al 1% (BSA; Sigma Chemical) durante 2 h a temperatura ambiente. Los pocillos sin recubrimiento de MASP-2 sirven como controles de fondo. Se añaden a los pocillos alícuotas de sobrenadantes de hibridoma o MoAb anti-MASP-2 purificados, a diversas concentraciones en solución de bloqueo. Después de una incubación de 2 h a temperatura ambiente, se enjuagan los pocillos exhaustivamente con PBS. El MoAb anti-MASP-2 unido a MASP-2 se detecta mediante la adición de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma Chemical) en solución de bloqueo, que se deja incubar durante 1 h a temperatura ambiente. Nuevamente, se enjuaga la placa exhaustivamente con PBS y se añaden 100 µl de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). La reacción de TMB se inactiva mediante la adición de 100 µl de ácido fosfórico 1M y la placa se lee a 450 nm en un lector de microplacas (SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Los sobrenadantes de cultivo de los pocillos positivos se prueban respecto de la capacidad para inhibir la activación de complemento en un ensayo funcional, tal como el ensayo de escisión de C4 descrito en el **ejemplo 2.** Las células en los pocillos positivos se clonan posteriormente mediante dilución limitante. Los MoAb se prueban nuevamente respecto de su reactividad con hMASP-2 en un ensayo ELISA, como se ha descrito anteriormente. Los hibridomas seleccionados se cultivan en matraces de centrifugación y el sobrenadante de cultivo gastado se recoge para la purificación de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad de proteína A.

Ejemplo 6

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

Se genera un anticuerpo monoclonal murino anti-MASP-2 en ratones A/J macho como se describe en el **ejemplo 5.** Después, se humaniza el anticuerpo murino como se describe más adelante para reducir su inmunogenicidad reemplazando las regiones constantes murinas por sus homólogos humanos para generar una IgG quimérica y el fragmento Fab del anticuerpo, que es útil para inhibir los efectos adversos de la activación de complemento dependiente de MASP-2 en sujetos humanos de acuerdo con la presente divulgación.

1. Clonación de genes de región variable de anti-MASP-2 de células de hibridoma murinas. Se aísla el ARN total de las células de hibridoma que secretan MoAb anti-MASP-2 (obtenido como se describe en el ejemplo 7) usando RNAzol siguiendo el protocolo del fabricante (Biotech, Houston, Tex.). Se sintetiza ADNc de primera hebra a partir del ARN total usando oligo dT como cebador. La PCR se lleva a cabo usando cebadores 3' derivados de la región constante C de inmunoglobulina conjuntos de cebador degenerado derivados del péptido líder o de la primera región marco conservada de los genes V_H o V_K como cebadores 5'. La PCR anclada se lleva a cabo como se describe por Chen y Platsucas (Chen, P.F., *Scand. J. Immunol.* 35:539-549, 1992). Para la clonación del gen V_K, se prepara ADNc bicatenario usando un cebador Not1-MAK1 (5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTTT-3' SEQ ID NO: 38). Los adaptadores hibridados AD1 (5'-GGAATTCACTCGTTATTCTCGGA-3' SEQ ID NO: 39) y AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEQ ID NO: 40) se ligan a ambos extremos 5' y 3' del ADNc bicatenario. Los adaptadores en los extremos 3' se retiran mediante digestión de Not1. Después, se usa el producto digerido como molde en la PCR con el oligonucleótido AD1 como cebador 5' y MAK2 (5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTC-3' SEQ ID NO:41) como cebador 3'. Los fragmentos de ADN de aproximadamente 500 pb se clonan en pUC19. Se seleccionan varios clones para el análisis de secuencia para verificar que la secuencia clonada abarca la región constante de inmunoglobulina murina esperada. Los oligonucleótidos de Not1-MAK1 y MAK2 proceden de la región V_K y tienen 182 y 84 pb, respectivamente, cadena abajo del primer par de bases del gen C kappa. Se seleccionan los clones que incluyen el péptido V_K y líder completo.

Para la clonación del gen de V_H, se prepara ADNc bicatenario usando el cebador Not1-MAG1 (5'-CGCGGCCGCAGCTGCTCAGAGTGTAGA-3' SEQ ID NO: 42). Los adaptadores hibridados AD1 y AD2 se ligan a ambos extremos 5' y 3' del ADNc bicatenario. Los adaptadores en los extremos 3' se retiran mediante digestión de NotI. Después, se usa el producto digerido como molde en la PCR con el oligonucleótido AD1 y MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGGAAATA-3' SEQ ID NO:43) como cebadores. Se clonan fragmentos de ADN de 500 a 600 pb de longitud en pUC19. Los oligonucleótidos NotI-MAG1 y MAG2 proceden de la región Cγ.7.1 murina y tienen 180 y 93 pb, respectivamente, cadena abajo del primer pb del gen Cγ.7.1 murino. Se seleccionan clones que abarcan el péptido V_H completo y líder.

2. Construcción de vectores de expresión para IgG y Fab quimérico para MASP-2. Los genes de V_H y V_K clonados descritos anteriormente se usan como moldes en una reacción PRC para añadir la secuencia consenso Kozak para el extremo 5' y el donante de corte y empalme para el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos. Después de analizar las secuencias para confirmar la ausencia de errores de la PCR, los genes de V_H y V_K se insertan en casetes de vector de expresión que contienen C.γ1 y C. kappa humano, respectivamente, para dar pSV2neoV_H-huCγ1 y pSV2neoV-huCγ. Los ADN de plásmido purificados con gradiente de CsCl de los vectores de cadena pesada y ligera se usan para transfectar células COS mediante electroporación. Después de 48 horas, se

ensaya el sobrenadante de cultivo mediante ELISA para confirmar la presencia de aproximadamente 200 ng/ml de IgG quimérica. Se recogen las células y se prepara el ARN total. Se sintetiza ADNc de primera hebra a partir del ARN total usando oligo dT como cebador. Este ADNc se usa como molde en la PCR para generar los fragmentos de ADN Fd y kappa. Para el gen Fd, se lleva a cabo la PCR usando 5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAACT-3' (SEQ ID NO: 44) como cebador 5' y un cebador 3' derivado de CH1 (5'-CGGGATCCTCAAACTTTCTTGTCCACCTTGG-3' SEQ ID NO: 45). Se confirma que la secuencia de ADN contiene la V_H y el dominio CH1 completo de IgG1 humana. Después de la digestión con las enzimas adecuadas, los fragmentos de ADN de Fc se insertan en los sitios de restricción de HindIII y BamHI del casete de vector de expresión pSV2dhfr-TUS para dar pSV2dhfrFd. El plásmido pSV2 está disponible comercialmente y consiste en segmentos de ADN de varias fuentes: el ADN de pBR322 (línea fina) contiene el ADN de origen de replicación de pBR322 (pBR ori) y el gen de lactamasa de resistencia a la ampicilina (Amp); El ADN de SV40, representado por rayado más ancho y marcado, contiene el ADN de origen de replicación de SV40 (SV40 ori), el promotor temprano (5' respecto de los genes dhfr y neo) y la señal de poliadenilación (3' respecto de los genes dhfr y neo). La señal de poliadenilación (pA) derivada de SV40 también se coloca en el extremo 3' del gen de Fd.

Para el gen kappa, se lleva a cabo la PCR usando 5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTCACTAGCTCT-3' (SEQ ID NO: 46) como cebador 5' y un cebador 3' derivado de C_K (5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACACTCT-3' SEQ ID NO: 47). Se confirma que la secuencia de ADN contiene las regiones V_K y C_K humanas completas. Tras la digestión con enzimas de restricción adecuadas, los fragmentos de ADN de kappa se insertan en los sitios de restricción de HindIII y BamHI del casete de vector de expresión pSV2neo-TUS para dar pSV2neoK. La expresión de los genes tanto Fd como kappa está dirigida por los elementos potenciadores y promotores derivados de HCMV. Ya que el gen Fd no incluye el resto de aminoácido de cisteína implicado en el enlace disulfuro intercadena, este Fab quimérico recombinante contiene cadenas pesadas y ligeras unidas de manera no covalente. El Fab quimérico se diseña en forma de cFab.

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

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

Para generar líneas celulares que secretan IgG anti-MASP-2 quimérica, se transfectan células NSO transfectadas con ADN plasmídico purificados de pSV2neoV_H-huC.γl y pSV2neoV-huC kappa mediante electroporación. Las células transfectadas se seleccionan en presencia de 0,7 mg/ml de G418. Las células se cultivan en un matraz de centrifugación de 250 ml usando medio que contiene suero.

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

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

Para generar líneas celulares que secretan Fab quimérico anti-MASP-2, se transfectan células CHO con ADN plasmídicos purificados 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 amplifican en concentraciones crecientes de metotrexato. Las células se subclonan en células individuales mediante dilución limitante. Después, se cultivan las líneas celulares subclonadas de células individuales con alta producción en 100 ml de cultivo de centrifugación usando medio asérico.

El Fab anti-MASP-2 quimérico se purifica mediante cromatografía de afinidad usando un MoAb anti-idiotípico de ratón para el MoAb para MASP-2. Puede producirse un MoAb anti-idiotípico para MASP-2 inmunizando a ratones con un MoAb murino anti-MASP-2 conjugado con hemocianina de lapa californiana (KLH) y seleccionando respecto de la unión de MoAb específicos que pueden competir con MASP-2 humana. Para la purificación, se cargan 100 ml de sobrenadante de cultivos de centrifugación de células CHO que producen cFab o cFab/9aa sobre la columna de afinidad acoplados con un MoAb anti-idiotípico para MASP-2. Después, se lava la columna exhaustivamente con PBS antes de eluir el Fab unido con dietilamina 50 mM, pH 11,5. Las sales residuales se retiran por intercambio de tampón, como se ha descrito anteriormente. La concentración de proteína del Fab purificado se determina mediante el método de BCA (Pierce).

Puede determinarse la capacidad de la IgG, el cFab y el cFab/9aa para MASP-2 quimérico para inhibir las vías de complemento dependientes de MASP-2 usando el ensayo inhibidor descrito en el **ejemplo 2 o el ejemplo 7.**

Ejemplo 7

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

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

Reactivos: El *S. aureus* (DSM20233) fijado en formalina se prepara del siguiente modo: se cultivan las bacterias por la noche a 37°C en medio de soja tríptica y sangre, se lava tres veces con PBS, después, se fija durante 1 h a temperatura ambiente en PBS/formalina al 0,5% y se lava tres veces más con PBS, antes de resuspenderlo en tampón de ensayo (Na_2Co_3 15 mM, $NaHCO_3$ 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 fijado en formalina (DO_{550} = 0,5) en tampón de recubrimiento con 1 ug de L-ficolina en tampón de recubrimiento. Tras incubar durante una noche, se bloquean los pocillos con seroalbúmina humana (HSA) al 0,1% en TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4), después se lavan con TBS que contiene Tween 20 al 0,05% y $CaCl_2$ 5 mM (tampón de lavado). Las muestras de suero humano se diluyen en Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 mM, $CaCl_2$ 10 mM, Triton X-100 al 0,05%, HSA al 0,1%, pH 7,4, que previene la activación de C4 endógeno y disocia el complejo C1 (formado por C1q, C1r y C1s). Se añaden a las muestras de suero agentes inhibidores de MASP-2, incluyendo MoAb anti-MASP-2 y péptidos inhibidores a diversas concentraciones. Las muestras diluidas se añaden a la placa y se incuban durante una noche a 4°C. Transcurridas 24 horas, se lavan las placas exhaustivamente con tampón de lavado, después se añade a cada pocillo 0,1 µg de C4 humano purificado (obtenido como se describe en Dodds, A.W., *Methods Enzymol.* 223:46, 1993) en 100 µl de barbital 4 mM, NaCl 145 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 7,4. Después de 1,5 h a 37°C, se lavan nuevamente las placas y se detecta la deposición de C4b usando anticuerpo de pollo anti-C4c humano conjugado a fosfatasa alcalina (obtenido de Immunsystem, Uppsala, Suecia) y se mide usando el sustrato colorimétrico, fosfato de p-nitrofenilo.

Ensayo de C4 sobre manano: Se adapta el ensayo descrito anteriormente para medir la activación de la vía de lectina por MBL recubriendo la placa con LPS y manano antes de añadir suero mezclado con diversos agentes inhibidores de MASP-2.

Ensayo de C4 sobre H-ficolina (Hakata Ag): Se adapta el ensayo descrito anteriormente para medir la activación de la vía de lectina por H-ficolina recubriendo la placa con LPS y H-ficolina antes de añadir suero mezclado con diversos agentes inhibidores de MASP-2.

Ejemplo 8

El siguiente ensayo demuestra la presencia de activación de la vía clásica en ratones de tipo silvestre y MASP-2-/-.

Métodos: Se generaron inmunocomplejos *in situ* recubriendo placas de microtitulación (Maxisorb, Nunc, n.º de cat. 442404, Fisher Scientific) con seroalbúmina humana al 0,1% en Tris 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 durante 1 hora a temperatura ambiente seguido de incubación durante una noche a 4°C con antisuero de oveja anti suero completo (Scottish Antibody Production Unit, Carluke, Escocia) diluido a 1:1000 en TBS/tween/Ca^{2+}. Se obtuvieron muestras de suero de ratones de tipo silvestre y MASP-2-/- y se añadieron a las placas recubiertas. Se prepararon muestras de control en las que se agotó C1q a partir de muestras de suero de tipo silvestre y MASP-2-/-. El suero de ratón empobrecido para C1q se preparó usando Dynabeads acopladas a proteína A (Dynal Biotech, Oslo, Noruega) recubiertas con IgG de conejo anti-C1q humano (Dako, Glostrup, Dinamarca), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas se incubaron durante 90 minutos a 37°C. C3b unido se detectó con un anticuerpo policlonal anti-C3c humano (Dako A 062) diluido en TBS/tw/ Ca^{++} a 1:1000. El anticuerpo secundario es de cabra anti-IgG de conejo.

Resultados: La **FIGURA 7** muestra los niveles de deposición relativa de C3b sobre placas recubiertas con IgG en suero de tipo silvestre, suero de MASP-2-/-, suero de tipo silvestre con C1q agotado y de MASP-2-/- con C1q agotado. Estos resultados demuestran que la vía clásica permanece intacta en la estirpe de ratón MASP-2-/-.

Ejemplo 9

Se usa el siguiente ensayo para probar si un agente inhibidor de MASP-2 bloquea la vía clásica analizando el efecto de un agente inhibidor de MASP-2 en condiciones en las que se inicia la vía clásica mediante inmunocomplejos.

Métodos: Para probar el efecto de un agente inhibidor de MASP-2 en condiciones de activación del complemento, donde se inicia la vía clásica mediante inmunocomplejos, se incuban muestras de 50 µl por triplicado que contienen NHS al 90% a 37°C en presencia de 10 µg/ml de inmunocomplejo (IC) o PBS y también se incluyen muestras por triplicado en paralelo (+/- 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 se enfrían inmediatamente las muestras a 5°C. Después, se almacenan las muestras a -70°C antes de ensayarlas respecto de los productos de activación de complemento (C3a y sC5b-9)

usando kits para ELISA (Quidel, n.º de catálogo A015 y A009) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 10

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

Antecedentes y base lógica: MASP-2 es una proteína compleja con diversos dominios funcionales separados, incluyendo: sitios de unión para MBL y ficolinas, un sitio catalítico de serina proteasa, un sitio de unión para el sustrato catalítico C2, un sitio de unión para el sustrato catalítico C4, un sitio de escisión de MASP-2 para la autoactivación de del cimógeno de MASP-2 y dos sitios de unión a Ca^{++}. Se identificaron fragmentos de anticuerpo Fab2 que se unen con alta afinidad a MASP-2 y se ensayaron los fragmentos Fab2 identificados en un ensayo funcional para determinar si eran capaces de bloquear la actividad funcional de MASP-2.

Para bloquear la actividad funcional de MASP-2, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo Fab2 ha de unirse e interferir con un epítopo estructural en MASP-2 que es necesario para la actividad funcional de MASP-2. Por lo tanto, muchos de los Fab2 anti-MASP-2 con alta afinidad de unión pueden no inhibir la actividad funcional de MASP-2 a menos que se unan a epítopos estructurales de MASP-2 que estén implicados directamente en la actividad funcional de MASP-2.

Se usó un ensayo funcional que mide la inhibición de la formación de C3 convertasa de la vía de lectina para evaluar la "actividad de bloqueo" de los Fab2 anti-MASP-2. Se sabe que el papel fisiológico principal de MASP-2 en la vía de lectina es generar el siguiente componente funcional de la vía de complemento mediada por lectina, a saber, la C3 convertasa de la vía de lectina. La C3 convertasa de la vía de lectina es un complejo enzimático crítico (C4bC2a) que escinde proteolíticamente a C3 en C3a y C3b. MASP-2 no es un componente estructural de la C3 convertasa de la vía de lectina (C4bC2a); sin embargo, es necesaria la actividad funcional de MASP-2 para generar los dos componentes de proteína (C4b, C2a) que forman la C3 convertasa de la vía de lectina. Además, parece que son necesarias todas las actividades funcionales individuales de MASP-2 enumeradas anteriormente para que MASP-2 genere la C3 convertasa de la vía de lectina. Por estos motivos, se cree que un ensayo preferido para su uso en la evaluación de la "actividad de bloqueo" de los Fab2 anti-MASP-2 es un ensayo funcional que mide la inhibición de la formación de C3 convertasa de la vía de lectina.

Generación de Fab2 de alta afinidad: Se usó una biblioteca de presentación en fagos de secuencias de anticuerpo humano de cadena ligera y pesada variable y tecnología de selección de anticuerpos automatizada para identificar Fab2 que reaccionan con ligandos seleccionados de interés para generar Fab2 de alta afinidad contra proteína MASP-2 de rata (SEQ ID NO: 55). Se utilizó una cantidad conocida de MASP-2 de rata (~1 mg, >85% de pureza) para la selección de anticuerpos. Se utilizaron tres rondas de amplificación para la selección de anticuerpos con la mejor afinidad. Se escogieron aproximadamente 250 aciertos diferentes que expresan anticuerpos para la exploración por ELISA. Los aciertos de alta afinidad se secuenciaron posteriormente para determinar el carácter único de los diferentes anticuerpos.

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

Ensayos usados para evaluar la actividad inhibidora (de bloqueo) de los Fab2 anti-MASP-2

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

Antecedentes: La C3 convertasa de la vía de lectina es el complejo enzimático (C4bC2a) que escinde proteolíticamente a C3 en los dos potentes fragmentos proinflamatorios, la anafilotoxina C3a y la opsonina C3b. Parece ser que la formación de C3 convertasa es una etapa clave en la vía de lectina en lo referente a mediar la inflamación. MASP-2 no es un componente estructural de la C3 convertasa de la vía de lectina (C4bC2a); por lo tanto, los anticuerpos (o Fab2) anti-MASP-2 no inhibirán directamente la actividad de la C3 convertasa preexistente. Sin embargo, es necesaria la actividad serina proteasa de MASP-2 para generar los dos componentes de proteína (C4b, C2a) que forman la C3 convertasa de la vía de lectina. Por lo tanto, un Fab2 anti-MASP-2 que inhiba la actividad funcional de MASP-2 (es decir, un Fab2 anti-MASP-2 de bloqueo) inhibirá la formación *de novo* de la C3 convertasa de la vía de lectina. C3 contiene un grupo tioéster infrecuente y altamente reactivo como parte de su estructura. Tras la escisión de C3 por la C3 convertasa en este ensayo, el grupo tioéster en C3b puede formar un enlace covalente con grupos hidroxilo o amino en macromoléculas inmovilizadas sobre el fondo de los pocillos de plástico mediante engarces de éster o amida, facilitando de este modo la detección de C3b en el ensayo ELISA.

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

y la consiguiente generación de C3b.

Métodos:

se incubaron placas de unión media Costar de 96 pocillos durante una noche a 5°C con manano diluido en tampón carbonato 50 mM, pH 9,5 a 1 ug/50 Tl/pocillo. Tras incubar durante una noche, se lavó tres veces cada pocillo con 200 Tl de PBS. Después, se bloquearon los pocillos con 100 Tl/pocillo de seroalbúmina bovina al 1% en PBS y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con mezclado suave. Después, se lavó tres veces cada pocillo con 200 Tl de PBS. Las muestras de Fab2 anti-MASP-2 se diluyeron a concentraciones seleccionadas en tampón GVB que contenía Ca^{++} y Mg^{++} (barbital 4,0 mM, NaCl 141 mM, $MgCl_2$ 1,0 mM, $CaCl_2$ 2,0 mM, gelatina al 0,1%, pH 7,4) a 5 C. Se añadió suero de rata al 0,5% a las muestras anteriores a 5°C y se transfirieron 100 Tl a cada pocillo. Se cubrieron las placas y se incubaron durante 30 minutos en un baño de agua a 37°C para permitir la activación del complemento. La reacción se detuvo transfiriendo las placas del baño de agua a 37°C a un contenedor que contenía una mezcla de hielo-agua. Se lavó cada pocillo cinco veces con 200 Tl con PBS-Tween 20 (Tween 20 al 0,05% en PBS), después se lavó con 200 Tl de PBS. Se añadieron 100 Tl/pocillo de una dilución 1:10.000 del anticuerpo primario (de conejo anti-C3c humano, DAKO A0062) en PBS que contenía 2,0 mg/ml de seroalbúmina bovina y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con mezclado suave. Cada pocillo se lavó 5 x 200 Tl de PBS. Se añadieron 100 Tl/pocillo de una dilución 1:10.000 del anticuerpo secundario (de cabra anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa, American Qualex A102PU) en PBS que contenía 2,0 mg/ml de seroalbúmina bovina y se incubó durante una hora a temperatura ambiente en un agitador con mezclado suave. Se lavó cinco veces cada pocillo con 200 Tl de PBS. Se añadieron 100 Tl/pocillo del sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. La reacción de peroxidasa se detuvo añadiendo 100 Tl/pocillo de H_3PO_4 1,0 M y se midió la DO_{450}.

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

Antecedentes: La actividad serina proteasa de MASP-2 es altamente específica y solo se han identificado dos sustratos de proteína para MASP-2; C2 y C4. La escisión de C4 genera C4a y C4b. El Fab2 anti-MASP-2 puede unirse a epítopos estructurales en MASP-2 que están implicados directamente en la escisión de C4 (por ejemplo, el sitio de unión de MASP-2 para C4; el sitio catalítico de serina proteasa de MASP-2) y de este modo, inhibe la actividad funcional de escisión de C4 de MASP-2.

El manano de levadura es un activador conocido de la vía de lectina. En el siguiente método para medir la actividad de escisión de C4 de MASP-2, se incubaron pocillos de plástico recubiertos con manano durante 30 minutos a 37°C con suero de rata diluido para activar la vía de lectina. Ya que el anticuerpo primario usado en este ensayo ELISA solo reconoce a C4 humano, el suero de rata diluido también se complementó con C4 humano (1,0 Tg/ml). Después, se lavaron y ensayaron los pocillos respecto de C4b humano inmovilizado sobre los pocillos usando métodos ELISA convencionales. La cantidad de C4b generado en este ensayo es una medida de la actividad de escisión de C4 dependiente de MASP-2. En este ensayo se probaron Fab2 anti-MASP-2 a concentraciones seleccionadas respecto de su capacidad para inhibir la escisión de C4.

Métodos: Se incubaron placas de unión media Costar de 96 pocillos durante una noche a 5°C con manano diluido en tampón carbonato 50 mM, pH 9,5 a 1,0 Tg/50 Tl/pocillo. Cada pocillo se lavó 3X 200 Tl de PBS. Después, se bloquearon los pocillos con 100 Tl/pocillo de seroalbúmina bovina al 1% en PBS y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con mezclado suave. Cada pocillo se lavó 3X 200 Tl de PBS. Las muestras de Fab2 anti-MASP-2 se diluyeron a concentraciones seleccionadas en tampón GVB que contenía Ca^{++} y Mg^{++} (barbital 4,0 mM, NaCl 141 mM, $MgCl_2$ 1,0 mM, $CaCl_2$ 2,0 mM, gelatina al 0,1%, pH 7.4) a 5°C. También se incluyó en estas muestras 1,0 Tg/ml de C4 humano (Quidel). Se añadió suero de rata al 0,5% a las muestras anteriores a 5°C y se transfirieron 100 Tl a cada pocillo. Se cubrieron las placas y se incubaron durante 30 min en un baño de agua a 37°C para permitir la activación del complemento. La reacción se detuvo transfiriendo las placas del baño de agua a 37°C a un contenedor que contenía una mezcla de hielo-agua. Se lavó cada pocillo 5 x con 200 Tl con PBS-Tween 20 (Tween 20 al 0,05% en PBS), después, se lavó cada pocillo 2X con 200 Tl de PBS. Se añadieron 100 Tl/pocillo de una dilución 1:700 de anticuerpo de pollo anti-C4c humano conjugado a biotina (Immunsystem AB, Uppsala, Suecia) en PBS que contenía 2,0 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con mezclado suave. Cada pocillo se lavó 5 x 200 Tl de PBS. Se añadieron 100 Tl/pocillo de 0,1 Tg/ml de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Pierce Chemical n.º 21126) en PBS que contenía 2,0 mg/ml de BSA y se incubó durante una hora a temperatura ambiente en un agitador con mezclado suave. Se lavó cada pocillo con 5 x 200 Tl con PBS. Se añadieron 100 Tl/pocillo del sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 16 min. La reacción de peroxidasa se detuvo añadiendo 100 Tl/pocillo de H_3PO_4 1,0 M y se midió la DO_{450}.

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

Antecedentes: MASP-2 se encuentra normalmente presente en plasma en forma de un complejo dimérico de MASP-2 que también incluye moléculas de lectina específicas (proteína de unión a manosa (MBL) y ficolinas). Por lo tanto, en caso de que se esté interesado en estudiar la unión del Fab2 anti-MASP-2 a la forma fisiológicamente relevante de MASP-2, es importante desarrollar un ensayo de unión en el que se use la interacción entre el Fab2 y MASP-2

nativo en plasma, en lugar de MASP-2 recombinante purificado. En este ensayo de unión, se inmovilizó en primer lugar el complejo MASP-2-MBL "nativo" procedente de suero de rata al 10% sobre pocillos recubiertos de manano. Después, se estudió la afinidad de unión de diversos Fab2 anti-MASP-2 al MASP-2 "nativo" inmovilizado usando una metodología ELISA convencional.

Métodos: se incubaron placas de alta unión Costar de 96 pocillos durante una noche a 5°C con manano diluido en tampón carbonato 50 mM, pH 9,5 a 1 Tg/50 Tl/pocillo. Cada pocillo se lavó 3X 200 Tl de PBS. Los pocillos se bloquearon con 100 Tl/pocillo de leche deshidratada desgrasada al 0,5% en PBST (PBS con Tween 20 al 0,05%) y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con mezclado suave. Cada pocillo se lavó 3X 200 Tl de tampón de lavado TBS/Tween/Ca^{++} (suero salino tamponado con Tris, Tween 20 al 0,05%, que contenía $CaCl_2$ 5,0 mM, pH 7,4). Se preparó sobre hielo suero de rata al 10% en tampón de unión de alta salinidad (Tris 20 mM, NaCl 1,0 mM, $CaCl_2$ 10 mM, Triton-X100 al 0,05%, seroalbúmina bovina al 0,1% (p/v), pH 7,4). Se añadieron 100 Tl/pocillo y se incubó durante una noche a 5°C. Los pocillos se lavaron 3X con 200 Tl de tampón de lavado TBS/Tween/Ca^{++}. Después, se lavaron los pocillos 2X con 200 Tl de PBS. Se añadieron 100 Tl/pocillo de una concentración seleccionada de Fab2 anti-MASP-2 seleccionado diluido en tampón GVB que contenía Ca^{++} y Mg^{++} (barbital 4,0 mM, NaCl 141 mM, $MgCl_2$ 1,0 mM, $CaCl_2$ 2,0 mM, gelatina al 0,1%, pH 7,4) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con mezclado suave. Cada pocillo se lavó 5 x 200 Tl de PBS. Se añadieron 100 Tl/pocillo de anticuerpo de cabra anti-Fab2 conjugado con HRP (Biogenesis, n.º de cat. 0500-0099) diluido a 1:5000 en 2,0 mg/ml de seroalbúmina bovina y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con mezclado suave. Cada pocillo se lavó 5 x 200 Tl de PBS. Se añadieron 100 Tl/pocillo del sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 70 min. La reacción de peroxidasa se detuvo añadiendo 100 Tl/pocillo de H_3PO_4 1,0 M y se midió la DO_{450}.

RESULTADOS:

Se escogieron para la selección por ELISA aproximadamente 250 Fab2 que reaccionaron con alta afinidad con la proteína MASP-2 de rata. Estos Fab2 de alta afinidad se secuenciaron para determinar el carácter único de los diferentes anticuerpos y se purificaron para su análisis adicional 50 anticuerpos anti-MASP-2 únicos. Se usaron 250 µg de cada anticuerpo Fab2 purificado para la caracterización de la afinidad de unión a MASP-2 y la prueba funcional de la vía de complemento. Los resultados de este análisis se muestran a continuación en la **TABLA 6.**

TABLA 6: FAB2 ANTI-MASP-2 QUE BLOQUEAN LA ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO DE LA VÍA DE LECTINA

N.º de anticuerpo Fab2	C3 convertasa (CI_{50} (nM))	K_d	Escisión de C4 CI_{50} (nM)
88	0,32	4,1	ND
41	0,35	0,30	0,81
11	0,46	0,86	<2 nM
86	0,53	1,4	ND
81	0,54	2,0	ND
66	0,92	4,5	ND
57	0,95	3,6	<2 nM
40	1,1	7,2	0,68
58	1,3	2,6	ND
60	1,6	3,1	ND
52	1,6	5,8	<2 nM
63	2,0	6,6	ND
49	2,8	8,5	<2 nM
89	3,0	2,5	ND
71	3,0	10,5	ND
87	6,0	2,5	ND
67	10,0	7,7	ND

Tal como se muestra en la **TABLA 6,** de los 50 Fab2 anti-MASP-2 evaluados, se identificaron diecisiete Fab2 como Fab2 bloqueantes de MASP-2 que inhiben potentemente la formación de C3 convertasa con una CI_{50} igual o menor

a 10 nM de Fab2 (una tasa de acierto positivo del 34%). Ocho de los diecisiete Fab2 identificados tienen valores de CI_{50} en el intervalo subnanomolar. Además, los diecisiete Fab2 bloqueantes de MASP-2 mostrados en la **TABLA 6** proporcionaron una inhibición esencialmente completa de la formación de C3 convertasa en el ensayo de C3 convertasa de la vía de lectina. La **FIGURA 8A** ilustra gráficamente los resultados del ensayo de formación de C3 convertasa para el anticuerpo Fab2 n.º 11, que es representativo de los otros anticuerpos Fab2 ensayados, cuyos resultados se muestran en la **TABLA 6.** Esta es una consideración importante, ya que es teóricamente posible que un Fab2 "de bloqueo" pueda inhibir la función de MASP-2 solo de manera fraccional, incluso cuando cada molécula de MASP-2 está unida al Fab2.

Aunque el manano es un activador conocido de la vía de lectina, es teóricamente posible que la presencia de anticuerpos anti-manano en el suero de rata también pueda activar la vía clásica y generar C3b por la vía clásica de C3 convertasa. Sin embargo, cada uno de los diecisiete Fab2 anti-MASP-2 de bloqueo listado en este ejemplo inhibió potentemente la generación de C3b (>95 %), demostrando de este modo la especificidad de este ensayo para la C3 convertasa de la vía de lectina.

También se llevaron a cabo ensayos de unión con los diecisiete Fab2 de bloqueo para calcular una K_d aparente para cada uno. Los resultados de los ensayos de unión de Fab2 anti-MASP-2 de rata a MASP-2 de rata nativo para seis de los Fab2 de bloqueo también se muestran en la **TABLA 6.** La **FIGURA 8B** ilustra gráficamente lo resultados de un ensayo de unión con el anticuerpo Fab2 n.º 11. También se llevaron a cabo ensayos de unión similares para los otros Fab2, cuyos resultados se muestran en la **TABLA 6.** En general, las K_d aparentes obtenidas para la unión de cada uno de los seis Fab2 a MASP-2 "nativo" se corresponden razonablemente bien con la CI_{50} para el Fab2 en el ensayo funcional de C3 convertasa. Hay pruebas de que MASP-2 sufre un cambio conformacional de una forma "inactiva" a una forma "activa" tras la activación de su actividad proteasa (Feinberg et al., *EMBO J 22*:2348-59 (2003); Gal et al., *J. Biol. Chem. 280*:33435-44 (2005)). En el plasma de rata normal usado en el ensayo de formación de C3 convertasa, MASP-2 está presente principalmente en la conformación de cimógeno inactiva. En cambio, en el ensayo de unión, MASP-2 está presente como parte de un complejo con MBL unida a manano inmovilizado; por lo tanto, el MASP-2 estaría en la conformación "activa" (Petersen et al., *J. Immunol Methods* 257:107-16, 2001). Por consiguiente, no se podría esperar necesariamente una correspondencia exacta entre la CI_{50} y la K_d para cada uno de los diecisiete Fab2 de bloqueo probados en estos dos ensayos funcionales, ya que en cada ensayo, el Fab2 se uniría a una forma conformacional distinta de MASP-2. Sin embargo, con la excepción del Fab2 n.º 88, parece haber una correspondencia razonablemente estrecha entre la CI_{50} y la K_d aparente para cada uno de los dieciséis Fab2 probados en los dos ensayos (véase la **TABLA 6**).

Se evaluaron varios de los Fab2 de bloqueo respecto de la inhibición de la escisión de C4 mediada por MASP-2. La **FIGURA 8C** ilustra gráficamente los resultados de un ensayo de escisión de C4, que muestra inhibición con el Fab2 n.º 41, con una CI_{50}=0,81 nM (véase la **TABLA 6**). Tal como se muestra en la **FIGURA 9,** se observó que todos los Fab2 ensayados inhibían la escisión de C4 con valores de CI_{50} similares a los obtenido en el ensayo de C3 convertasa (véase la **TABLA 6**).

Aunque el manano es un activador conocido de la vía de lectina, es teóricamente posible que la presencia de anticuerpos anti-manano en el suero de rata también pueda activar la vía clásica y de este modo generar C4b mediante escisión de C4 mediada por C1s. Sin embargo, se han identificado varios Fab2 anti-MASP-2 que potencialmente inhiben la generación de C4b (>95 %), demostrando de este modo la especificidad de este ensayo para la escisión de C4 mediada por MASP-2. C4, al igual que C3, contiene un grupo tioéster infrecuente y altamente reactivo como parte de su estructura. Tras la escisión de C4 por MASP-2 en este ensayo, el grupo tioéster en C4b puede formar un enlace covalente con grupos hidroxilo o amino en macromoléculas inmovilizadas sobre el fondo de los pocillos de plástico mediante engarces de éster o amida, facilitando de este modo la detección de C4b en el ensayo ELISA.

Estos estudios demuestran claramente la creación de Fab2 de alta afinidad contra la proteína MASP-2 de rata que bloquean funcionalmente la actividad de C4 y C3 convertasa, impidiendo de este modo la activación de la vía de lectina.

Ejemplo 11

Este ejemplo describe el mapeo de epítopos para varios de los anticuerpos Fab2 anti-MASP-2 de rata de bloqueo que se generaron como se describe en el **ejemplo 10.**

Métodos:

Tal como se muestra en la **FIGURA 10,** las siguientes proteínas, todas con marcadores de 6X His N-terminales, se expresaron en células CHO usando el vector pED4:

MASP-2A de rata, una proteína MASP-2 de longitud completa, inactivada alterando la serina en el centro activo por alanina (S613A);
MASP-2K de rata, una proteína MASP-2 de longitud completa alterada para reducir la autoactivación (R424K);
CUBI-II, un fragmento N-terminal de MASP-2 de rata que solo contiene los dominios CUBI, similar a EGF y CUBII; y

CUBI/similar a EGF, un fragmento N-terminal de MASP-2 de rata que solo contiene los dominios CUBI y similar a EGF.

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

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

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

ANÁLISIS DE TRANSFERENCIA POR PUNTOS:

Se añadieron por puntos diluciones seriadas de los cinco polipéptidos de MASP-2 recombinantes descritos anteriormente y mostrados en la **FIGURA 10** (y el polipéptido de tiorredoxina como control negativo para el polipéptido de CCPII-serina proteasa) sobre una membrana de nitrocelulosa. La cantidad de proteína añadida varió de 100 ng a 6,4 pg, en etapas de factor cinco. En experimentos posteriores, la cantidad de proteína añadida varió de 50 ng hasta 16 pg, nuevamente en etapas de factor cinco. Las membranas se bloquearon con leche en polvo desgrasada al 5% en TBS (tampón de bloqueo) y después se incubaron con 1,0 µg/ml de Fab2 anti-MASP-2 en tampón de bloqueo (que contenía Ca^{2+} 5,0 mM). Los Fab2 unidos se detectaron usando anticuerpo anti-Fab humano conjugado a HRP (AbD/Serotec; diluido a 1/10.000) y un kit de detección de ECL (Amersham). Se incubó una membrana con Ac policlonal de conejo anti-MASP-2 humano (descrito en Stover et al., *J Immunol 163*:6848-59 (1999)) como control positivo. En este caso, el Ac unido se detectó usando anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a HRP (Dako; diluido a 1/2.000).

Ensayo de unión a MASP-2

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

RESULTADOS:

Los resultados del análisis de transferencia por puntos que demuestran la reactividad de los Fab2 con diversos polipéptidos de MASP-2 se proporcionan a continuación en la **TABLA 7.** Los valores numéricos proporcionados en la **TABLA 7** indican la cantidad de proteína añadida por puntos necesaria para dar una fuerza de la señal aproximadamente semimáxima. Tal como se muestra, todos los polipéptidos (con la excepción del compañero de fusión de tiorredoxina solo) fueron reconocidos por el Ac de control positivo (suero policlonal anti-MASP-2 humano, generado en conejos).

TABLA 7: REACTIVIDAD CON DIVERSOS POLIPÉPTIDOS MASP-2 DE RATA EN TRANSFERENCIAS POR PUNTOS

N.º de anticuerpo Fab2	MASP-2A	CUBI-II	CUBI/SIMILAR A EGF	CCPII-SP	Tiorredoxina
40	0,16 ng	NR	NR	0,8 ng	NR
41	0,16 ng	NR	NR	0,8 ng	NR
11	0,16 ng	NR	NR	0,8 ng	NR
49	0,16 ng	NR	NR	>20 ng	NR
52	0,16 ng	NR	NR	0,8 ng	NR
57	0,032 ng	NR	NR	NR	NR
58	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
60	0,4 ng	0,4 ng	NR	NR	NR
63	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR

N.º de anticuerpo Fab2	MASP-2A	CUBI-II	CUBI/SIMILAR A EGF	CCPII-SP	Tiorredoxina
66	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
67	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
71	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
81	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
86	0,4 ng	NR	NR	10 ng	NR
87	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
Control positivo	<0,032 ng	0,16 ng	0,16 ng	<0,032 ng	NR

NR = Sin reacción. El anticuerpo de control positivo es suero policlonal anti-MASP-2 humano, generado en conejos.

Todos los Fab2 reaccionaron con MASP-2A así como con MASP-2K (datos no mostrados). La mayoría de los Fab2 reconocieron el polipéptido CCPII-SP, pero no los fragmentos N-terminales. Las dos excepciones son el Fab2 n.º 60 y el Fab2 n.º 57. El Fab2 n.º 60 reconoce a MASP-2A y el fragmento CUBI-II, pero no el polipéptido CUBI/similar a EGF o el polipéptido CCPII-SP, lo que sugiere que se une a un epítopo en CUBII o que abarca el dominio CUBII y el similar a EGF. El Fab2 n.º 57 reconoce a MASP-2A pero no a ninguno de los fragmentos de MASP-2 ensayados, lo que indica que este Fab2 reconoce un epítopo en CCP1. Los Fab2 n.º 40 y n.º 49 se unieron únicamente a MASP-2A completo. En el ensayo de unión ELISA mostrado en la **FIGURA 11,** el Fab2 n.º 60 también se unió al polipéptido CUBI-II, aunque con una afinidad aparente ligeramente menor.

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

Ejemplo 12

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

Antecedentes/Base lógica: La lesión por isquemia-reperfusión (I/R) en el riñón a temperatura corporal es relevante en una serie de afecciones clínicas, incluyendo el choque hipovolémico, la oclusión de la arteria renal y los procedimientos de pinzamiento cruzado.

La isquemia-reperfusión (I/R) renal es una causa importante de fallo renal agudo, asociada con una tasa de mortalidad de hasta el 50% (Levy et al., *JAMA 275*:1489-94, 1996; Thadhani et al., *N. Engl. J. Med. 334*:1448-60, 1996). El fallo renal pos-trasplante es una complicación común y grave después del trasplante renal (Nicholson et al., *Kidney Int. 58*:2585-91, 2000). En la actualidad no hay disponible ningún tratamiento eficaz para la lesión por I/R renal y la hemodiálisis es el único tratamiento disponible. La fisiopatología de la lesión por I/R renal es complicada. Estudios recientes han demostrado que la vía de lectina de activación del complemento puede tener un papel importante en la patogénesis de la lesión por I/R renal (deVries et al., *Am. J. Path. 165*:1677-88, 2004).

Métodos:

Se generó un ratón MASP-2(-/-) como se describe en el **ejemplo 1** y se retrocruzó durante al menos 10 generaciones con C57B1/6. Se administró a seis ratones MASP-2(-/-) y seis de tipo silvestre (+/+) macho con un peso de entre 22-25 g una inyección intraperitoneal de Hypnovel (6,64 mg/kg; Roche products Ltd. Welwyn Garden City, R. U.) y posteriormente se les anestesió mediante inhalación de isoflurano (Abbott Laboratories Ltd., Kent, R. U.). Se seleccionó el isoflurano ya que es un anestésico suave por inhalación con una toxicidad hepática mínima; las concentraciones se producen de manera precisa y el animal se recupera rápidamente, incluso tras una anestesia prolongada. Se administró Hypnovel ya que produce una afección de neuroleptanalgesia en el animal y esto significa que se necesita administrar menos cantidad de isoflurano. Se colocó debajo del animal un lecho caliente para mantener una temperatura corporal constante. A continuación, se practicó una incisión abdominal por la línea media y se mantuvo abierta la cavidad corporal usando un par de retractores. Se apartó el tejido conectivo por encima y por debajo de la vena y la arteria renal de los riñones derecho e izquierdo y se pinzó el pedículo renal mediante la aplicación de pinzas de microaneurisma durante un periodo de 55 minutos. Este periodo de isquemia se basó inicialmente en un estudio previo llevado a cabo en este laboratorio (Zhou et al., *J. Clin. Invest.* 105:1363-71 (2000)). Además, se seleccionó un tiempo de isquemia convencional de 55 minutos después de la titulación isquémica y se observó que 55 minutos proporcionaban una lesión consistente que también era reversible, con una baja mortalidad, menor del 5%. Tras la oclusión, se depositaron 0,4 ml de suero salino tibio (37°C) en la cavidad abdominal y se cerró el abdomen durante el periodo de isquemia. Tras retirar las pinzas de microaneurisma, se observaron los riñones hasta que cambiaron de color, una indicación de la recirculación de la sangre en los riñones. Se depositaron 0,4 ml

adicionales de suero salino tibio en la cavidad abdominal y se suturó la incisión, tras lo cual, se devolvió a los animales a sus jaulas. Se tomaron muestras de sangre de la cola a las 24 horas después de retirar las pinzas y a las 48 horas se sacrificó a los ratones y se recogió una muestra de sangre adicional.

Evaluación de la lesión renal: La función renal se evaluó a las 24 y 48 horas después de la reperfusión en seis ratones macho MASP-2(-/-) y seis TS (+/+). Se determinó la medida de creatinina en sangre mediante espectrometría de masas, lo que proporciona un índice reproducible de la función renal (sensibilidad <1,0 µmol/l). La **FIGURA 12** ilustra gráficamente la eliminación de nitrógeno de urea en sangre para los controles C57B1/6 de tipo silvestre y MASP-2 (-/-) a las 24 y 48 horas después de la reperfusión. Tal como se muestra en la **FIGURA 12,** los ratones MASP-2(-/-) mostraron una reducción significativa en la cantidad de urea en sangre a las 24 y 48 horas, en comparación con los ratones de control de tipo silvestre, lo que indica un efecto funcional protector frente al daño renal en el modelo de lesión por isquemia-reperfusión.

En general, se observó aumento de la urea en sangre en los ratones tanto TS (+/+) como MASP-2 (-/-) a las 24 y 48 horas después del procedimiento quirúrgico y la lesión isquémica. Se determinó por separado que los niveles de urea en sangre del animal de cirugía no isquémica TS (+/+) eran de 5,8 mmol/l. Además de los datos presentados en la **FIGURA 12,** un animal MASP-2 (-/-) mostró una protección prácticamente completa frente a la lesión isquémica, con valores de 6,8 y 9,6 mmol/l a las 24 y 48 horas, respectivamente. Este animal fue excluido del análisis de grupo como un potencial valor atípico, en donde puede no haber presencia de lesión isquémica. Por lo tanto, el análisis final mostrado en la **FIGURA 12** incluyó 5 ratones MASP-2(-/-) y 6 ratones TS (+/+) y se observó una reducción significativa en la urea en sangre a las 24 y 48 horas en los ratones MASP-2 (-/-) (p<0,05 en la prueba de la t de Student). Estos hallazgos indican que podría esperarse que la inhibición de la actividad de MASP-2 tenga un efecto protector o terapéutico frente al daño renal causado por una lesión isquémica.

Ejemplo 13

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

Antecedentes/Base lógica: La degeneración macular asociada a la edad (AMD) es la principal causa de ceguera una vez superada la edad de 55 años en el mundo industrializado. La AMD se produce en dos formas principales: AMD neovascular (húmeda) y AMD atrófica (seca). La forma neovascular (húmeda) supone un 90% de la pérdida visual grave asociada con la AMD, aunque solo un ~20% de los individuos con AMD desarrollan la forma húmeda. Los rasgos característicos de la AMD incluyen múltiples drusas, atrofia geográfica y neovascularización coroidal (NVC). En diciembre de 2004, la FDA aprobó Macugen (pegaptanib), una nueva clase de fármacos oftálmicos para actuar de manera selectiva y bloquear los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), para el tratamiento de la forma húmeda (neovascular) de la AMD (Ng et al., *Nat Rev. Drug Discov* 5:123-32 (2006)). Aunque Macugen representa una nueva opción terapéutica prometedora para un subgrupo de pacientes de AMD, sigue habiendo una gran necesidad de desarrollar tratamientos adicionales para esta compleja enfermedad. Múltiples líneas de investigación independientes han vinculado el papel central de la activación del complemento con la patogénesis de la AMD. La patogénesis de la neovascularización coroidal (NVC), la forma más grave de AMD, puede implicar la activación de las vías de complemento.

Hace más de veinticinco años, Ryan describió un modelo de NVC de lesión inducida por láser en animales (Ryan, S.J., *Tr. Am. Opth. Soc. LXXVII*:707-745, 1979). El modelo se desarrolló inicialmente usando monos Rhesus, sin embargo, desde entonces se ha usado la misma tecnología para desarrollar modelos similares de NVC en una serie de animales de investigación, incluyendo ratones (Tobe et al., *Am. J. Pathol. 153*:1641-46, 1998). En este modelo, se usa fotocoagulación por láser para romper la membrana de Bruch, un acto que da como resultado la formación de membranas similares a la NVC. El modelo inducido por láser agrupa muchas de las características importantes de la afección humana (para una revisión reciente, véase Ambati et al., *Survey Ophthalmology 48*:257-293, 2003). El modelo de ratón inducido por láser está bien establecido en la actualidad y se usa como base experimental en un gran número, en constante aumento, de proyectos de investigación. Se ha aceptado generalmente que el modelo inducido por láser comparte una similitud biológica suficiente con la NVC en seres humanos, de tal forma que los estudios preclínicos de la patogénesis y la inhibición farmacológica usando este modelo son relevantes para la NVC en seres humanos.

Métodos:

Se generó un ratón MASP-2-/- como se describe en el **ejemplo 1** y se retrocruzó durante 10 generaciones con C57B1/6. El presente estudio comparó los resultados cuando se evaluaron ratones macho MASP-2 (-/-) y MASP-2 (+/+) durante el transcurso de la NVC inducida por láser, un modelo acelerado de AMD neovascular que se centra en el volumen de la NVC inducida por láser mediante microscopía confocal de barrido láser como medida de la lesión tisular y la determinación de los niveles de VEGF, un potente factor angiogénico implicado en la NVC, en el epitelio pigmentario retiniano (EPR)/coroides mediante ELISA tras la lesión por el láser.

Inducción de neovascularización coroidal (NVC): Se llevó a cabo la fotocoagulación láser (532 nm, 200 mW, 100 ms, 75µm; Oculight GL, Iridex, Mountain View, CA) en ambos ojos de cada animal en el día cero mediante una asignación individual con enmascaramiento al grupo de fármaco. Se aplicaron puntos de laser de una manera

estandarizada alrededor del nervio óptico, usando un sistema de administración de lámpara de ranura y un cubreobjetos, como una lente de contacto. El criterio de valoración morfológico de la lesión láser fue la aparición de una burbuja de cavitación, un signo que se cree que está correlacionado con la rotura de la membrana de Bruch. Los métodos y criterios de valoración detallados que se evaluaron son los siguientes.

Angiografía de fluoresceína: Se llevó a cabo una angiografía de fluoresceína con una cámara y un sistema de obtención de imágenes (cámara TRC 50 1A; sistema ImageNet 2.01; Topcon, Paramus, NJ) 1 semana después de la fotocoagulación láser. Las fotografías se capturaron con una lente 20-D en contacto con la lente del fondo de la cámara después de la inyección intraperitoneal de 0,1 ml de fluoresceína sódica al 2,5%. Un experto en retinas no implicado en la fotocoagulación láser o la angiopatía evaluó los angiogramas de fluoresceína de una vez con enmascaramiento.

Volumen de neovascularización coroidal (NVC): Una semana después de la lesión por láser, se desnuclearon los ojos y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min a 4°C. Se obtuvieron copas oculares retirando los segmentos anteriores y se lavaron tres veces en PBS, seguido de deshidratación y rehidratación a lo largo de una serie de metanol. Después de bloquear dos veces con tampón (PBS que contenía seroalbúmina bovina al 1% y Triton X-100 al 0,5%) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se incubaron las copas oculares durante una noche a 4°C con FITC-isolectina B4 al 0,5% (Vector Laboratories, Burlingame, CA), diluido con PBS que contenía BSA al 0,2% y Triton X-100 al 0,1%, que se une a los restos terminales de β-D-galactosa en la superficie de células endoteliales y marca de manera selectiva la vasculatura murina. Después de dos lavados con PBS que contenía Triton X-100 al 0,1%, se desprendió cuidadosamente la retina neurosensorial y se cortó del nervio óptico. Se practicaron cuatro incisiones radiales relajantes y se montó en plano el resto del complejo EPR-coroides-esclerótica en medio anti-desvanecimiento (Medio de montaje Immu-Mount Vectashield; Vector Laboratories) y se cubrió con un portaobjetos.

Los montajes planos se examinaron con un microscopio confocal de barrido láser (TCS SP; Feica, Heidelberg, Alemania). Los vasos se visualizaron por excitación con longitud de onda de argón azul (488 nm) y capturando la emisión entre 515 y 545 nm. Se usó un objetivo de inmersión en aceite de 40X para todos los estudios de obtención de imágenes. Se obtuvieron secciones ópticas horizontales (paso de 1 µm) de la superficie del complejo EPR-coroides-esclerótica. Se consideró que el plano focal más profundo en el que pudo identificarse la red vascular coroidal circundante que se conecta con la lesión era la base de la lesión. Cualquier vaso en el área diana del láser y superficial respecto de este plano de referencia se consideró como NVC. Las imágenes de cada sección se almacenaron en formato digital. El área de fluorescencia relacionada con la NVC se midió mediante análisis de imagen computarizado con el programa informático del microscopio (TCS SP; Feica). Se usó el sumatorio del área de fluorescencia total en cada sección horizontal como índice del volumen de la NVC. La obtención de imágenes fue llevada a cabo por un operario enmascarado respecto de la asignación al grupo de tratamiento.

Debido a que la probabilidad de que cada lesión por láser desarrolle NVC se ve influenciada por el grupo al que pertenece (ratón, ojo y punto láser), se compararon los volúmenes medios de lesión usando un modelo mixto lineal con un diseño de medidas repetidas de cuadrícula dividida. El factor de cuadrícula completo fue el grupo genético al que pertenece el animal, mientras que el factor de cuadrícula dividida fue el ojo. La significación estadística se determinó al nivel de 0,05. Se llevaron a cabo comparaciones *post hoc* de las medias con un ajuste de Bonferroni para comparaciones múltiples.

ELISA de VEGF. A los tres días después de la lesión mediante 12 puntos láser, se sometió al complejo EPR-coroides a ultrasonidos en tampón de lisis (imidazol HCl 20 mM, KCl 10 mM, $MgCL_2$ 1 mM, EGTA 10 mM, Triton X-100 al 1%, NaF 10 mM, molibdato de Na 1 mM y EDTA 1 mM con inhibidor de proteasa) sobre hielo durante 15 min. Se determinaron los niveles de proteína VEGF en el sobrenadante mediante un kit de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) que reconoce todas las variantes de corte y empalme, a de 450 a 570 nm (Emax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y se normalizaron respecto de la proteína total. Se llevaron a cabo mediciones por duplicado con enmascaramiento por un operario no implicado en la fotocoagulación, la obtención de imágenes o la angiografía. Los números de VEGF se representaron como la media +/- EEM de al menos tres experimentos independientes y se compararon usando la prueba de la U de Mann-Whitney. La hipótesis nula se rechazó a valores de $P<0,05$.

RESULTADOS:

Evaluación de los niveles de VEGF:

La **FIGURA 13A** ilustra gráficamente los niveles de proteína VEGF en el complejo EPR-coroides aislado de ratones C57B16 de tipo silvestre y MASP-2(-/-) en el día cero. Tal como se muestra en la **FIGURA 13A,** la evaluación de los niveles de VEGF indica una reducción en los niveles basales para VEGF en los ratones MASP-2 (-/-) frente a los ratones de control de tipo silvestre C57bl. La **FIGURA 13B** ilustra gráficamente los niveles de proteína VEGF medidos en el día tres después de la lesión inducida por láser. Tal como se muestra en la **FIGURA 13B,** los niveles de VEGF aumentaron significativamente en los ratones de tipo silvestre (+/+) tres días después de la lesión inducida por láser, lo que es coherente con los estudios publicados (Nozaki et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:2328-33 (2006)). Sin embargo, se observaron niveles sorprendentemente muy bajos de VEGF en los ratones MASP-2 (-/-).

Evaluación de la neovascularización coroidal (NVC):

Además de la reducción de los niveles de VEGF después de la degeneración macular inducida por láser, se determinó el área de NVC antes y después de la lesión por láser. La **FIGURA 14** ilustra gráficamente el volumen de NVC medido en ratones de tipo silvestre C57bl y MASP-2(-/-) en el día siete después de la lesión inducida por láser. Tal como se muestra en la **FIGURA 14,** los ratones MASP-2 (-/-) mostraron una reducción de aproximadamente el 30% en el área de NVC después del daño inducido por láser en el día siete en comparación con los ratones de control de tipo silvestre.

Estos hallazgos indican una reducción en el VEGF y la NVC observada en los ratones MASP (-/-) frente a los de control de tipo silvestre (+/+) y que el bloqueo de MASP-2 con un inhibidor podría tener un efecto terapéutico preventivo en el tratamiento de la degeneración macular.

Ejemplo 14

Este ejemplo demuestra que puede producirse activación de trombina después de la activación de la vía de lectina en condiciones fisiológicas y demuestra el alcance de la implicación de MASP-2. En suero de rata normal, la activación de la vía de lectina ocasiona la activación de la trombina (evaluada como deposición de trombina) concurrente con la activación del complemento (evaluada como deposición de C4). Como puede observarse en las **FIGURAS 15A** y **15B,** la activación de trombina se inhibe en este sistema mediante un anticuerpo bloqueante de MASP-2 (formato Fab2) que muestra una curva de inhibición de respuesta a la concentración **(FIGURA 15B)** que discurre en paralelo con la de activación del complemento **(FIGURA 15A).** Estos datos sugieren que la activación de la vía de lectina, del modo que se produce en un traumatismo, ocasionará la activación de los sistemas tanto de complemento como de coagulación en un proceso que depende enteramente de MASP-2. Por inferencia, los anticuerpos bloqueantes de MASP2 podrían ser eficaces para mitigar casos de un exceso de coagulación sistémica, por ejemplo, coagulación intravascular diseminada, que es uno de los rasgos característicos que ocasionan mortalidad en los casos de traumatismo mayor.

Ejemplo 15

Este ejemplo proporciona resultados generados usando un modelo de reacción de Schwartzman localizado de coagulación intravascular diseminada ("CID") en ratones deficientes MASP-2 -/- y suficientes MASP-2 +/+ para evaluar el papel de la vía de lectina en la CID.

Antecedentes/Base lógica:

Como se ha descrito anteriormente, el bloqueo de MASP-2 inhibe la activación de la vía de lectina y reduce la generación de las dos anafilotoxinas, C3a y C5a. Puede demostrarse que las anafilotoxinas C3a *in vitro* son potentes agregadores de plaquetas, pero su implicación *in vivo* está menos bien definida y la liberación de sustancias plaquetarias y plasmina en la curación de heridas puede implicar únicamente de manera secundaria al complemento C3. En este ejemplo, se analizó el papel de la vía de lectina en ratones MASP-2 (-/-) y TS (+/+) para evaluar si es necesaria una elevación prolongada de la activación de C3 para generar coagulación intravascular diseminada.

Métodos:

Los ratones MASP-2(-/-) usados en este estudio se generaron como se describe en el **ejemplo 1** y se retrocruzaron durante al menos 10 generaciones con C57B1/6.

En este experimento se usó el modelo de reacción de Schwartzman localizada. La reacción de Schwartzman localizada (LSR) es una respuesta inducida por lipopolisacárido (LPS) con contribuciones bien caracterizadas de elementos celulares y humorales del sistema inmunitario innato. Está bien establecida la dependencia de la LSR respecto del complemento (Polak, L., et al., *Nature 223*:738-739 (1969); Fong J.S. et al., *J Exp Med 134*:642-655 (1971)). En el modelo de LSR, se cebó a los ratones durante 4 horas con TNL alfa (500 ng, intraescrotal), después se anestesió a los ratones y se los preparó para la microscopía intravital del músculo cremáster. Se seleccionaron redes de vénulas pos-capilares (15-60 µm de diámetro) con buen flujo sanguíneo (1-4 mm/s) para su observación. Se trató a los animales con anticuerpos fluorescentes para marcar de manera selectiva los neutrófilos o las plaquetas. La red de vasos se escaneó secuencialmente y se tomaron imágenes digitales de todos los vasos del análisis posterior. Tras registrar el estado basal de la microcirculación, los ratones recibieron una sola inyección intravenosa de LPS (100 µg) solo o con los agentes listados a continuación. Después, se escaneó la misma red de vasos cada 10 minutos durante 1 hora. Se identificó la acumulación específica de fluoróforos restando la fluorescencia de fondo y se mejoró umbralizando la imagen. La magnitud de las reacciones se midió a partir de las imágenes almacenadas. La medida principal de las reacciones de Schwartzman fue los datos agregados.

Los estudios compararon a los ratones suficientes MASP-2 +/+ o de tipo silvestre expuestos a un agente agotador de una vía de complemento conocida, factor de veneno de cobra (CVF) o un inhibidor terminal de la vía (antagonista de C5aR). Los resultados **(FIGURA 16A)** demuestran que el CVF, así como un antagonista de C5aR previnieron la aparición de agregados en la vasculatura. Además, los ratones deficientes MASP-2 -/- **(FIGURA 16B)** también mostraron una inhibición completa de la reacción de Schwartzman localizada, lo que apoya la implicación de la vía

de lectina. Estos resultados demuestran claramente el papel de MASP-2 en la generación de CID y apoyan el uso de inhibidores de MASP-2 para el tratamiento y prevención de la CID.

Ejemplo 16

Este ejemplo describe el análisis de ratones MASP-2 (-/-) en un modelo de trasplante renal murino.

Antecedentes/Base lógica:

Se evaluó el papel de MASP-2 en el resultado funcional del trasplante de riñón en un modelo de ratón.

Métodos:

Se evaluó el resultado funcional del trasplante de riñón usando un isoinjerto de riñón individual en ratones receptores no sometidos a nefrectomía, con seis receptores de trasplante TS (+/+) (B6) y seis receptores de trasplante MASP-2 (-/-). Para evaluar la función del riñón trasplantado, se retiró el riñón nativo del receptor 5 días después del trasplante y se evaluó la función renal 24 horas después midiendo los niveles de nitrógeno de urea en sangre (BUN).

Resultados:

La **FIGURA 17** ilustra gráficamente los niveles de nitrógeno de urea en sangre (BUN) del riñón 6 días después del trasplante de riñón en los receptores TS (+/+) y los receptores MASP-2 (-/-). Tal como se muestra en la **FIGURA 17,** se observaron niveles de BUN fuertemente elevados en los receptores de trasplante TS (+/+) (B6) (los niveles normales de BUN en ratones son < 5 mM), que indican fallo renal. En cambio, los ratones MASP-2 (-/-) receptores de isoinjerto mostraron niveles de BUN sustancialmente mejores, lo que sugiere una función renal mejorada. Cabe destacar que estos resultados se obtuvieron usando injertos de donantes de riñón TS (+/+), lo que sugiere que la ausencia de una vía de lectina funcional solo en el receptor del trasplante es suficiente para lograr un beneficio terapéutico.

En conjunto, estos resultados indican que la inhibición transitoria de la vía de lectina mediante la inhibición de MASP-2 proporciona un método para reducir la morbilidad y la función retrasada del injerto en el trasplante renal y que es probable que esta estrategia sea útil en otras situaciones de trasplantes.

Ejemplo 17

Este ejemplo demuestra que los ratones MASP-2 (-/-) son resistentes al choque séptico en un modelo de peritonitis septicémica polimicrobiana de ratón.

Antecedentes/Base lógica:

Para evaluar los potenciales efectos de MASP-2 (-/-) en infecciones, se evaluó el modelo de ligadura y punción cecal (LPC), un modelo de peritonitis septicémica polimicrobiana. Se cree que este modelo imita con más precisión el trascurso de la peritonitis septicémica humana. El modelo de ligadura y punción cecal (LPC) es un modelo en el que se liga el ciego y se perfora mediante una aguja, lo que ocasiona una filtración constante de bacterias en la cavidad abdominal, que alcanzan la sangre por el drenaje linfático y después se distribuyen por todos los órganos abdominales, lo que ocasiona fallo multiorgánico y choque séptico (Eskandari et al., *J Immunol 148*(9):2724-2730 (1992)). El modelo de LPC imita el transcurso de la septicemia observada en pacientes e induce una respuesta hiperinflamatoria temprana seguida de una fase pronunciada hipoinflamatoria. Durante esta fase, los animales son altamente sensibles a la exposición a bacterias (Wichterman et al., *J. Surg. Res. 29*(2):189-201 (1980)).

Métodos:

Se midió la mortalidad de la infección polimicrobiana usando el modelo de ligadura y punción cecal (LPC) en ratones TS (+/+) (n=18) y MASP-2 (-/-) (n=16). Descrito de manera breve, se anestesió a ratones deficientes para MASP-2 y a compañeros de camada de tipo silvestre y se exteriorizó y ligó el ciego un 30% por encima del extremo distal. Después de esto, se perforó el ciego una vez con una aguja de 0,4 mm de diámetro. Después, volvió a colocarse el ciego en la cavidad abdominal y se cerró la piel con pinzas. Se monitorizó la supervivencia de los ratones sometidos a LPC a lo largo de un periodo de 14 días después de la LPC. Se recogió un lavado peritoneal en los ratones 16 horas después de la LPC para medir la carga bacteriana. Se prepararon diluciones seriadas del lavado peritoneal en PBS y se inocularon en placas de Mueller Hinton con incubación posterior a 37°C en condiciones anaerobias durante 24 horas, tras lo cual se determinó la carga bacteriana.

También se midió la respuesta de la citocina TNF-alfa a la infección bacteriana en los ratones TS (+/+) y MASP-2 (-/-) 16 horas después de la LPC en pulmones y bazo mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). También se cuantificó el nivel sérico de TNL-alfa 16 horas de la LPC en os ratones TS (+/+) y MASP-2 (-/-) mediante ELISA sándwich.

Resultados:

La **FIGURA 18** ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de los animales tratados con LPC en función de los días después del procedimiento de LPC. Tal como se muestra en la **FIGURA 18,** la deficiencia de la vía de lectina en los ratones MASP-2 (-/-) no aumenta la mortalidad de los ratones después de la infección polimicrobiana usado el modelo de ligadura y punción cecal en comparación con los ratones TS (+/+). Sin embargo, como se muestra en la **FIGURA 19,** los ratones MASP-2 (-/-) mostraron una carga bacteriana significativamente mayor (un aumento de aproximadamente 1000 veces en el número de bacterias) en el lavado peritoneal después de la LPC en comparación con sus compañeros de camada TS (+/+). Estos resultados indican que los ratones deficientes MASP-2 (-/-) son resistentes al choque séptico. La eliminación bacteriana reducida en los ratones deficientes para MASP-2 en este modelo puede deberse a un deterioro de la fagocitosis mediada por C3b, ya que se demostró que la deposición de C3 es dependiente de MASP-2.

Se determinó que la respuesta de la citocina TNF-alfa frente a la infección bacteriana no se elevó en los ratones MASP-2 (-/-) en comparación con los controles TS (+/+) (datos no mostrados). También se determinó que había una concentración sérica de TNF-alfa significativamente mayor en ratones TS (+/+) 16 horas después de la LPC que contrasta con la de los ratones MASP-2 (-/-), donde el nivel sérico de TNF-alfa se mantuvo prácticamente sin alteraciones. Estos resultados sugieren que la intensa respuesta inflamatoria a la afección séptica se moduló en los ratones MASP-2 (-/-) y permitió que los animales sobreviviesen en presencia de mayores recuentos bacterianos.

En conjunto, estos resultados demuestran los potenciales efectos perjudiciales de la activación del complemento de la vía de lectina en el caso de la septicemia y el aumento de la mortalidad en pacientes con septicemia fulminante. Estos resultados demuestran además que la deficiencia de MASP-2 modula la respuesta inmunitaria inflamatoria y reduce los niveles de expresión de mediadores inflamatorios durante la septicemia. Por lo tanto, se cree que la inhibición de MASP-2 (-/-) mediante la administración de anticuerpos monoclonales contra MASP-2 podría ser eficaz para reducir la respuesta inflamatoria en un sujeto que padece choque séptico.

Ejemplo 18

Este ejemplo describe el análisis de ratones MASP-2 (-/-) en un modelo de infectividad intranasal murino.

Antecedentes/Base lógica:

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno bacteriano humano oportunista gramnegativo que provoca una gran variedad de infecciones, en particular en individuos inmunocomprometidos. Es una importante fuente de infecciones nosocomiales adquiridas, en particular, neumonía adquirida en hospitales. También es responsable de una morbilidad y mortalidad significativa en pacientes con fibrosis quística (FQ). La infección pulmonar por *P. aeruginosa* se caracteriza por un fuerte reclutamiento de neutrófilos y una inflamación pulmonar significativa que da como resultado un daño tisular extenso (Palanki M.S. et al., *J. Med. Chem 51*:1546-1559 (2008)).

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

Métodos:

Se expuso a veintidós ratones TS (+/+), veintidós ratones MASP-2 (-/-) y once ratones C3 (-/-) a la administración intranasal de una cepa bacteriana de *P. aeruginosa*. Se monitorizó a los ratones durante seis días después de la infección y se construyeron gráficas de Kaplan-Mayer que muestran el porcentaje de supervivencia.

Resultados:

La **FIGURA 20** es una gráfica de Kaplan-Mayer del porcentaje de supervivencia de ratones TS (+/+), MASP-2 (-/-) o C3 (-/-) seis días después de la infección. Tal como se muestra en la **FIGURA 20,** no se observaron diferencias en los ratones MASP-2 (-/-) frente a los ratones TS (+/+). Sin embargo, la eliminación de la vía clásica (C1q) en los ratones C3 (-/-) dio como resultado una fuerte susceptibilidad a la infección bacteriana. Estos resultado demuestran que la inhibición de MASP-2 no aumenta la susceptibilidad a la infección bacteriana, indicando que es posible reducir complicaciones inflamatorias no deseadas en pacientes con traumatismos inhibiendo a MASP-2 sin comprometer la capacidad del paciente para combatir infecciones usando la vía clásica de complemento.

Ejemplo 19

Este ejemplo describe el análisis farmacodinámico de anticuerpos Fab2 anti-MASP-2 de alta afinidad representativos que se identificaron como se describe en el **ejemplo 10.**

Antecedentes/Base lógica:

Como se describe en el **ejemplo 10,** para identificar anticuerpos de alta afinidad que bloquean la vía de lectina de rata, se utilizó proteína MASP-2 de rata para obtener una vista de conjunto de una biblioteca de presentación en fagos. Esta biblioteca se diseñó para proporcionar alta diversidad inmunológica y se construyó usando secuencias génicas de inmunoglobulina completamente humanas. Como se describe en el **ejemplo 10,** se identificaron aproximadamente 250 clones de fago individuales que se unían con alta afinidad a la proteína MASP-2 de rata

mediante selección ELISA. La secuenciación de estos clones identificó 50 fagos únicos que codificaban anticuerpos contra MASP-2. La proteína Fab2 se expresó a partir de estos clones, se purificó y se analizó respecto de su afinidad de unión a MASP-2 y su inhibición funcional de la vía de complemento de la lectina.

Tal como se muestra en la **TABLA 6** del **ejemplo 10,** se identificaron 17 Fab2 anti-MASP-2 con actividad de bloqueo funcional como resultado de este análisis (una tasa de acierto del 34% para anticuerpos bloqueantes). La inhibición funcional de la vía de complemento de la lectina mediante Fab2 fue evidente a nivel de deposición de C4, que es una medida directa de la escisión de C4 por MASP-2. De manera importante, también fue igualmente evidente la inhibición cuando se evaluó la actividad de C3 convertasa, demostrando un bloqueo funcional de la vía de complemento de la lectina. Los 17 Fab2 bloqueantes de MASP-2 identificados como se describe en el **ejemplo 10** inhiben potentemente la formación de C3 convertasa, con valores de CI_{50} iguales que o menores de 10 nM. Ocho de los 17 Fab2 identificados tienen valores de CI_{50} en el intervalo subnanomolar. Además, los 17 Fab2 bloqueantes de MASP-2 proporcionaron una inhibición esencialmente completa de la formación de C3 convertasa en el ensayo de C3 convertasa de la vía de lectina, como se muestra en las FIGURAS 8A-C y se resume en la TABLA 6 del ejemplo 10. Además, cada uno de los 17 Fab2 anti-MASP-2 bloqueantes mostrados en la TABLA 6 inhiben potentemente la generación de C3b (>95%), demostrando de este modo la especificidad de este ensayo para la C3 convertasa de la vía de lectina.

Las variantes de isotipo de longitud completa de IgG2c de rata e IgG2a de ratón procedieron del Fab2 n.º 11. Este ejemplo describe la caracterización de los parámetros farmacocinéticos *in vivo* de estos isotipos.

Métodos:

Como se describe en el ejemplo 10, se utilizó proteína MASP-2 de rata para obtener una vista de conjunto de una biblioteca de presentación en fagos de Fab, a partir de la cual se identificó el Fab2 n.º 11. Las variantes de isotipo de longitud completa de IgG2c de rata e IgG2a de ratón procedieron del Fab2 n.º 11. Se caracterizaron in vivo los parámetros farmacodinámicos de los isotipos de anticuerpo de longitud completa tanto de IgG2c de rata como de IgG2a de ratón del siguiente modo.

Estudio in vivo en ratones:

Se llevó a cabo un estudio farmacodinámico en ratones para investigar el efecto de la dosificación de anticuerpo anti-MASP-2 en la actividad de la vía de lectina en plasma *in vivo*. En este estudio, se midió la deposición de C4 *ex vivo* en un ensayo de vía de lectina en varios puntos de tiempo después de la administración subcutánea (sc) e intraperitoneal (ip) de 0,3 mg/kg o 1,0 mg/kg del MoAb de ratón anti-MASP-2 (isotipo de anticuerpo de longitud completa IgG2a de ratón procedente del Fab2 n.º 11).

La **FIGURA 21** ilustra gráficamente la deposición de C4b específica de la vía de lectina, medida *ex vivo* en muestras de suero no diluidas tomadas de ratones (n=3 ratones/grupo) en diversos puntos de tiempo después de la dosificación subcutánea de 0,3 mg/kg o 1,0 mg/kg del MoAb anti-MASP-2 de ratón. Las muestras de suero de ratones recogidas antes de la dosificación de anticuerpo sirvieron como controles negativos (100% de actividad), mientras que el suero complementado *in vitro* con 100 nM del mismo anticuerpo anti-MASP-2 de bloqueo se usó como control positivo (0% de actividad).

Los resultados mostrados en la **FIGURA 21** demuestran una inhibición rápida y completa de la deposición de C4b después de la administración subcutánea de una dosis de 1,0 mg/kg de MoAb anti-MASP-2 de ratón. Se observó una inhibición parcial de la deposición de C4b después de la administración subcutánea de una dosis de 0,3 mg/kg de MoAb anti-MASP-2 de ratón.

Se efectuó un seguimiento del transcurso de tiempo hasta la recuperación de la vía de lectina durante tres semanas después de una sola administración de MoAb anti-MASP-2 de ratón a razón de 0,6 mg/kg en ratones. Tal como se muestra en la **FIGURA 22,** se produjo una caída precipitada en la actividad de la vía de lectina después de la dosificación del anticuerpo, seguida de una inhibición completa de la vía de lectina que duró aproximadamente 7 días después de la administración ip. Se observó una lenta restauración de la vía de lectina a lo largo de las semanas segunda y tercera, con una restauración completa de la vía de lectina en los ratones a los 17 días después de la administración del MoAb anti-MASP-2.

Estos resultados demuestran que el MoAb anti-MASP-2 de ratón procedente del Fab2 n.º 11 inhibe la vía de lectina de ratones de una manera dependiente de la dosis cuando se administra por vía sistémica.

Ejemplo 20

Este ejemplo describe el análisis de la eficacia del MoAb anti-MASP-2 de ratón procedente del Fab2 n.º 11 en un modelo de ratón de degeneración macular asociada a la edad.

Antecedentes/Base lógica:

Como se describe en el **ejemplo 10,** se utilizó proteína MASP-2 de rata para obtener una vista de conjunto de una

biblioteca de presentación en fagos de Fab, a partir de la cual se identificó el Fab2 n.º 11 como anticuerpo funcionalmente activo. Se generaron anticuerpos de longitud completa de los isotipos IgG2c de rata e IgG2a de ratón a partir del Fab2 n.º 11. Se caracterizaron los parámetros farmacodinámicos del anticuerpo anti-MASP-2 de longitud completa del isotipo IgG2a de ratón como se describe en el **ejemplo 19.** En este ejemplo, se analizó el anticuerpo anti-MASP-2 de longitud completa de ratón procedente del Fab2 n.º 11 en el modelo de ratón de degeneración macular asociada a la edad (AMD), descrito por Bora P.S. et al, *J Immunol 174*:491-497 (2005).

Métodos:

El isotipo IgG2a de ratón del anticuerpo anti-MASP-2 de longitud completa derivado del Fab2 n.º 11 como se describe en el **ejemplo 19,** se probó en el modelo de ratón de degeneración macular asociada a la edad (AMD) como se describe en el **ejemplo 13** con las siguientes modificaciones.

Administración de MoAb anti-MASP-2 de ratón

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

Inducción de neovascularización coroidal (NVC)

La inducción de neovascularización coroidal (NVC) y la medición del volumen de NVC se llevó a cabo usando fotocoagulación láser, como se describe en el ejemplo 13.

Resultados:

La **FIGURA 23** ilustra gráficamente el área de NVC medida a los 7 días después de la lesión por láser en ratones tratados con MoAb de control de isotipo o MoAb anti-MASP-2 de ratón (0,3 mg/kg y 1,0 mg/kg). Tal como se muestra en la **FIGURA 23,** en los ratones tratados con 1,0 mg/kg de MoAb anti-MASP-2, se observó una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,01$) de aproximadamente el 50% en la NVC siete días después del tratamiento con láser. Tal como se muestra adicionalmente en la **FIGURA 23,** se observó que una dosis de 0,3 mg/kg de MoAb anti-MASP-2 no era eficaz para reducir la NVC. Cabe destacar que se mostró que la dosis de 0,3 mg/kg de MoAb anti-MASP-2 tiene una inhibición parcial y transitoria de la deposición de C4b después de la administración subcutánea, como se describe en el **ejemplo 19** y se muestra en la **FIGURA 21.**

Los resultados descritos en este ejemplo demuestran que el bloqueo de MASP-2 con un inhibidor, tal como MoAb anti-MASP-2, tiene un efecto preventivo y/o terapéutico en el tratamiento de la degeneración macular. Cabe destacar que estos resultados son coherentes con los resultados obtenidos en el estudio llevado a cabo en los ratones MASP-2 (-/-), descrito en el **ejemplo 13,** en el que se observó una reducción del 30% en la NVC 7 días después del tratamiento con láser en ratones MASP-2 (-/-) en comparación con los ratones de control de tipo silvestre. Además, los resultados en este ejemplo demuestran además que el anticuerpo anti-MASP-2 suministrado por vía sistémica proporciona un beneficio terapéutico local en el ojo, resaltando de este modo el potencial para una vía de administración sistémica para tratar a pacientes con AMD. En resumen, estos resultados proporcionan indicios que respaldan el uso de MoAb para MASP-2 en el tratamiento de la AMD.

Ejemplo 21

Este ejemplo demuestra que los ratones deficientes para MASP-2 están protegidos frente a la mortalidad inducida por *Neisseria meningitidis* tras la infección por *N. meningitidis* y tienen una eliminación mejorada de la bacteriemia en comparación con los ratones de control de tipo silvestre.

Base lógica: La *Neisseria meningitidis* es una bacteria diplocócica gramnegativa heterótrofa conocida por su papel en la meningitis y otras formas de enfermedad meningocócica, tal como la meningococemia. La *N. meningitidis* es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad durante la infancia. Las complicaciones graves incluyen septicemia, síndrome de Waterhouse-Friderichsen, insuficiencia suprarrenal y coagulación intravascular diseminada (CID). Véase, por ejemplo, Rintala E. et al., *Critical Care Medicine 28*(7):2373-2378 (2000). En este ejemplo, se analizó el papel de la vía de lectina en ratones MASP-2 (-/-) y TS (+/+) para evaluar si los ratones deficientes para MASP-2 serían susceptibles a la mortalidad inducida por *N. meningitidis*.

Métodos:

Se generaron ratones con supresión génica de MASP-2 como se describe en el **ejemplo 1** y se retrocruzaron durante al menos 10 generaciones con C57B1/6. Se inoculó a ratones MASP-2 KO (n=10) y C57/B6 de tipo silvestre (n=10) de 10 semanas de edad por inyección intravenosa con una dosis de $5x10^8$ ufc/100 µl, $2x10^8$ ufc/100 µl o $3x10^7$ ufc/100 µl de *Neisseria meningitidis* serogrupo A Z2491 en 400 mg/kg de hierro-dextrano. Se monitorizó la supervivencia de los ratones después de la infección a lo largo de un periodo de 72 horas. Se tomaron muestras de sangre de los ratones a intervalos de una hora después de la infección y se analizaron para determinar el nivel sérico (log ufc/ml) de *N. meningitidis* para verificar la infección y determinar la velocidad de eliminación de la bacteria

del suero.

Resultados:

La **FIGURA 24A** ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones MASP-2 KO y TS después de la administración de una dosis eficaz de $5x10^8$ ufc/100 µl de *N. meningitidis.* Tal como se muestra en la **FIGURA 24A,** después de la infección con la dosis más alta de $5x10^8$ ufc/100 µl de *N. meningitidis,* un 100% de los ratones MASP-2 KO sobrevivió a lo largo del periodo de 72 horas después de la infección. En cambio, solo un 20% de los ratones TS seguía vivo 24 horas después de la infección. Estos resultados demuestran que los ratones deficientes para MASP-2 están protegidos frente a la mortalidad inducida por *N. meningitidis*.

La **FIGURA 24B** ilustra gráficamente el log ufc/ml de *N. meningitidis* recuperadas en diferentes puntos de tiempo en muestras de sangre tomadas de ratones MASP-2 KO y TS infectados con $5x10^8$ ufc/100 µl de *N. meningitidis*. Tal como se muestra en la **FIGURA 24B,** en los ratones TS, el nivel de *N. meningitidis* en sangre alcanzó un pico de aproximadamente 6,5 log ufc/ml a las 24 horas después de la infección y se redujo hasta cero 48 horas después de la infección. En cambio, en los ratones MASP-2 KO, el nivel de *N. meningitidis* alcanzó un pico de aproximadamente 3,5 log ufc/ml a las 6 horas después de la infección y se redujo hasta cero 36 horas después de la infección.

La **FIGURA 25A** ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones MASP-2 KO y TS después de la infección con $2x10^8$ ufc/100 µl de *N. meningitidis*. Tal como se muestra en la **FIGURA 25A,** después de la infección con la dosis de $2x10^8$ ufc/100 µl de *N. meningitidis,* un 100% de los ratones MASP-2 KO sobrevivió a lo largo del periodo de 72 horas después de la infección. En cambio, solo un 80% de los ratones TS seguía vivo 24 horas después de la infección. De manera coherente con los resultados mostrados en la **FIGURA 24A,** estos resultados demuestran además que los ratones deficientes para MASP-2 están protegidos frente a la mortalidad inducida por *N. meningitidis*.

La **FIGURA 25B** ilustra gráficamente el log ufc/ml de *N. meningitidis* recuperadas en diferentes puntos de tiempo en muestras de sangre tomadas de ratones TS infectados con $2x10^8$ ufc/100 µl de *N. meningitidis*. Tal como se muestra en la **FIGURA 25B,** el nivel de *N. meningitidis* en sangre de ratones TS infectados con $2x10^8$ ufc alcanzó un pico de aproximadamente 4 log ufc/ml a las 12 horas después de la infección y se redujo hasta cero 24 horas después de la infección. La **FIGURA 25C** ilustra gráficamente el log ufc/ml de *N. meningitidis* recuperadas en diferentes puntos de tiempo en muestras de sangre tomadas de ratones MASP-2 KO infectados con $2x10^8$ ufc/100 µl de *N. meningitidis*. Tal como se muestra en la **FIGURA 25C,** el nivel de *N. meningitidis* en sangre de ratones MASP-2 KO infectados con $2x10^8$ ufc alcanzó un nivel de pico de aproximadamente 3,5 log ufc/ml a las 2 horas después de la infección y se redujo hasta cero a las 3 horas después de la infección. De manera coherente con los resultados mostrados en la **FIGURA 24B,** estos resultados demuestran que aunque se infectó a los ratones MASP-2 KO con la misma dosis de *N. meningitidis* que a los ratones TS, los ratones MASP-2 KO tenían una mejor eliminación de la bacteriemia en comparación con los TS.

El porcentaje de supervivencia de los ratones MASP-2 KO y TS después de la infección con la dosis mínima de $3x10^7$ ufc/100 µl de *N. meningitidis* fue del 100% transcurrido el periodo de tiempo de 72 horas (datos no mostrados).

Análisis

Estos resultados demuestran que los ratones deficientes para MASP-2 se encuentran protegidos frente a la mortalidad inducida por *N. meningitidis* y tienen una mejor eliminación de la bacteriemia en comparación con los ratones TS. Por lo tanto, en vista de estos resultados, se espera que la aplicación terapéutica de inhibidores de MASP-2, tales como el MoAb anti-MASP-2, podría ser eficaz para tratar, prevenir o mitigar los efectos de la infección por bacterias de *N. meningitidis* (es decir, septicemia y CID). Además, estos resultados indican que la aplicación terapéutica de inhibidores de MASP-2, tales como el MoAb anti-MASP-2, podrían no predisponer al sujeto a un mayor riesgo de contraer infecciones por *N. meningitidis*.

Ejemplo 22

Este ejemplo describe el descubrimiento de una nueva activación de C3 de complemento que esquiva C4 dependiente de MASP-2 y mediada por la vía de lectina.

Base lógica:

El principal beneficio terapéutico del uso de inhibidores de la activación del complemento para limitar la lesión por isquemia/reperfusión miocárdica (MIRI) se demostró de manera convincente en un modelo experimental de rata de infarto de miocardio hace dos décadas: sCR1 recombinante, un derivado truncado soluble del receptor de complemento de tipo-1 (CR1) de la superficie celular, se administró por vía intravenosa y su efecto se evaluó en un modelo *in vivo* de rata de MIRI. El tratamiento con sCR1 redujo el volumen del infarto en más de un 40% (Weisman, H.F., et al., *Science 249*:146-151 (1990)). El potencial terapéutico de este inhibidor recombinante se demostró posteriormente en un ensayo clínico que demostró que la administración de sCR1 en pacientes con IM previno la insuficiencia contráctil en corazón posisquémico (Shandelya, S., et al., Circulation 87:536-546 (1993)). El principal mecanismo que da lugar a la activación del complemento en el tejido isquémico, sin embargo, aún no se ha definido

por completo, principalmente debido a la falta de modelos experimentales adecuados, el conocimiento limitado de los procesos moleculares que dan lugar a la activación del complemento de las células privadas de oxígeno y de la señalización cruzada y las sinergias entre las diferentes vías de activación del complemento.

Como componente fundamental de la respuesta inmunitaria, el sistema de complemento proporciona protección frente a los microorganismos invasores mediante mecanismos dependientes e independientes de anticuerpos. Este orquesta muchas interacciones celulares y humorales dentro de la respuesta inmunitaria, incluyendo la quimiotaxia, la fagocitosis, la adhesión celular y la diferenciación de linfocitos B. La cascada de complemento se inicia por tres vías diferentes: la vía clásica, la vía alternativa y la vía de lectina. El subcomponente de reconocimiento C1q de la vía clásica se une a una serie de dianas - de manera notable, inmunocomplejos - para iniciar la activación escalonada de las serina proteasas asociadas, C1r y C1s, proporcionando un mecanismo importante para la eliminación de patógenos e inmunocomplejos después de su captura por el sistema inmunitario adaptativo. La unión de C1q a inmunocomplejos convierte el dímero de cimógeno de C1r en su forma activa para escindir y de este modo activar a C1s. C1s traduce la unión de C1q en activación del complemento en dos etapas de escisión: en primer lugar, convierte C4 en C4a y C4b y después, escinde C2 unido a C4b para formar la C3 convertasa, C4b2a. Este complejo convierte el abundante componente plasmático, C3, en C3a y C3b. La acumulación de C3b muy próximo al complejo C4b2a desplaza la especificidad de sustrato de C3 a C5 para formar la C5 convertasa C4b2a$(C3b)_n$. Los complejos de C3 y C5 convertasa generados mediante la activación de la vía clásica son idénticos a los generados mediante la vía de activación de lectina. En la vía alternativa, una hidrólisis espontánea de bajo nivel del componente C3 da como resultado la deposición de fragmentos de proteína sobre las superficies celulares, desencadenando la activación del complemento sobre células extrañas, mientras que las proteínas reguladoras asociadas con células en los tejidos del hospedador evitan la activación, previniendo de este modo el daño propio. Al igual que la vía alternativa, la vía de lectina puede activarse en ausencia de inmunocomplejos. La activación se inicia por la unión de un complejo de activación de la vía de lectina multi-molecular para patrones moleculares asociados con patógenos (por sus siglas en inglés, PAMP, ***P**athogen-**A**ssociated **M**olecular **P**atterns*), principalmente estructuras de carbohidratos presentes sobre patógenos bacterianos, fúngicos o víricos o patrones de glucosilación aberrantes en células apoptóticas, necróticas, malignas o privadas de oxígeno (Collard, C.D., et al., *Am. J. Pathol. 156*:1549-1556 (2000); Walport, M.J., *N. Engl. J. Med. 344*:1058-1066 (2001); Schwaeble, W., et al., *Immunobiology 205*:455-466 (2002); y Fujita, T., *Nat. Rev. Immunol.* 2:346-353 (2002)).

La lectina de unión a manano (MBL) fue el primer subcomponente de reconocimiento de carbohidratos que se demostró que forma complejos con un grupo de nuevas serina proteasas, denominadas serina proteasas asociadas a MBL (MASP) y numeradas de acuerdo con a secuencia de su descubrimiento (es decir, MASP-1, MASP-2 y MASP-3). En el ser humano, los complejos de activación de la vía de lectina pueden formarse con cuatro subcomponentes de reconocimiento de carbohidratos alternativos con diferentes especificidades de unión a carbohidratos, es decir, MBL 2 y tres miembros diferentes de la familia de ficolina, a saber, L-ficolina, H-ficolina y M-ficolina y las MASP. Dos formas de MBL, MBL A y MBL C y ficolina-A forman complejos de activación de la vía de lectina con las MASP en plasma de ratón y rata. Los presentes inventores han clonado y caracterizado con anterioridad MASP-2 y un producto génico de MASP-2 truncado adicional de 19 kDa, denominado MAp19 o sMAP, en seres humanos, ratones y ratas (Thiel, S., et al., *Nature 386*:506-510 (1997);. Stover, C.M., et al., *J. Immunol. 162*:3481-3490 (1999); Takahashi, M., et al., *Int. Immunol. 11*:859-863 (1999); y Stover, C.M., et al., *J. Immunol. 163*:6848-6859 (1999)). MAp19/ sMAP está desprovisto de actividad proteasa, pero puede regular la activación de la vía de lectina compitiendo por la unión de las MASP a complejos de reconocimiento de carbohidratos (Iwaki, D. et al., *J. Immunol. 177*:8626-8632 (2006)).

Hay indicios que sugieren que de las tres MASP, solo es necesaria MASP-2 para traducir la unión de complejos de reconocimiento de la vía de lectina en activación del complemento (Thiel, S., et al. (1997); Vorup-Jensen, T., et al., *J. Immunol. 165*:2093-2100 (2000); Thiel, S., et al., *J. Immunol. 165*:878-887 (2000); Rossi, V., et al., *J. Biol. Chem. 276*:40880-40887 (2001)). Esta conclusión se ve subrayada por el fenotipo de una estirpe de ratón recientemente descrita deficiente para MASP-1 y MASP-3. Aparte de un retraso en el inicio de la activación del complemento mediada por la vía de lectina *in vitro***,** los ratones deficientes para MASP-1/3 conservan actividad funcional de la vía de lectina. La reconstitución de suero deficiente para MASP-1 y MASP-3 con MASP-1 recombinante supera este retraso en la activación de la vía de lectina, lo que implica que MASP-1 puede facilitar la activación de MASP-2 (Takahashi, M., et al., *J. Immunol. 180*:6132-6138 (2008)). Un estudio más reciente ha demostrado que MASP-1 (y probablemente también MASP-3) es necesaria para convertir la enzima de activación de la vía alternativa, el factor D, en su forma enzimáticamente activa a partir de su forma de cimógeno (Takahashi, M., et al., *J. Exp. Med. 207*:29-37 (2010)). La importancia fisiológica de este proceso se ve confirmada por la ausencia de actividad funcional de la vía alternativa en el plasma de ratones con deficiencia de MASP-1/3.

Las estirpes de ratón recientemente generadas con deficiencias específicas combinadas de los subcomponentes de reconocimiento de carbohidratos de la vía de lectina, MBL A y MBL C, pueden seguir iniciando la activación de la vía de lectina mediante el subcomponente de reconocimiento de la vía de lectina restante, ficolina A (Takahashi, K., et al., *Microbes Infect. 4*:773-784 (2002)). La ausencia de actividad funcional de la vía de lectina residual en ratones deficientes para MASP-2 proporciona un modelo concluyente para estudiar el papel de este brazo efector de la inmunidad humoral innata para la salud y la enfermedad.

La disponibilidad de estirpes de ratón deficientes para C4 y MASP-2 permitió a los presentes inventores definir una

nueva ruta de activación que esquiva C4 específica de la vía de lectina, pero dependiente de MASP-2, del complemento C3. La contribución esencial de esta nueva vía de activación que esquiva C4 mediada por la vía de lectina a la pérdida de tejido post-isquémico se ve subrayada por el prominente fenotipo protector de la deficiencia de MASP-2 en MIRI, mientras que los ratones deficientes para C4 probados en el mismo modelo no muestran protección.

En este ejemplo, los presentes inventores describen una nueva activación de C3 de complemento que esquiva C4 dependiente de MASP-2 y mediada por la vía de lectina. La relevancia fisiológica de esta nueva vía de activación se determina por el fenotipo protector de la deficiencia de MASP-2 en un modelo experimental de lesión por isquemia/reperfusión de miocardio (MIRI), donde los animales deficientes para C4 no estaban protegidos.

Métodos:

Los ratones deficientes para MASP-2 no muestran anomalías macroscópicas. Se generaron ratones deficientes para MASP-2 como se describe en el **ejemplo 1.** Los ratones tanto heterocigotos ($^{+/-}$) como homocigotos ($^{-/-}$) deficientes para MASP-2 son sanos y fértiles y no muestran anomalías macroscópicas. Su esperanza de vida es similar a la de sus compañeros de camada de tipo silvestre (>18 meses). Antes de estudiar el fenotipo de estos ratones en modelos experimentales de enfermedad, la estirpe de los presentes inventores MASP-2$^{-/-}$ se retrocruzó durante once generaciones en un origen de C57BL/6. Se confirmó la ausencia total de ARNm de MASP-2 mediante transferencia de Northern de preparaciones de poli A + ARN de hígado seleccionado, mientras que el ARNm de 1,2 kb que codifica MAp19 o sMAP (un producto de corte y empalme alternativo truncado del gen MASP2) se expresa abundantemente.

El análisis qRT-PCR usando pares de cebadores específicos para la secuencia codificante del dominio de serina proteasa de MASP-2 (cadena B) o el resto de la secuencia codificante de la cadena A mostró que no era detectable el ARNm que codifica la cadena B en ratones MASP-2 $^{-/-}$, mientras que aumentó la abundancia del transcrito de ARNm de la cadena A alterado. Igualmente, la abundancia de ARNm que codifica MAp19/sMAP aumenta en ratones MASP-2 $^{+/-}$ y MASP-2 $^{-/-}$. Los niveles plasmáticos de MASP-2, determinados mediante ELISA para 5 animales de cada genotipo, fueron de 300 ng/ml para controles TS (intervalo 260-330 ng/ml), 360 ng/ml para ratones heterocigotos (intervalo 330-395 ng/ml) e indetectable en ratones MASP-2 $^{-/-}$. Usando qRT-PCR, se determinaron los perfiles de expresión de ARNm, demostrando que los ratones MASP-2$^{-/-}$ expresan ARNm para MBL A, MBL C, ficolina A, MASP-1, MASP-3, C1q, C1rA, C1sA, Factor B, Factor D, C4 y C3 con una abundancia similar a la de sus compañeros de camada suficientes para MASP-2 (datos no mostrados).

Los niveles plasmáticos de C3 de ratones MASP-2$^{-/-}$ (n=8) y MASP-2$^{+/+}$ (n=7) se midieron usando un kit de ELISA para C3 de ratón disponible comercialmente (Kamiya, Biomedical, Seattle, WA). Los niveles de C3 de ratones deficientes para MASP-2 (media de 0,84 mg/ml, +/- 0,34) fueron similares a los de los controles TS (media de 0,92, +/- 0,37).

Resultados:

MASP-2 es esencial para la actividad funcional de la vía de lectina.

Como se describe en el ejemplo 2 y se muestra en la FIGURA 5, los análisis *in vitro* de plasma MASP-2$^{-/-}$ demostraron una total ausencia de actividad funcional de la vía de lectina en la activación de superficies recubiertas de manano y cimosano para la activación de C4. Igualmente, no fueron detectables ni C4 dependiente de la vía de lectina ni la escisión de C3 en plasma MASP-2$^{-/-}$en superficies recubiertas con N-acetil glucosamina, que se une y desencadena la activación mediante MBL A, MBL C y ficolina A (datos no mostrados).

Los análisis de sueros y plasma de ratones MASP-2-/- demostraron claramente que MASP-2 se necesita esencialmente para activar el complemento por la vía de lectina. La deficiencia total de actividad funcional de la vía de lectina, sin embargo, deja intactas las demás vías de activación del complemento: el plasma MASP-2-/- puede seguir activando el complemento por la vía clásica **(FIGURA 26A)** y la vía alternativa **(FIGURA 26B).** En la **FIGURA 26A** y **26B,** el símbolo "*" indica suero de TS (MASP-2 (+/+)); el símbolo "●" indica suero de TS (con agotamiento de C1q); el símbolo "□" indica suero de MASP-2 (-/-); y el símbolo "Δ" indica suero de MASP-2 (-/-) (con agotamiento de C1q).

La **FIGURA 26A** ilustra gráficamente que los ratones MASP-2-/- conservan una vía clásica funcional: se evaluó la deposición de C3b en placas de microtitulación recubiertas con inmunocomplejos (generados *in situ* recubriendo con BSA y después añadiendo IgG de cabra anti-BSA). La **FIGURA 26B** ilustra gráficamente que los ratones deficientes para MASP-2 conservan una vía alternativa funcional: se evaluó la deposición de C3b sobre placas de microtitulación recubiertas de cimosano en condiciones que permiten únicamente la activación de la vía alternativa (tampón que contiene Mg^{2+} y EGTA). Los resultados mostrados en la FIGURA 26A y la FIGURA 26B son medias de duplicados y son típicos de tres experimentos independientes. Por todo el documento se usaron los mismos símbolos para los orígenes del plasma. Estos resultados demuestran que hay presencia de una vía alternativa funcional en los ratones deficientes para MASP-2, según se evidencia en los resultados mostrados en la FIGURA 26B en las condiciones experimentales diseñadas para desencadenar directamente la vía alternativa, mientras se inactivan tanto la vía clásica como la vía de lectina.

La vía de lectina de activación del complemento contribuye a la pérdida inflamatoria de tejido en la lesión por isquemia/reperfusión de miocardio (MIRI).

Para estudiar la contribución de la actividad funcional de la vía de lectina a la MIRI, los presentes inventores compararon ratones MASP-2$^{-/-}$ y controles de camada TS en un modelo de MIRI después de una ligadura transitoria y reperfusión de la rama anterior descendiente izquierda de la arteria coronaria (LAD). La presencia o ausencia de C4 de complemento no tiene impacto en el grado de pérdida de tejido isquémico en la MIRI. Los presentes inventores evaluaron el impacto de la deficiencia de C4 en los tamaños del infarto después de MIRI experimental. Tal como se muestra en la **FIGURA 27A** y la **FIGURA 27B,** se observaron idénticos tamaños de infarto tanto en ratones deficientes para C4 como en sus compañeros de camada TS. La FIGURA 27A ilustra gráficamente la pérdida de tejido inducida por MIRI después de ligadura de LAD y reperfusión en ratones C4-/- (n=6) y controles de camada TS emparejados (n=7). La FIGURA 27B ilustra gráficamente la INF en función de AAR, demostrando claramente que los ratones C4-/- son igual de susceptibles a la MIRI que sus controles TS (línea discontinua).

Estos resultados demuestran que los ratones deficientes para C4 no están protegidos frente a la MIRI. Este resultado era inesperado, ya que entra en conflicto con la noción ampliamente aceptada de que el fragmento de activación principal de C4, C4b, es un componente esencial de la C3 convertasa de la vía de lectina y de la vía clásica, C4b2a. Por lo tanto, los presentes inventores evaluaron si puede detectarse una activación específica de la vía de lectina residual de C3 de complemento en ratones deficientes para C4 y en plasma humano.

La vía de lectina puede activar a C3 de complemento en ausencia de C4 mediante una nueva de activación que esquiva C4 dependiente de MASP-2.

Alentados por los informes históricos que indicaban la existencia de una vía de activación que esquiva C4 en suero de cobaya eficiente para C4 (May, J.E., y M. Frank, *J. Immunol. 111*:1671-1677 (1973)), los presentes inventores analizaron si los ratones deficientes para C4 pueden tener una actividad funcional residual de la vía clásica o de lectina de C3 en condiciones de ensayo específicas de la vía que excluyan contribuciones de la vía alternativa.

Se evaluó la deposición de C3b sobre placas de microtitulación recubiertas de manano usando plasma re-calcificado a concentraciones plasmáticas prohibitivas para la activación de la vía alternativa (1,25% e inferiores). Aunque no fue detectable la escisión de C3 en plasma deficiente para C4 evaluado para activación de la vía clásica (datos no mostrados), se observó una fuerte actividad de escisión de C3 residual en plasma de ratones deficientes para C4 cuando se inició la activación del complemento por la vía de lectina. La dependencia de la vía de lectina se demuestra mediante la inhibición competitiva de la escisión de C3 después de la preincubación de diluciones de plasma deficiente para C4 con manano soluble (véase la **FIGURA 28A).** Tal como se muestra en la **FIGURA 28A-D,** se observó activación de C3 dependiente de MASP-2 en ausencia de C4. La FIGURA 28A ilustra gráficamente la deposición de C3b por plasma de ratón C4+/+ (cruces) y C4-/- (círculos huecos). La preincubación del plasma C4-/- con un exceso (1 µg/ml) de manano en fase fluida antes del ensayo inhibió completamente la deposición de C3 (círculos sólidos). Los resultados son típicos de 3 experimentos independientes. La FIGURA 28B ilustra gráficamente los resultados de un experimento en que se mezcló plasma de ratón de tipo silvestre, deficiente para MASP-2 (cuadrados huecos) y C4-/-(al 1%) con diversas concentraciones de mAbM11 anti-MASP-2 de rata (abscisas) y la deposición de C3b se ensayó sobre placas recubiertas de manano. Los resultados son las medias (± DT) de 4 ensayos (duplicados de 2 de cada tipo de plasma). La FIGURA 28C ilustra gráficamente los resultados de un experimento con plasma humano: NHS agrupado (cruces), plasma de C4-/- (círculos huecos) y plasma de C4-/- preincubado con 1 µg/ml de manano (círculos sólidos). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. La FIGURA 28D ilustra gráficamente la inhibición de la deposición de C3b en ratones suficientes para C4 y plasma humano deficiente para C4 (1%) por mAbH3 anti-MASP-2 humano (medias ± DT de triplicados). Tal como se muestra en la FIGURA 28B, no se detectó activación de C3 dependiente de la vía de lectina en plasma MASP-2-/- ensayado en paralelo, lo que implica que esta ruta de activación de C3 que esquiva a C4 es dependiente de MASP-2.

Para corroborar adicionalmente estos hallazgos, los presentes inventores establecieron una serie de mAb inhibidores asilados de bibliotecas de presentación de anticuerpos mediante exploración por afinidad contra MASP-2A humana y de rata recombinante (donde el resto de serina del dominio activo de proteasa se reemplazó por un resto de alanina mediante mutagénesis de sitio dirigido para prevenir la degradación autocatalítica del antígeno). Se aislaron anticuerpos recombinantes contra MASP-2 (AbH3 y AbM11) de bibliotecas de anticuerpos combinatorias (Knappik, A., et al., *J. Mol. Biol. 296*:57-86 (2000)), usando como antígenos MASP-2A de humano y de rata (Chen, C.B. y Wallis, *J. Biol. Chem. 276*:25894-25902 (2001)). Se convirtió un fragmento Fab2 anti-rata que inhibía potentemente la activación mediada por la vía de lectina de C4 y C3 en plasma de ratón (CI50~1 nM) en un anticuerpo IgG2a de longitud completa. Se generó suero policlonal anti-MASP-2A murina en ratas. Estas herramientas permitieron a los presentes inventores confirmar la dependencia de MASP-2 de esta nueva ruta de activación de C3 que esquiva a C4 específica de la vía de lectina, como se describe adicionalmente más adelante.

Tal como se muestra en la **FIGURA 28B,** M211, un anticuerpo monoclonal inhibidor que se une de manera selectiva a MASP-2 de ratón y de rata inhibió la activación de C3 que esquiva a C4 en ratones deficientes para C4 así como la activación de C3 de plasma de ratón TS por la vía de lectina de un modo dependiente de la concentración, con valores de CI_{50} similares. Todos los ensayos se llevaron a cabo a altas diluciones de plasma, lo que hacía que la vía

de activación de la vía alternativa fuese disfuncional (siendo la concentración de plasma máxima del 1,25%).

Para investigar la presencia de una activación análoga de C3 que esquive C4 específica de la vía de lectina en seres humanos, los presentes inventores analizaron el plasma de un donante con una deficiencia hereditaria de ambos genes C4 humanos (es decir, C4A y C4B), que daba como resultado la ausencia total de C4 (Yang, Y., et al., *J. Immunol. 173*:2803-2814 (2004)). La **FIGURA 28C** muestra que este plasma del paciente activa de manera eficaz a C3 en altas diluciones de plasma (haciendo que la vía de activación alternativa sea disfuncional). El modo de activación de C3 específico de la vía de lectina sobre placas recubiertas con manano se demuestra en plasma murino deficiente para C4 **(FIGURA 28A)** y plasma humano deficiente para C4 **(FIGURA 28C)** añadiendo un exceso de concentración de manano en fase fluida. Se evaluó la dependencia de MASP-2 de este mecanismo de activación de C3 en plasma humano deficiente para C4 usando AbH3, un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a MASP-2 humana y suprime la actividad funcional de MASP-2. Tal como se muestra en la **FIGURA 28D,** AbH3 inhibió la deposición de C3b (y C3dg) en plasma humano tanto suficiente para C4 como deficiente para C4 con una potencia comparable.

Para determinar un posible papel de otros componentes del complemento en la activación de C3 que esquiva C4, los presentes inventores probaron plasma de ratones MASP-1/3-/- y Bf/C2-/- junto con plasma MASP-2-/-, C4-/- y C1q-/- (como controles) en condiciones de ensayo específicas tanto para la vía de lectina como para la vía clásica. Se representó la cantidad relativa de escisión de C3 frente a la cantidad de C3 depositada cuando se usa plasma TS.

La **FIGURA 29A** ilustra gráficamente un análisis comparativo de la actividad de C3 convertasa en plasma de diversas cepas de ratón deficientes para complemento probadas en condiciones de ensayo específicas para la activación de la vía de lectina o para la activación de la vía clásica. Se ensayaron en paralelo muestras de plasma diluidas (al 1%) de ratones TS (n=6), ratones MASP-2-/- (n=4), ratones MASP-1/3-/- (n=2), ratones C4-/- (n=8), ratones C4/MASP-1/3-/- (n=8), ratones Bf/C2-/- (n=2) y ratones C1q-/- (n=2). La reconstitución del plasma Bf/C2-/- con 2,5µg/ml de C2 de rata recombinante (Bf/C2-/- +C2) restauró la deposición de C3b. Los resultados son las medias (±DT). **p<0,01 (en comparación con plasma TS). Tal como se muestra en la **FIGURA 29A,** se observó una deposición sustancial de C3 en el plasma C4-/- ensayado en condiciones de ensayo específicas para la vía de lectina, pero no en condiciones específicas para la vía clásica. Nuevamente, no se observó deposición de C3 en plasma deficiente para MASP-2 por la vía de activación de la vía de lectina, mientras que el mismo plasma depositó C3 por la vía clásica. En plasma MASP-1/3-/-, se produjo deposición de C3 en condiciones de ensayo específicas tanto para la vía de lectina como la clásica. No se observó deposición de C3 en plasma con una deficiencia combinada de C4 y MASP-1/3, ya fuese usando condiciones específicas para la vía de lectina o para la vía clásica. La deposición de C3 no es detectable en plasma C2/Bf-/-, ya sea por la vía de lectina o por la vía clásica. La reconstitución del plasma de ratón C2/Bf-/- con C2 recombinante, sin embargo, restauró la escisión de C3 mediada tanto por la vía de lectina como por la vía clásica. Las condiciones de ensayo se validaron usando plasma C1q-/-.

La **FIGURA 29B** ilustra gráficamente la cinética resuelta en tiempo de la actividad de C3 convertasa en plasma de diversas estirpes de ratón deficientes para complemento, TS, fB-/-, C4-/-, MASP-1/3-/- y plasma MASP-2-/-, probadas en condiciones de ensayo específicas para la activación de la vía de lectina (plasma al 1%, los resultados son típicos de tres experimentos independientes). Tal como se muestra en la **FIGURA 29B,** aunque no se observó escisión de C3 en plasma MASP-2-/-, el plasma fB-/- escindió a C3 con una cinética similar al plasma TS. Se observó un retraso significativo en la conversión de C3 a C3b (y C3dg) dependiente de la vía de lectina en plasma C4-/- así como en plasma deficiente para MASP-1/3. Recientemente, se ha demostrado que este retraso en la activación de C3 en plasma MASP-1/3-/- es dependiente de MASP-1 en lugar de MASP-3 (Takahashi, M., et al., *J. Immunol. 180*:6132-6138 (2008)).

Análisis:

Los resultados descritos en este ejemplo aportan sólidos indicios acerca de que la actividad funcional de MASP-2 es esencial para la activación de C3 por la vía de lectina tanto en presencia como ausencia de C4. Además, C2 y MASP-1 son necesarias para que funcione esta nueva vía de activación de C3 que esquiva a C4 específica de la vía de lectina. El análisis funcional de la actividad funcional de la vía de lectina en plasma MASP-2-/- así como C4-/- reveló la existencia de una vía de activación de C3 de complemento independiente de C4 pero dependiente de MASP-2 previamente no reconocida y se demostró que C3 puede activarse de un modo independiente de la vía de lectina en total ausencia de C4. Aunque aún falta por aclarar la composición molecular detallada y la secuencia de eventos de activación de esta nueva C3 convertasa dependiente de MASP-2, los resultados de los presentes inventores sugieren que esta vía de activación que esquiva a C4 requiere además la presencia de C2 de complemento, así como de MASP-1. La pérdida de actividad de escisión de C3 mediada por la vía de lectina en plasma de ratones con deficiencia combinada para C4 y MASP-1/3 puede explicarse por el papel recientemente descrito de MASP-1 para mejorar la activación de complemento dependiente de MASP-2 por escisión directa y activación de MASP-2 (Takahashi, M., et al., *J. Immunol. 180*:6132-6138 (2008)). Igualmente, MASP-1 puede ayudar a la actividad funcional de MASP-2 por su capacidad para escindir a C2 (Moller-Kristensen, et al., *Int. Immunol. 19*:141-149 (2007)). Ambas actividades pueden explicar la velocidad reducida a la que el plasma deficiente para MASP-1/3 escinde C3 por la vía de activación de lectina y por qué puede ser necesaria MASP-1 para mantener la conversión de C3 por la vía de activación que esquiva a C4.

Se demostró que la incapacidad del plasma C2/fB-/- para activar a C3 por la vía de lectina era dependiente de C2, ya que la adición de C2 de rata recombinante a plasma C2/fB-/- restauró la capacidad del plasma reconstituido para activar a C3 en placas recubiertas de manano.

La observación de que la deficiencia de C4 altera específicamente la vía clásica de activación del complemento, mientras que la vía de lectina conserva un nivel fisiológicamente crítico de actividad de C3 convertasa por una vía de activación que esquiva a C4 dependiente de MASP-2 impele a volver a evaluar el papel de la vía de lectina en diversos modelos de enfermedad, incluyendo la infección experimental por *S. pneumoniae* (Brown, J. S., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99*:16969-16974 (2002); la encefalomielitis alérgica experimental (Boos, L.A., et al., *Glia 49*:158-160 (2005); y los modelos de regeneración hepática murina dependiente de C3 (Clark, A., et al., *Mol. Immunol. 45*:3125-3132 (2008)). Este último grupo demostró que los ratones deficientes para C4 pueden activar a C3 de un modo independiente de la vía alternativa, ya que la inhibición *in vivo* de la vía alternativa mediante agotamiento mediado por anticuerpos de la actividad funcional del factor B no afectó a la regeneración hepática dependiente de la escisión de C3 en ratones C4-/- (Clark, A., et al. (2008)). Esta vía de activación de C3 que esquiva a C4 mediada por la vía de lectina también puede explicar la ausencia de un fenotipo protector de la deficiencia de C4 en el presente modelo de MIRI, así como en un modelo previamente descrito de rechazo de aloinjerto renal (Lin, T., et al., *Am. J. Pathol. 168*:1241-1248 (2006)). En cambio, los recientes resultados de los presentes inventores han demostrado de manera independiente un fenotipo protector significativo de ratones MASP-2-/- en modelos de trasplante renal (Farrar, C.A., et al., *Mol. Immunol. 46*:2832 (2009)).

En resumen, los resultados de este ejemplo respaldan la visión de que la activación de C3 que esquiva a C4 dependiente de MASP-2 es un mecanismo fisiológicamente relevante que puede ser importante en condiciones donde la disponibilidad de C4 esté limitando la activación de C3.

Ejemplo 23

Este ejemplo describe la activación de C3 por sustratos de trombina y la deposición de C3 en manano en ratones TS (+/+), MASP-2 (-/-), F11 (-/-), F11/C4 (-/-) y C4 (-/-).

Base lógica:

Como se ha descrito en el **ejemplo 14,** se determinó que la activación de trombina puede tener lugar después de la activación de la vía de la lectina en condiciones fisiológicas, y se demuestra el grado de implicación de MASP-2. C3 juega un papel fundamental en la activación del sistema de complemento. Se requiere la activación de C3 para las vías de activación del complemento tanto clásica como alternativa. Se realizó un experimento para determinar si C3 se activa por sustratos de la trombina.

Métodos:

Activación de C3 por sustratos de la trombina

Se midió la activación de C3 en presencia de las siguientes formas activadas de sustratos de trombina; FCXIa humano, FVIIa humano, FXa bovino, FXa humano, proteína C activada humana y trombina humana. C3 se incubó con los diversos sustratos de trombina y después se separó en condiciones reductoras en geles de SDS-poliacrilamida al 10%. Después de la transferencia electroforética usando una membrana de celulosa, la membrana se incubó con anticuerpo monoclonal de rata biotinilado anti-C3 de ratón, se detectó con un kit de estreptavidina-HRP y se reveló usando reactivo ECL.

Resultados:

La activación de C3 implica la escisión de la cadena a intacta en la cadena a' truncada y C3a soluble (no mostrado en la FIGURA 30). La **FIGURA 30** muestra los resultados de un análisis de transferencia de Western sobre la activación de C3 humano por sustratos de trombina, en donde la cadena alfa de C3 no escindida y la cadena a' del producto de activación se muestran por flechas. Tal como se muestra en la **FIGURA 30,** la incubación de C3 con las formas activadas del factor de coagulación humano XI y el factor X, así como el factor de coagulación bovino X activado, puede escindir C3 *in vitro* en ausencia de cualquier proteasa del complemento.

Deposición de C3 en manano

Se realizaron ensayos de deposición de C3 en muestras de suero obtenidas de TS, MASP-2 (-/-), F11(-/-), F11(-/-)/C4(-/-) y C4(-/-). F11 es el gen que codifica el factor de coagulación XI. Para medir la activación de C3, se revistieron placas de microtitulación con manano (1 µg/pocillo), añadiendo después suero de oveja anti-HSA (2 µg/ml) en TBS/tween/Ca^{2+}. Las placas se bloquearon con HSA al 0,1% en TBS y se lavaron como se ha indicado anteriormente. Se diluyeron muestras de plasma en barbital 4 mM, se añadieron NaCl 145 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 7,4, a las placas y estas se incubaron durante 1,5 h a 37°C. Después del lavado, se detectó el C3b unido usando anticuerpo de conejo anti-C3c humano (Dako), seguido de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa y pNPP.

Resultados:

La **FIGURA 31** muestra los resultados del ensayo de deposición de C3 en muestras de suero obtenidas de TS, MASP-2 (-/-), F11(-/-), F11(-/-)/C4 (-/-) y C4 (-/-). Tal como se muestra en la **FIGURA 31,** existe una vía de la lectina funcional incluso en ausencia total de C4. Como se demuestra además en la FIGURA 31, esta nueva activación del complemento dependiente de la vía de la lectina requiere el factor de coagulación XI.

Análisis:

Antes de los resultados obtenidos en este experimento, los expertos en la materia creían que la vía de la lectina del complemento requería C4 para su actividad. Por lo tanto, los datos de los ratones con supresión génica de C4 (y seres humanos deficientes para C4) se interpretaron suponiendo que dichos organismos eran deficientes para la vía de la lectina (además de la deficiencia para la vía clásica). Los resultados del presente documento demuestran que esta noción es falsa. Por lo tanto, las conclusiones de los estudios previos que sugieren que la vía de la lectina no era importante en ciertas situaciones patológicas basándose en el fenotipo de animales deficientes para C4 pueden ser falsas. Los datos descritos en este ejemplo también demuestran que en el contexto fisiológico del suero completo, la vía de la lectina puede activar componentes de la cascada de la coagulación. Por lo tanto, se demuestra que hay una comunicación cruzada entre el complemento y la coagulación en la que está implicado MASP-2.

Ejemplo 24

Este ejemplo describe métodos para evaluar el efecto de un anticuerpo anti-MASP-2 sobre la lisis de glóbulos rojos de muestras de sangre obtenidas de pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN).

Antecedentes/Base lógica:

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), también denominada síndrome de Marchiafava-Micheli, es una enfermedad de la sangre adquirida y potencialmente letal, caracterizada por anemia hemolítica intravascular inducida por el complemento. La seña de identidad de la HPN es la hemólisis intravascular crónica que es una consecuencia de la activación no regulada de la vía alternativa del complemento. Lindorfer, M.A., et al., *Blood 115*(11) (2010). La anemia en la HPN se debe a la destrucción de glóbulos rojos en el torrente sanguíneo. Los síntomas de la HPN incluyen orina de color rojo, debido a la presencia de hemoglobina en la orina, y trombosis. La HPN se desarrolla por sí sola, citada como "HPN primaria" o en el contexto de otros trastornos de la médula ósea, tales como anemia aplásica, citada como "HPN secundaria". El tratamiento de la HPN incluye transfusiones de sangre para la anemia, anticoagulación para la trombosis y el uso del anticuerpo monoclonal eculizumab (Soliris), que protege a las células sanguíneas contra la destrucción inmunitaria mediante la inhibición del sistema de complemento (Hillmen P. et al., *N. Engl. J. Med. 350*(6):552-9 (2004)). Sin embargo, en una parte significativa de los pacientes de HPN tratados con eculizumab sigue quedando una anemia hemolítica inmunomediada clínicamente significativa porque el anticuerpo no bloquea la activación de la vía alternativa del complemento.

Este ejemplo describe métodos para evaluar el efecto de un anticuerpo anti-MASP-2 sobre la lisis de glóbulos rojos de muestras de sangre obtenidas de pacientes de PNH (no tratados con Soliris) que se incuban con suero humano normal acidificado con identidad ABO.

Métodos:

Reactivos:

Se obtienen eritrocitos de donantes normales y de pacientes que padecen PNH (no tratados con Soliris) por venopunción, y se preparan como se describe en Wilcox, LA., et al., *Blood 78*:820-829 (1991), incorporado en la presente memoria por referencia. Pueden generarse anticuerpos anti-MASP-2 con actividad bloqueante funcional de la vía de la lectina como se describe en el Ejemplo 10.

Análisis de Hemólisis:

El método para determinar el efecto de anticuerpos anti-MASP-2 sobre la capacidad de bloquear la hemólisis de eritrocitos de pacientes de PNH se realiza usando los métodos descritos en Lindorfer, M.A., et al., *Blood 15*(11):2283-91 (2010) y Wilcox, L.A., et al., *Blood 78*:820-829 (1991), ambas referencias incorporadas en la presente memoria por referencia. Como se describe en Lindorfer et al., se centrifugan eritrocitos de muestras de pacientes de PNH, se aspira la capa leucocitaria y las células se lavan en tampón veronal con gelatina (GVB) antes de cada experimento. En los eritrocitos se ensaya la susceptibilidad a la lisis mediada por APC como se indica a continuación. Se diluyen sueros humanos normales con identidad ABO con GVB que contiene $CaCl_2$ 0,15 mM y $MgCl_2$ 0,5 mM (GVB^{+2}) y se acidifican a pH 6,4 (NHS acidificado, aNHS) y se usan para reconstituir los eritrocitos a un hematocrito del 1,6% en aNHS al 50%. Después, las mezclas se incuban a 37°C y, después de 1 hora, los eritrocitos se sedimentan por centrifugación. Se mide la densidad óptica de una alícuota del sobrenadante recuperado a 405 nm y se usa para calcular el porcentaje de lisis. Se procesan de manera similar muestras reconstituidas en suero acidificado-EDTA y se usan para definir la lisis de fondo no mediada por el complemento (típicamente menos del 3%). La lisis completa (100%) se determina después de incubar los eritrocitos en agua

destilada.

Para determinar el efecto de anticuerpos anti-MASP-2 sobre la hemólisis de eritrocitos afectados por HPN, se incuban eritrocitos de pacientes de HPN en aNHS en presencia de concentraciones crecientes de los anticuerpos anti-MASP-2 y posteriormente se cuantifica la presencia/cantidad de hemólisis.

En vista del hecho de que se ha demostrado que los anticuerpos anti-MASP-2 bloquean la activación posterior de la vía alternativa del complemento, es de esperar que los anticuerpos anti-MASP-2 sean eficaces en el bloqueo de la hemólisis mediada por la vía alternativa de eritrocitos afectados por HPN y sean útiles como agente terapéutico para tratar a pacientes que padecen HPN.

Ejemplo 25

Este ejemplo describe métodos para evaluar el efecto de un anticuerpo bloqueante anti-MASP-2 sobre la activación del complemento por crioglobulinas en muestras de sangre obtenidas de pacientes que padecen crioglobulinemia.

Antecedentes/Base lógica:

La crioglobulinemia se caracteriza por la presencia de crioglobulinas en el suero. Las crioglobulinas son inmunoglobulinas individuales o mezcladas (normalmente anticuerpos IgM) que sufren agregación reversible a bajas temperaturas. La agregación lleva a la activación del complemento por la vía clásica y a la inflamación en lechos vasculares, particularmente en la periferia. Las presentaciones clínicas de crioglobulinemia incluyen vasculitis y glomerulonefritis.

La crioglobulinemia puede clasificarse como se indica a continuación basándose en la composición de crioglobulina: La crioglobulinemia tipo I o crioglobulinemia simple, es el resultado de una inmunoglobulina monoclonal, normalmente la inmunoglobulina M (IgM); la crioglobulinemia de tipos II y III (crioglobulinemia mixta) contiene factores reumatoides (FR), que normalmente son IgM en complejos con la parte Fc de IgG policlonal.

Las afecciones asociadas con la crioglobulinemia incluyen infección por hepatitis C, trastornos linfoproliferativos y otras enfermedades autoinmunitarias. Los inmunocomplejos que contienen crioglobulina producen un síndrome clínico de inflamación sistémica, posiblemente debido a su capacidad de activar el complemento. Aunque los inmunocomplejos de IgG normalmente activan la vía clásica del complemento, los complejos que contienen IgM también pueden activar la vía del complemento a través de la vía de la lectina (Zhang, M., et al., *Mol Immunol 44*(1-3):103-110 (2007) y Zhang. M., et al., *J. Immunol. 177*(7):4727-34 (2006)).

Ciertos estudios inmunohistoquímicos han demostrado adicionalmente que los inmunocomplejos de crioglobulina contienen componentes de la vía de la lectina, y las biopsias de pacientes con glomerulonefritis crioglobulinémica proporcionaron pruebas inmunohistoquímicas de activación de la vía de la lectina *in situ* (Ohsawa, I., et al., *Clin Immunol 101*(1):59-66 (2001)). Estos resultados sugieren que la vía de la lectina puede contribuir a la inflamación y a los resultados adversos de las enfermedades crioglobulémicas.

Métodos:

El método para determinar el efecto de anticuerpos anti-MASP-2 sobre la capacidad de bloquear los efectos adversos de la crioglobulinemia se realiza usando el ensayo para la conversión de C3 en la fase fluida como se describe en Ng Y.C. et al., *Arthritis and Rheumatism 31*(1):99-107 (1988), incorporado en la presente memoria por referencia. Como se describe en Ng et al., en la crioglobulinemia mixta esencial (CME), el factor reumatoide monoclonal (mRF), normalmente IgM, forma un complejo con IgG policlonal formando inmunocomplejos crioprecipitados característicos (IC) (crioglobulina tipo II). Se ha demostrado la presencia de inmunoglobulinas y C3 en paredes de vasos sanguíneos de tejidos afectados tales como la piel, los nervios y los riñones. Como se describe en Ng et al., se añade mRF marcado con ^{125}I a suero (suero humano normal y suero obtenido de pacientes que padecen crioglobulinemia), se incuba a 37°C y se mide la unión a los eritrocitos.

La conversión de C3 en la fase fluida se determina en suero (suero humano normal y suero obtenido de pacientes que padecen crioglobulinemia) en presencia o ausencia de los siguientes IC: BSA-anti BSA, mRF, mRF más IgG o crioglobulinas, en presencia o ausencia de anticuerpos anti-MASP-2. La fijación de C3 y C4 a IC se mide usando un ensayo de coprecipitación con F(ab')2 anti-C3 y F(ab')2 anti-C4.

En vista del hecho de que se ha demostrado que los anticuerpos anti-MASP-2 bloquean la activación de la vía de la lectina, es de esperar que los anticuerpos anti-MASP-2 sean eficaces en el bloqueo de efectos adversos mediados por el complemento asociados con la crioglobulinemia, y sean útiles como agente terapéutico para tratar a pacientes que padecen crioglobulinemia.

Ejemplo 26

Este ejemplo describe métodos para evaluar el efecto de un anticuerpo anti-MASP-2 sobre muestras de sangre obtenidas de pacientes con enfermedad de las crioaglutininas, que se manifiesta como anemia.

Antecedentes/Base lógica:

La enfermedad de las crioaglutininas (CAD), es un tipo de anemia hemolítica autoinmunitaria. Los anticuerpos de las crioaglutininas (normalmente IgM) se activan por las bajas temperaturas y se unen y agregan a los glóbulos rojos. Los anticuerpos de las crioaglutininas se combinan con el complemento y atacan al antígeno presente en la superficie de los glóbulos rojos. Esto lleva a la opsonización de los glóbulos rojos (hemólisis) que desencadena su eliminación por el sistema reticuloendotelial. La temperatura a la que tiene lugar la aglutinación varía de un paciente a otro.

La CAD se manifiesta como anemia. Cuando la tasa de destrucción de glóbulos rojos excede la capacidad de la médula ósea para producir un número adecuado de células portadoras de oxígeno, aparece la anemia. La CAD puede estar causada por una enfermedad o trastorno subyacente, citada como "CAD secundaria", tal como una enfermedad infecciosa (neumonía por micoplasma, paperas, mononucleosis), una enfermedad linfoproliferativa (linfoma, leucemia linfocítica crónica) o trastorno del tejido conectivo. Se considera que los pacientes de CAD primaria tienen un trastorno linfoproliferativo de la médula ósea de bajo grado. La CAD tanto primaria como secundaria son afecciones adquiridas.

Métodos:

Reactivos:

Se obtienen eritrocitos de donantes normales y de pacientes que padecen CAD por venopunción. Pueden generarse anticuerpos anti-MASP-2 con actividad bloqueante funcional de la vía de la lectina como se describe en el Ejemplo 10.

El efecto de los anticuerpos anti-MASP-2 para bloquear la activación mediada por crioaglutininas de la vía de la lectina puede determinarse como se indica a continuación. Se sensibilizan eritrocitos de pacientes positivos para el grupo sanguíneo I con crioaglutininas (es decir, anticuerpos IgM), en presencia o ausencia de anticuerpos anti-MASP-2. Después se ensaya en los eritrocitos la capacidad de activar la vía de la lectina midiendo la unión de C3.

En vista del hecho de que se ha demostrado que los anticuerpos anti-MASP-2 bloquean la activación de la vía de la lectina, es de esperar que los anticuerpos anti-MASP-2 sean eficaces en el bloqueo de los efectos adversos mediados por el complemento asociados con la enfermedad de las crioaglutininas y sean útiles como agente terapéutico para tratar a pacientes que padecen la enfermedad de las crioaglutininas.

Ejemplo 27

Este ejemplo describe métodos para evaluar el efecto de un anticuerpo anti-MASP-2 sobre la lisis de glóbulos rojos en muestras de sangre obtenidas de ratones con síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa).

Antecedentes/Base lógica:

El síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa) se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia y fallo renal causado por trombos de plaquetas en la microcirculación del riñón y de otros órganos. El SHUa está asociado con una regulación defectuosa del complemento y puede ser esporádico o familiar. El SHUa está asociado con mutaciones en genes codificantes que intervienen en la activación del complemento, incluyendo factor de complemento H, cofactor de membrana B y factor I, así como la proteína 1 relacionada con el factor de complemento H (CFHR1) y la proteína 3 relacionada con el factor de complemento H (CFHR3). Zipfel, P.F., et al., *PloS Genetics 3*(3):e41 (2007). Este ejemplo describe métodos para evaluar el efecto de un anticuerpo anti-MASP-2 sobre la lisis de glóbulos rojos de muestras de sangre obtenidas de ratones con SHUa.

Métodos:

El efecto de los anticuerpos anti-MASP-2 para tratar el SHUa puede determinarse en un modelo de ratón de esta enfermedad en el que el gen fH endógeno de ratón se ha reemplazado por un homólogo humano que codifica una forma mutante de fH encontrada con frecuencia en los pacientes con SHUa. Véase Pickering M.C. et al., *J. Exp. Med.* 204(6):1249-1256 (2007), incorporado en la presente memoria por referencia. Como se describe en Pickering et al., estos ratones desarrollan una patología similar al SHUa. Para evaluar el efecto de un anticuerpo anti-MASP-2 para el tratamiento del SHUa, se administran anticuerpos anti-MASP-2 a los ratones con SHUa mutantes y se compara la lisis de los glóbulos rojos obtenidos de controles tratados con ac anti-MASP-2 y no tratados. En vista del hecho de que se ha demostrado que los anticuerpos anti-MASP-2 bloquean la activación de la vía de la lectina, es de esperar que los anticuerpos anti-MASP-2 sean eficaces en el bloqueo de la lisis de glóbulos rojos en mamíferos que padecen SHUa.

Ejemplo 28

Este ejemplo describe métodos para evaluar el efecto de un anticuerpo anti-MASP-2 para el tratamiento del glaucoma.

Base lógica/Antecedentes:

Se ha demostrado que la activación descontrolada del complemento contribuye a la progresión de la lesión degenerativa en las células ganglionales retinales (RGC), sus sinapsis y axones en el glaucoma. Véase Tezel G. et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci 51*:5071-5082 (2010). Por ejemplo, algunos estudios histopatológicos de tejidos humanos e *in vivo* usando diferentes modelos animales han demostrado que los componentes del complemento, incluyendo C1q y C3, son sintetizados y se forma el complejo de complemento terminal en la retina glaucomatosa (véase Stasi K. et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci 47*:1024-1029 (2006), Kuehn M.H. et al., *Exp Eye Res 83*:620-628 (2006)). Como además se describe en Kuehn M.H. et al., *Experimental Eye Research 87*:89-95 (2008), la síntesis y deposición del complemento se induce por I/R retiniana y la alteración de la cascada del complemento retrasa la degeneración del RGC. En este estudio, se observó que los ratones que portaban una alteración diana del componente C3 del complemento mostraron degeneración del RGC retrasada después de una I/R retiniana transitoria cuando se comparó con animales normales.

Métodos:

El método para determinar el efecto de anticuerpos anti-MASP-2 sobre la degeneración del RGC se lleva a cabo en un modelo animal de I/R retiniana como se describe en Kuehn M.H. et al., *Experimental Eye Research 87*:89-95 (2008), incorporado en la presente memoria por referencia. Como se describe en Kuehn et al., se induce isquemia retiniana anestesiando a los animales y después insertando una aguja de calibre 30 conectada a un depósito que contiene solución salina tamponada con fosfato a través de la córnea dentro de la cámara anterior del ojo. Después se eleva el depósito salino para provocar una presión intraocular de 104 mmHg, suficiente para impedir completamente la circulación a través del sistema vascular de la retina. La isquemia intraocular elevada se confirma por blanqueamiento del iris y la retina y la isquemia se mantiene durante 45 minutos únicamente en el ojo izquierdo; el ojo derecho sirve como control y no recibe canulación. Después, los ratones se sacrifican 1 o 3 semanas después de la inducción de la isquemia. Se administran anticuerpos anti-MASP-2 a los ratones, localmente en el ojo o sistémicamente, para evaluar el efecto de un anticuerpo anti-MASP administrado antes de la inducción de la isquemia.

Se realiza un estudio inmunohistoquímico de los ojos usando anticuerpos contra C1q y C3 para detectar la deposición del complemento. También pueden evaluarse las lesiones del nervio óptico usando métodos de microscopía electrónica convencionales. La cuantificación de las RGC de la retina supervivientes se realiza usando marcaje con gamma sinucleína.

Resultados:

Como se describe en Kuehn et al., en los ratones de control normales, una isquemia transitoria de la retina produce cambios degenerativos en el nervio óptico y depósitos retinianos de C1q y C3 detectables por inmunohistoquímica. En cambio, los ratones deficientes para C3 presentaron una notable reducción de la degeneración axonal, presentando únicamente niveles minoritarios de lesión del nervio óptico 1 semana después de la inducción. Basándose en estos resultados, Es de esperar que se observen resultados similares cuando este ensayo se realiza en un ratón con supresión génica de MASP-2, y cuando se administran anticuerpos anti-MASP-2 a un ratón normal antes de la inducción de la isquemia.

Ejemplo 29

Este ejemplo demuestra que un inhibidor de MASP-2, tal como un anticuerpo anti-MASP-2, es eficaz para el tratamiento de la exposición a una radiación y/o para el tratamiento, mejora o prevención del síndrome agudo por radiación.

Base lógica:

La exposición a altas dosis de radiación ionizante produce mortalidad por dos mecanismos principales: toxicidad en la médula ósea y síndrome gastrointestinal. La toxicidad en la médula ósea produce una reducción de todas las células hematológicas, predisponiendo al organismo a la muerte por infecciones y hemorragias. El síndrome gastrointestinal es más grave y se debe a una pérdida de la función de la barrera intestinal a causa de la desintegración de la capa epitelial del intestino y a una pérdida de función intestinal endocrina. Esto lleva a una septicemia y al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica asociado que pueden ocasionar la muerte.

La vía de la lectina del complemento es un mecanismo inmunitario innato que inicia la inflamación en respuesta a lesiones tisulares y a la exposición a superficies extrañas (es decir, bacterias). El bloqueo de esta vía produce mejores resultados en modelos de ratón de lesión isquémica de tejido intestinal o choque séptico. Se ha propuesto la hipótesis de que la vía de la lectina puede desencadenar una inflamación excesiva y dañina en respuesta a la lesión tisular inducida por radiación. Por lo tanto, el bloqueo de la vía de la lectina puede reducir lesiones secundarias y aumentar la supervivencia después de una exposición aguda a la radiación.

El objetivo del estudio realizado como se describe en este ejemplo fue evaluar el efecto del bloqueo de la vía de la lectina sobre la supervivencia en un modelo de ratón de lesión por radiación mediante la administración de

anticuerpos anti-MASP-2 murino.

Materiales y métodos:

Materiales. Los artículos de ensayo usados en este estudio fueron (i) un anticuerpo anti-MASP-2 murino de alta afinidad (mAbM11) y (ii) un anticuerpo anti-MASP-2 humano de alta afinidad (mAbH6) que bloquea el componente de proteína de MASP-2 de la vía del complemento de la lectina, que se produjeron en células de mamífero transfectadas. Las concentraciones de dosificación fueron 1 mg/kg de anticuerpo anti-MASP-2 murino (mAbM11), 5 mg/kg de anticuerpo anti-MASP-2 humano (mAbH6) o solución salina estéril. Para cada sesión de dosificación, se preparó un volumen adecuado de soluciones de dosificación frescas.

Animales. Se obtuvieron ratones macho Swiss-Webster adultos de Harlan Laboratories (Houston, TX). Los animales se alojaron en jaulas de fondo sólido con lecho de Alpha-Dri y se les proporcionó dieta de roedores PMI 5002 (Animal Specialties, Inc., Hubbard OR) y agua *ad libitum*. Se supervisó la temperatura y en la sala que alojaba a los animales se aplicó un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad.

Irradiación. Después de una aclimatación de 2 semanas en la instalación, los ratones se irradiaron a 6,5 y 7,0 Gy por exposición de todo el cuerpo en grupos de 10 a una tasa de dosis de 0,78 Gy/min usando un sistema Therapax X-RAD 320 equipado con un generador de rayos X de alta estabilidad de 320-kV, tubo de rayos X metal cerámico, colimador variable de haz de rayos x y filtro (Precision X-ray Incorporated, East Haven, CT). Los niveles de dosis se seleccionaron basándose en estudios previos realizados con la misma cepa de ratones que indicaban que la DL50/30 estaba comprendida entre 6,5 y 7,0 Gy (datos no mostrados).

Formulación de Fármaco y Administración. El volumen apropiado de soluciones madre concentradas se diluyó con solución salina enfriada con hielo para preparar soluciones de dosificación de 0,2 mg/ml de anticuerpo anti-MASP-2 murino (mAbM11) o 0,5 mg/ml de anticuerpo anti-MASP-2 humano (mAbH6) de acuerdo con el protocolo. La administración de los anticuerpos anti-MASP-2 mAbM11 y mAbH6 se realizó por inyección IP usando una aguja de calibre 25 basada en el peso del animal para administrar 1 mg/kg de mAbM11, 5 mg/kg de mAbH6 o vehículo salino.

Diseño del Estudio. Los ratones se asignaron aleatoriamente a los grupos descritos en la Tabla 8. El peso corporal y la temperatura se midieron y registraron diariamente. Los ratones de los grupos 7, 11 y 13 se sacrificaron el día 7 después de la radiación y se extrajo sangre por punción cardiaca bajo anestesia profunda. Los animales supervivientes al día 30 después de la radiación se sacrificaron de la misma manera y se extrajo sangre. Se preparó plasma a partir de las muestras de sangre recogidas de acuerdo con el protocolo y se devolvió al patrocinador para su análisis.

TABLA 8: Grupos de Estudio

Grupo ID	N	Nivel de Irradiación (Gy)	Tratamiento	Programa de Dosis
1	20	6,5	Vehículo	18 h antes de la irradiación, 2 h después de la irradiación, refuerzo semanal
2	20	6,5	ac anti-MASP-2 murino (mAbM11)	18 h antes de la irradiación únicamente
3	20	6,5	ac anti-MASP-2 murino (mAbM11)	18 h antes de la irradiación, 2 h después de la irradiación, refuerzo semanal
4	20	6,5	ac anti-MASP-2 murino (mAbM11)	2 h después de la irradiación, refuerzo semanal
5	20	6,5	ac anti-MASP-2 humano (mAbH6)	18 h antes de la irradiación, 2 h después de la irradiación, refuerzo semanal
6	20	7,0	Vehículo	18 h antes de la irradiación, 2 h después de la irradiación, refuerzo semanal

Grupo ID	N	Nivel de Irradiación (Gy)	Tratamiento	Programa de Dosis
7	5	7,0	Vehículo	2 h después de la irradiación únicamente
8	20	7,0	ac anti-MASP-2 murino (mAbM11)	18 h antes de la irradiación únicamente
9	20	7,0	ac anti-MASP-2 murino (mAbM11)	18 h antes de la irradiación, 2 h después de la irradiación, refuerzo semanal
10	20	7,0	ac anti-MASP-2 murino (mAbM11)	2 h después de la irradiación, refuerzo semanal
11	5	7,0	ac anti-MASP-2 murino (mAbM11)	2 h después de la irradiación únicamente
12	20	7,0	ac anti-MASP-2 humano (mAbH6)	18 h antes de la irradiación, 2 h después de la irradiación, refuerzo semanal
13	5	Ninguno	Ninguno	Ninguno

Análisis Estadístico. Se generaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y se usaron para comparar los tiempos de supervivencia medios entre grupos de tratamiento usando métodos log-Rank y de Wilcoxon. Se presentan los promedios con desviaciones típicas o las medias aritméticas con error típico de la media. Se realizan comparaciones estadísticas usando una prueba t bilateral de muestras independientes entre animales irradiados controlados y grupos de tratamiento individuales.

Resultados

En las **FIGURAS 32A** y **32B** se proporcionan, respectivamente, los gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier para los grupos de exposición a 7,0 y 6,5 Gy y se resumen más adelante en la Tabla 9. En general, el tratamiento con ac anti-MASP-2 murino (mAbM11) antes de la irradiación aumentó la supervivencia de los ratones irradiados en comparación con los animales de control irradiados y tratados con vehículo a los niveles de exposición tanto de 6,5 (aumento del 20%) como de 7,0 Gy (aumento del 30%). Al nivel de exposición de 6,5 Gy, el tratamiento después de la irradiación con ac anti-MASP-2 murino produjo un modesto aumento de la supervivencia (15%) en comparación con los animales irradiados con el control de vehículo.

En comparación, todos los animales tratados al nivel de exposición de 7,0 Gy mostraron un aumento de supervivencia en comparación con los animales de control irradiados y tratados con vehículo. El mayor cambio en la supervivencia se produjo en los animales que recibieron mAbH6, con un aumento del 45% en comparación con los animales de control. Además, al nivel de exposición de 7,0 Gy, las mortalidades en el grupo tratado con mAbH6 se produjeron por primera vez el día 15 después de la irradiación en comparación con el día 8 después de la irradiación para los animales de control irradiados y tratados con vehículo, un aumento de 7 días con respecto a los animales de control. El tiempo medio hasta la mortalidad para los ratones que recibieron mAbH6 (27,3 ± 1,3 días) se aumentó significativamente ($p = 0,0087$) en comparación con los animales de control (20,7 ± 2,0 días) al nivel de exposición de 7,0 Gy.

El porcentaje de cambio en peso corporal en comparación con el día previo a la irradiación (día -1) se registró a lo largo de todo el estudio. Se produjo una pérdida de peso transitoria en todos los animales irradiados, sin indicios de cambios diferenciales debidos al tratamiento con mAbM11 o mAbH6 en comparación con los controles (datos no mostrados). Al final del estudio, todos los animales supervivientes mostraron un aumento de peso corporal con respecto al peso corporal de partida (día -1).

TABLA 9: Tasas de supervivencia de animales de ensayo expuestos a la radiación

Grupo de Ensayo	Nivel de Exposición	Supervivencia (%)	Tiempo hasta la Muerte (Media Aritmética ± SEM, Día)	Primera/Última Muerte (Día)
Irradiación de Control	6,5 Gy	65 %	24,0 ± 2,0	9/16

mAbM11 antes de la exposición	6,5 Gy	85 %	27,7 ± 1,5	13/17
mAbM11 antes + después de la exposición	6,5 Gy	65 %	24,0 ± 2,0	9/15
mAbM11 después de la exposición	6,5 Gy	80 %	26,3 ± 1,9	9/13
mAbH6 antes + después de la exposición	6,5 Gy	65 %	24,6 ± 1,9	9/19
Irradiación de control	7,0 Gy	35 %	20,7 ± 2,0	8/17
mAbM11 antes de la exposición	7,0 Gy	65 %	23,0 ± 2,3	7/13
mAbM11 antes + después de la exposición	7,0 Gy	55 %	21,6 ± 2,2	7/16
mAbM11 después de la exposición	7,0 Gy	70 %	24,3 ± 2,1	9/14
mAbH6 antes + después de la exposición	7,0 Gy	80 %	27,3 ± 1,3*	15/20

*p = 0,0087 por ensayo t bilateral para muestras independientes entre animales irradiados controlados y grupo de tratamiento al mismo nivel de exposición a la irradiación.

Análisis

El síndrome agudo por radiación consiste en tres subsíndromes definidos: hematopoyético, gastrointestinal y cerebrovascular. El síndrome observado depende de la dosis de radiación, observándose los efectos hematopoyéticos en los seres humanos con exposiciones a la radiación significativas parciales o de cuerpo entero que exceden de 1 Gy. El síndrome hematopoyético se caracteriza por depresión severa de la función de la médula ósea que conduce a pancitopenia con cambios en el recuento sanguíneo, en los glóbulos rojos y en los glóbulos blancos, y en las plaquetas, que aparecen de forma concomitante con el daño en el sistema inmunitario. Cuando se produce nadir, con pocos neutrófilos y plaquetas presentes en la sangre periférica, neutropenia, fiebre, las complicaciones de septicemia y hemorragias incontrolables conducen a la muerte.

En el presente estudio, se observó que la administración de mAbH6 aumentaba la capacidad de supervivencia de la irradiación de rayos x de cuerpo entero en ratones macho Swiss-Webster irradiados a 7,0 Gy. De manera destacable, al nivel de exposición de 7,0 Gy, el 80% de los animales que recibieron mAbH6 sobrevivieron hasta los 30 días en comparación con el 35% de los animales irradiados de control tratados con vehículo. De manera importante, el primer día de muerte en este grupo tratado no se produjo hasta el día 15 después de la irradiación, un aumento de 7 días con respecto al observado en los animales irradiados de control tratados con vehículo. Curiosamente, a la menor exposición a los rayos X (6,5 Gy), la administración de mAbH6 no parecía impactar en la capacidad de supervivencia o retraso en la mortalidad en comparación con los animales irradiados de control tratados con vehículo. Podría haber múltiples razones que explicaran esta diferencia en respuesta entre los niveles de exposición, aunque la verificación de cualquier hipótesis puede requerir estudios adicionales, incluyendo la recogida de muestras intermedias para realizar cultivos microbiológicos y determinar los parámetros hematológicos. Una explicación puede ser simplemente que debido al número de animales asignados a los grupos, puede haberse excluido la observación de cualquier diferencia sutil relacionada con el tratamiento. Por ejemplo, con tamaños de grupos de n=20, la diferencia de supervivencia entre el 65% (mAbH6 a una exposición de 6,5 Gy) y el 80% (mAbH6 a una exposición de 7,0 Gy) es de 3 animales. Por otra parte, la diferencia entre el 35% (control con vehículo a una exposición de 7,0 Gy) y el 80% (mAbH6 a una exposición de 7,0 Gy) es de 9 animales, y proporciona una prueba sólida de una diferencia relacionada con el tratamiento.

Estos resultados demuestran que los anticuerpos anti-MASP-2 son eficaces en el tratamiento de un mamífero con riesgo de padecer o que padece los efectos dañinos del síndrome agudo por radiación.

Ejemplo 30

Este ejemplo demuestra que los ratones deficientes para MASP-2 están protegidos de la mortalidad inducida por *Neisseria meningitidis* después de la infección con *N. meningitidis* del serogrupo A o *Neisseria meningitidis* del

serogrupo B.

Métodos:

Se generaron ratones con supresión génica de MASP-2 (ratones MASP-2 KO) como se describe en el ejemplo 1. Se inocularon ratones MASP-2 KO de 10 semanas de edad (n=10) y ratones C57/BL6 de tipo silvestre (TS) (n=10) por inyección intraperitoneal (i.p.) con una dosificación de 2,6 x 10^7 UFC de *Neisseria meningitidis* del serogrupo A Z2491 en un volumen de 100 µl. La dosis infectiva se administró a los ratones junto con hierro dextrano a una concentración final de 400 mg/kg. Se supervisó la supervivencia de los ratones después de la infección durante un periodo de tiempo de 72 horas.

En un experimento separado, se inocularon ratones MASP-2 KO de 10 semanas de edad (n=10) y ratones C57/BL6 de tipo silvestre (n=10) por inyección i.p. con una dosificación de 6 x 10^6 UFC de *Neisseria meningitidis* del serogrupo B, cepa MC58, en un volumen de 100 µl. La dosis infectiva se administró a los ratones junto con hierro dextrano a una dosis final de 400 mg/kg. Se supervisó la supervivencia de los ratones después de la infección durante un periodo de tiempo de 72 horas. También se determinó una puntuación de enfermedad para los ratones TS y MASP-2 KO durante el periodo de tiempo de 72 horas después de la infección, basándose en los parámetros de puntuación descritos más adelante en la **TABLA 10,** que se basa en el esquema de Fransen et al. (2010) con ligeras modificaciones.

TABLA 10: Puntuación de enfermedad asociada con signos clínicos en ratones infectados

Signos	**Puntuación**
Normal	0
Pelaje ligeramente erizado	1
Pelaje erizado, ojos lentos y pegajosos	2
Pelaje erizado, letárgico y ojos cerrados	3
Muy enfermo y sin movimiento tras la estimulación	4
Muerte	5

Se tomaron muestras de sangre de los ratones a intervalos de una hora después de la infección y se analizaron para determinar el nivel sérico (log ufc/ml) de *N. meningitidis* para verificar la infección y determinar la velocidad de eliminación de la bacteria del suero.

Resultados:

La **FIGURA 33** es un gráfico de Kaplan-Meyer que ilustra el porcentaje de supervivencia de ratones MASP-2 KO y TS después de la administración de una dosis infectiva de 2,6 x 10^7 ufc de *N. meningitidis* del serogrupo A Z2491. Tal como se muestra en la **FIGURA 33,** un 100% de los ratones MASP-2 KO sobrevivió a lo largo del periodo de 72 horas después de la infección. En cambio, solo el 80% de los ratones TS (p= 0,012) seguían vivos 24 horas después de la infección, y solo el 50% de los ratones TS seguían vivos 72 horas después de la infección. Estos resultados demuestran que los ratones deficientes para MASP-2 están protegidos frente a la mortalidad inducida por *N. meningitidis* del serogrupo A Z2491.

La **FIGURA 34** es una gráfica de Kaplan-Meyer que ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones MASP-2 KO y TS después de la administración de una dosis infecciosa de 6 x 10^6 ufc de *N. meningitidis* del serogrupo B, cepa MC58. Tal como se muestra en la **FIGURA 34,** un 90% de los ratones MASP-2 KO sobrevivió a lo largo del periodo de 72 horas después de la infección. En cambio, solo un 20% de los ratones TS (p=0,0022) seguía vivo 24 horas después de la infección. Estos resultados demuestran que los ratones deficientes para MASP-2 están protegidos frente a la mortalidad inducida por *N. meningitidis* del serogrupo B, cepa MC58.

La **FIGURA 35** ilustra gráficamente el log ufc/ml de *N. meningitidis* serogrupo B cepa MC58 recuperadas en diversos puntos de tiempo en muestras de sangre tomadas de los ratones MASP-2 KO y TS después de la infección i.p. con 6x10^6 ufc de *N. meningitidis* serogrupo B, cepa MC58 (n=3 en diferentes puntos de tiempo para ambos grupos de ratones). Los resultados se expresan como Medias aritméticas ± SEM. Tal como se muestra en la **FIGURA 35,** en los ratones TS, el nivel de *N. meningitidis* en sangre alcanzó un pico de aproximadamente 6,0 log ufc/ml a las 24 horas después de la infección y se redujo hasta 4,0 log cfu/ml 36 horas después de la infección. En cambio, en los ratones MASP-2 KO, el nivel de *N. meningitidis* alcanzó un pico de aproximadamente 4,0 log ufc/ml a las 12 horas después de la infección y se redujo hasta aproximadamente 1,0 log ufc/ml 36 horas después de la infección (el

símbolo "*" indica p<0,05; el símbolo "**" indica p=0,0043). estos resultados demuestran que aunque se infectó a los ratones MASP-2 KO con la misma dosis de *N. meningitidis* serogrupo B, cepa MC58, que a los ratones TS, los ratones MASP-2 KO tenían una mejor eliminación de la bacteriemia en comparación con los TS.

La **FIGURA 36** ilustra gráficamente la puntuación media de enfermedad de ratones MASP-2 KO y TS a las 3, 6, 12 y 24 horas después de la infección con $6x10^6$ ufc de *N. meningitidis* serogrupo B, cepa MC58. Tal como se muestra en la **FIGURA 36,** los ratones deficientes para MASP-2 mostraron una mayor resistencia a la infección, con puntuaciones de enfermedad mucho más bajas a las 6 horas (el símbolo "*" indica p=0,0411), a las 12 horas (el símbolo "**" indica p=0,0049) y a las 24 horas (el símbolo "***" indica p=0,0049) después de la infección, en comparación con los ratones TS. Los resultados de la **FIGURA 36** se expresan como Medias aritméticas ± SEM.

En resumen, los resultados de este ejemplo demuestran que los ratones deficientes para MASP-2 están protegidos de la mortalidad inducida por *Neisseria meningitidis* después de la infección con *N. meningitidis* del serogrupo A o *N. meningitidis* del serogrupo B.

Ejemplo 31

Este ejemplo demuestra que la administración de anticuerpo anti-MASP-2 después de la infección con *N. meningitidis* aumenta la supervivencia de ratones infectados con *N. meningitidis.*

Antecedentes/Base lógica:

Como se describe en el ejemplo 10, se utilizó proteína MASP-2 de rata para obtener una vista de conjunto de una biblioteca de presentación en fagos de Fab, a partir de la cual se identificó el Fab2 n.º 11 como anticuerpo funcionalmente activo. Se generaron anticuerpos de longitud completa de los isotipos IgG2c de rata e IgG2a de ratón a partir del Fab2 n.º 11. Se caracterizaron los parámetros farmacodinámicos del anticuerpo anti-MASP-2 de longitud completa del isotipo IgG2a de ratón (como se describe en el ejemplo 19).

En este ejemplo, se analizó el anticuerpo anti-MASP-2 de longitud completa de ratón procedente del Fab2 n.º 11 en el modelo de ratón de infección por *N. meningitidis*.

Métodos:

El isotipo IgG2a de ratón del anticuerpo anti-MASP-2 de longitud completa derivado del Fab2 n.º 11, generado como se ha descrito anteriormente, se ensayó en el modelo de ratón de infección por *N. meningitidis* como se indica a continuación.

Administración de anticuerpos monoclonales de ratón anti-MASP-2 (MoAb) después de la infección

Se trataron ratones Charles River C57/BL6 de 9 semanas de edad con anticuerpo inhibidor de ratón anti-MASP-2 (1,0 mg/kg) (n=12) o anticuerpo de control de isotipo (n=10) 3 horas después de la inyección i.p. con una alta dosis ($4x10^6$ ufc) de *N. meningitidis* del serogrupo B, cepa MC58.

Resultados:

La **FIGURA 37** es una gráfica de Kaplan-Meyer que ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones después de la administración de una dosis infecciosa de $4x10^6$ ufc de *N. meningitidis* del serogrupo B, cepa MC58, seguido de la administración, 3 horas después de la infección, de anticuerpo inhibidor anti-MASP-2 (1,0 mg/kg) o anticuerpo de control de isotipo. Tal como se muestra en la **FIGURA 37,** un 90% de los ratones tratados con anticuerpo anti-MASP-2 sobrevivió a lo largo del periodo de 72 horas después de la infección. En cambio, solo un 50% de los ratones tratados con anticuerpo de control de isotipo sobrevivió a lo largo del periodo de 72 horas después de la infección. El símbolo "*" indica p=0,0301, como se determina por comparación de las dos curvas de supervivencia.

Estos resultados demuestran que la administración de anticuerpo anti-MASP-2 es eficaz para tratar y mejorar la supervivencia en sujetos infectados por *N. meningitidis*.

Como se demuestra en la presente memoria, el uso de anticuerpo anti-MASP-2 en el tratamiento de un sujeto infectado con *N. meningitidis* es eficaz cuando se administra en las 3 horas siguientes a la infección y es de esperar que sea eficaz en las 24 a 48 horas siguientes a la infección. La enfermedad meningocócica (meningococemia o meningitis) es una urgencia médica, y típicamente se iniciará la terapia inmediatamente si se sospecha de enfermedad meningocócica (es decir, antes de identificar positivamente a *N. meningitidis* como agente etiológico).

En vista de los resultados en el ratón MASP-2 KO demostrados en el **EJEMPLO 30,** se cree que la administración de anticuerpo anti-MASP-2 antes de la infección con *N. meningitidis* también sería eficaz para prevenir o reducir la gravedad de la infección.

Ejemplo 32

Este ejemplo demuestra que la administración del anticuerpo anti-MASP-2 es eficaz para tratar la infección por *N. meningitidis* en suero humano.

Base lógica:

Los pacientes con niveles séricos reducidos de MBL funcional presentan una susceptibilidad aumentada a infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes (Kilpatrick et al., *Biochim Biophys Acta* 1572:401-413 (2002)). Se sabe que *N. meningitidis* es reconocida por MBL y se ha demostrado que los sueros deficientes para MBL no lisan a *Neisseria*.

En vista de los resultados descritos en los ejemplos 30 y 31, se llevó a cabo una serie de experimentos para determinar la eficacia de la administración de anticuerpo MASP-2 para tratar la infección por *N. meningitidis* en sueros humanos deficientes para complemento y de control. Se llevaron a cabo experimentos con alta concentración de suero (20%) para preservar la vía de complemento.

Métodos:

1. Actividad bactericida en suero en diversos sueros humanos deficientes para complemento y en suero humano tratado con anticuerpo humano anti-MASP-2

Se usaron los siguientes sueros humanos deficientes para complemento y sueros humanos de control en este experimento:

TABLA 11: Muestras de suero humano ensayadas (tal como se muestra en la FIGURA 38)

Muestra	**Tipo de suero**
A	Suero humano normal (NHS) + Ac humano anti-MASP-2
B	NHS + Ac de control de isotipo
C	Suero humano MBL -/-
D	NHS
E	NHS inactivado por calor (HI)

Se aisló un anticuerpo recombinante contra MASP-2 humana a partir de una biblioteca de anticuerpos combinatoria (Knappik, A., et al., *J. Mol. Biol. 296*:57-86 (2000)), usando MASP-2A humana recombinante como antígeno (Chen, C.B. y Wallis, *J. Biol. Chem. 276*:25894-25902 (2001)). Se identificó un fragmento scFv que inhibía potentemente la activación de C4 y C3 mediada por la vía de la lectina en plasma humano (CI50~20 nM) y se convirtió en un anticuerpo IgG4 humano de longitud completa.

Se incubó *N. meningitidis* serogrupo B-MC58 con los diferentes sueros mostrados en la **TABLA 11,** cada uno a una concentración de suero del 20%, con o sin la adición de anticuerpo inhibidor humano anti-MASP-2 (3 µg en un volumen total de 100 µl) a 37°C con agitación. Se tomaron muestras en los siguientes puntos de tiempo: intervalos de 0, 30, 60 y 90 minutos, se sacaron de las placas y se determinaron los recuentos viables. Como control negativo se usó suero humano inactivado por calor.

Resultados:

La **FIGURA 38** ilustra gráficamente el log ufc/ml de recuentos viables de *N. meningitidis* serogrupo B-MC58 recuperadas en distintos puntos de tiempo en las muestras de suero humano mostradas en la **TABLA 11.** La **TABLE 12** proporciona los resultados de la prueba de la t de Student para la **FIGURA 38.**

TABLA 12: Resultados de la prueba de la t de Student para la FIGURA 38 (punto de tiempo de 60 minutos)

	Dif. media (Log)	**¿Significativo? ¿P<0,05?**	**Resumen de valor de P**
A frente a B	-0,3678	Sí	***(0,0002)
A frente a C	-1,1053	Sí	***(p<0,0001)
A frente a D	-0,2111	Sí	**(0,0012)

C frente a D	1,9	Sí	***(p<0,0001)

Tal como se muestra en la **FIGURA 38** y en la **TABLA 12,** la eliminación dependiente de complemento de *N. meningitidis* en suero humano al 20% mejoró significativamente mediante la adición del anticuerpo inhibidor humano anti-MASP-2.

2. Eliminación dependiente de complemento de *N. meningitidis* en suero de ratón al 20% (v/v) deficiente para MASP-2.

Se usaron los siguientes sueros de ratón deficientes para complemento y sueros de ratón de control en este experimento:

TABLA 13: Muestras de suero de ratón ensayadas (tal como se muestra en la FIGURA 39)

Muestra	**Tipo de suero**
A	TS
B	MASP-2 -/-
C	MBL A/C -/-
D	TS inactivado por calor (HIS)

Se incubó *N. meningitidis* serogrupo B-MC58 con diferentes sueros de ratón deficientes para complemento, cada uno a una concentración de suero del 20%, a 37°C con agitación. Se tomaron muestras en los siguientes puntos de tiempo: intervalos de 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos, se sacaron de las placas y se determinaron los recuentos viables. Como control negativo se usó suero humano inactivado por calor.

Resultados:

La **FIGURA 39** ilustra gráficamente el log ufc/ml de recuentos viables de *N. meningitidis* serogrupo B-MC58 recuperadas en distintos puntos de tiempo en las muestras de suero de ratón mostradas en la **TABLA 13.** Tal como se muestra en la **FIGURA 39,** los sueros de ratón MASP-2 -/- tienen un mayor nivel de actividad bactericida para *N. meningitidis* que los sueros de ratón TS. El símbolo "**" indica p=0,0058, el símbolo "***" indica p=0,001. La **TABLE 14** proporciona los resultados de la prueba de la t de Student para la **FIGURA 39.**

TABLA 14: Resultados de la prueba de la t de Student para la FIGURA 39

Comparación	**Punto de tiempo**	**Dif. media (LOG)**	**¿Significativo? ¿(p<0,05)?**	**Resumen de valor de P**
A frente a B	60 min.	0,39	Sí	** (0,0058)
A frente a B	90 min.	0,6741	Sí	*** (0,001)

En resumen, los resultados en este ejemplo demuestran que los sueros MASP-2 -/- tienen un mayor nivel de actividad bactericida para *N. meningitidis* que los sueros TS.

Ejemplo 33

Este ejemplo demuestra el efecto inhibidor de la deficiencia de MASP-2 sobre la lisis de glóbulos rojos de la sangre de muestras de sangre obtenidas de un modelo de ratón de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN).

Antecedentes/Base lógica:

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), también denominada síndrome de Marchiafava-Micheli, es una enfermedad de la sangre adquirida y potencialmente letal, caracterizada por anemia hemolítica intravascular inducida por el complemento. La marca característica de la HPN es la hemólisis intravascular crónica mediada por complemento que es una consecuencia de la activación no regulada de la vía alternativa de complemento causada por la ausencia de los reguladores del complemento, CD55 y CD59, en los eritrocitos afectados por HPN, con la consiguiente hemoglobinuria y anemia. Lindorfer, M.A., et al., *Blood 115*(11) (2010), Risitano, A.M, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry,* 11:528-535 (2011). La anemia en la HPN se debe a la destrucción de glóbulos rojos en el torrente sanguíneo. Los síntomas de la HPN incluyen orina de color rojo, debido a la presencia de hemoglobina en la orina, dolor de espalda, fatiga, falta de aliento y trombosis. La HPN se desarrolla por sí sola, citada como "HPN primaria" o en el contexto de otros trastornos de la médula ósea, tales como anemia aplásica, citada como "HPN

secundaria". El tratamiento de la HPN incluye transfusiones de sangre para la anemia, anticoagulación para la trombosis y el uso del anticuerpo monoclonal eculizumab (Soliris®), que protege a las células sanguíneas contra la destrucción inmunitaria mediante la inhibición del sistema de complemento (Hillmen P. et al., *N. Engl. J. Med. 350*(6):552-9 (2004)). Eculizumab (Soliris®) es un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige al componente C5 del complemento, bloqueando su escisión por C5 convertasas, impidiendo de este modo la producción de C5a y el ensamblaje del MAC. El tratamiento de pacientes de HPN con eculizumab ha dado como resultado una reducción de la hemólisis intravascular, medida por la lactato deshidrogenasa (LDH), que da lugar a la estabilización de la hemoglobina y la no dependencia de transfusiones en aproximadamente la mitad de los pacientes (Hillmen P., et al, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol 11(6) (2011)). Aunque prácticamente todos los pacientes que se someten a terapia con eculizumab logran niveles de LDH normales o prácticamente normales (debido al control de la hemólisis intravascular), tan solo aproximadamente un tercio de los pacientes logran un valor de hemoglobina mayor de 11 g/dl y el resto de los pacientes en tratamiento con eculizumab siguen mostrando una anemia de moderada a grave (es decir, son dependientes de transfusiones), en proporciones aproximadamente iguales (Risitano A.M. et al., *Blood* 113:4094-100 (2009)). Como se describe en Risitano et al., Mini-Reviews in *Medicinal Chemistry* 11:528-535 (2011), se demostró que los pacientes de HPN en tratamiento con eculizumab contenían fragmentos de C3 unidos a una parte sustancial de sus eritrocitos afectados por HPN (mientras que los pacientes no tratados no las tenían), lo que indujo a pensar que los fragmentos de C3 unidos a membrana actúan como opsoninas en los eritrocitos afectados por HPN, lo que da como resultado su atrapamiento en las células reticuloendoteliales mediante receptores de C3 específicos y su posterior hemólisis extravascular. Por lo tanto, se necesitan estrategias terapéuticas además del uso de eculizumab para aquellos pacientes que desarrollen hemólisis extravascular mediada por el fragmento C3 debido a que siguen necesitando transfusiones de glóbulos rojos.

Este ejemplo describe métodos para evaluar el efecto del suero deficiente para MASP-2 y el suero tratado con agente inhibidor de MASP-2 en la lisis de glóbulos rojos de muestras de sangre obtenidas de un modelo de ratón de HPN y demuestra la eficacia de la inhibición de MASP-2 para tratar a sujetos que padecen HPN y también respalda el uso de inhibidores de MASP-2 para mejorar los efectos de la hemólisis extravascular mediada por fragmento C3 en sujetos afectados por HPN que se someten a terapia con un inhibidor de C5, tal como eculizumab.

Métodos:

Modelo animal de HPN:

Se obtuvieron muestras de sangre de ratones diana con deficiencias génicas de Crry y C3 (Crry/C3-/-) y ratones deficientes para CD55/CD59. Estos ratones careen de los reguladores del complemento de superficie respectivos y por lo tanto, sus eritrocitos son susceptibles a la autolisis espontánea por complemento, al igual que los glóbulos rojos humanos afectados por HPN.

A fin de sensibilizar aún más a estos eritrocitos, estas células se usaron con y sin recubrimiento con manano y después se comprobó su hemólisis en plasma C56/BL6 TS, plasma nulo para MBL, plasma MASP-2 -/-, NHS humano, plasma humano MBL -/- y NHS tratado con anticuerpo humano anti-MASP-2.

1. Ensayo de hemólisis de eritrocitos murinos doblemente deficientes para Crry/C3 y para CD55/CD59 en suero deficiente/con agotamiento de MASP-2 y controles

Día 1. Preparación de GRS (± recubrimiento de manano)

Materiales incluidos: sangre de ratón fresca, BBS/Mg^{2+}/Ca^{2+} (ácido barbitúrico 4,4 mM, barbitona sódica 1,8 mM, NaCl 145 mM, pH 7,4, Mg^{2+} 5 mM, Ca^{2+} 5mM), cloruro de cromo, $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,5 mg/ml en BBS/Mg2+/Ca2+) y manano, 100 µg/ml en BBS /Mg2+/Ca2+.

Se centrifugó sangre completa (2 ml) durante 1-2 min a 2000xg en una centrifugadora refrigerada a 4°C. Se aspiraron el plasma y la capa leucocitaria. Después, se lavó tres veces la muestra resuspendiendo el sedimento de GRS en 2 ml de BBS/gelatina/Mg2+/Ca2+ enfriada en hielo y repitiendo la etapa de centrifugación. Tras el tercer lavado, se resuspendió el sedimento en 4 ml de BBS/Mg2+/Ca2+. Se apartó una alícuota de 2 ml de los GRS como control sin recubrir. A los 2 ml restantes, se le añadieron 2 ml de CrCl3 y 2 ml de manano y se incubó la muestra con mezclado suave a temperatura ambiente durante 5 minutos. La reacción se terminó añadiendo 7,5ml de BBS/gelatina/Mg2+/Ca2+. La muestra se centrifugó como en el caso anterior, se resuspendió en 2 ml de BBS/gelatina/Mg2+/Ca2+ y se lavó dos veces más como en el caso anterior, y después se almacenó a 4°C.

Día 2. Ensayo de hemólisis

Los materiales incluyeron BBS/gelatina/Mg^{2+}/Ca^{2+} (como en el caso anterior), sueros de ensayo, placas de fondo redondo y de fondo plano de 96 pocillos y un espectrofotómetro que lee las placas de 96 pocillos a 410-414 nm.

En primer lugar, se determinó la concentración de los GRS y se ajustaron las células a 10^9/ml y se almacenaron a esta concentración. Antes de su uso, se diluyó el tampón de ensayo a 10^8/ml y después se usaron 100 ul por pocillo. la hemólisis se midió a 410-414 nm (permitiendo una mayor sensibilidad que a 541 nm). Se prepararon diluciones de los sueros de ensayo en BBS/gelatina/Mg2+/Ca2+ enfriado en hielo. Se pipetearon 100 µl de cada dilución de suero

en una placa de fondo redondo (véase la distribución en la placa). Se añadieron 100 µl de preparación de GRS diluida de manera adecuada (es decir, 10^8/ml) (véase la distribución en la placa), se incubó a 37°C durante aproximadamente 1 hora y se observó la lisis. (Pueden tomarse fotografías de las placas en este punto). Después, se centrifugó la placa a máxima velocidad durante 5 minutos. Se aspiraron 100 µl de la fase fluida, se transfirieron a placas de fondo plano y se registró la DO a 410-414 nm. Se conservaron los sedimentos de GRS (estos pueden lisarse posteriormente con agua para obtener un resultado inverso).

Experimento n.º 1:

Se obtuvo sangre fresca de ratones doblemente deficientes para CD55/CD59 y sangre de ratones doblemente deficientes para Crry/C3 y se prepararon eritrocitos como se ha descrito en detalle en el protocolo anterior. Se separaron las células y la mitad de las células se recubrieron con manano y la otra mitad se dejó sin tratar, ajustando la concentración final a 1x 10^8 por ml, de los cuales se usaron 100 µl en el ensayo de hemólisis, que se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.

Resultados del experimento n.º 1: La vía de la lectina está implicada en la lisis de eritrocitos en el modelo animal de HPN

En un experimento inicial, se determinó que los eritrocitos de ratón TS no recubiertos no se lisaban en ningún suero de ratón. Además, se determinó que los eritrocitos de ratón Crry-/- recubiertos con manano se lisaban lentamente (más de 3 horas a 37 grados centígrados) en suero de ratón TS, pero no se lisaban en suero nulo para MBL. (Datos no mostrados).

Se determinó que los eritrocitos de ratón Crry-/- recubiertos con manano se lisaban rápidamente en suero humano pero no en NHS inactivado por calor. De manera importante, los eritrocitos de ratón Crry-/- recubiertos con manano se lisaron en NHS diluido hasta 1/640 (es decir, todas las diluciones 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 y 1/640 provocaron la lisis). (Datos no mostrados). En esta dilución, la vía alternativa no es funcional (la actividad funcional de la VA se reduce significativamente a concentraciones de suero inferiores al 8%).

Conclusiones del experimento n.º 1

Los eritrocitos de ratón Crry-/- recubiertos con manano se lisan bien en suero humano altamente diluido con MBL pero no en aquellos sin MBL. La eficiente lisis en cada concentración de suero ensayada implica que la vía alternativa no está implicada o no es necesaria para la lisis. La incapacidad del suero de ratón y el suero humano deficiente para MBL para lisar los eritrocitos de ratón Crry-/- recubiertos de manano indica que la vía clásica tampoco está implicada en la lisis observada. Ya que son necesarias las moléculas de reconocimiento de la vía de la lectina (es decir, MBL), esta lisis está mediada por la vía de la lectina.

Experimento n.º 2:

Se obtuvo sangre fresca de los ratones doblemente deficientes para Crry/C3 y CD55/CD59 y se analizaron eritrocitos de ratón Crry-/- recubiertos con manano en el ensayo de hemólisis como se ha descrito anteriormente en presencia de los siguientes sueros humanos: nulo para MBL; TS; NHS pretratado con anticuerpo humano anti-MASP-2; y NHS inactivado por calor como control.

Resultados del experimento n.º 2: Los inhibidores de MASP-2 previenen la lisis de eritrocitos en el modelo animal de HPN

Con los eritrocitos de ratón Crry-/- recubiertos con manano, se incubó NHS en las diluciones diluidas hasta 1/640 (es decir, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 y 1/640), suero humano MBL-/-, NHS pretratado con mAb anti-MASP-2 y NHS inactivado por calor como control.

Se centrifugó la placa de microtitulación de ELISA y se recogieron los eritrocitos no lisados del fondo de la placa de fondo redondo. Se recogió el sobrenadante de cada pocillo y se midió la cantidad de hemoglobina liberada de los eritrocitos lisados leyendo la DO415 nm en un lector de ELISA.

En el NHS inactivado por calor (control negativo), como se esperaba, no se observó lisis. El suero humano MBL-/- lisó los eritrocitos de ratón recubiertos de manano a diluciones de 1/8 y 1/16. El NHS pretratado con anticuerpo anti-MASP-2 lisó los eritrocitos de ratón recubiertos con manano a diluciones de 1/8 y 1/16 mientras que el suero humano TS lisó los eritrocitos de ratón recubiertos con manano a diluciones de hasta 1/32.

La FIGURA 40 ilustra gráficamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón lisados (Crry/C3-/-) en el sobrenadante medida por fotometría) de eritrocitos murinos recubiertos de manano por suero humano frente a un intervalo de concentraciones de suero en suero de NHS inactivado por calor (HI), MBL-/-, NHS pretratado con anticuerpo anti-MASP-2 y NHS de control.

A partir de los resultados mostrados en la FIGURA 40, se demuestra que la inhibición de MASP-2 con anticuerpo anti-MASP-2 desplazó significativamente la CH_{50} e inhibió la lisis mediada por complemento de eritrocitos sensibilizados con protección deficiente frente a la activación autóloga del complemento.

Experimento n.º 3

Se analizó sangre fresca obtenida de los ratones doblemente deficientes para Crry/C3 y CD55/CD59 en eritrocitos de ratón Crry-/- no recubiertos en el ensayo de hemólisis descrito anteriormente en presencia de los siguientes sueros: MBL -/-; suero TS; NHS pretratado con anticuerpo humano anti-MASP-2 y NHS inactivado por calor como control.

Resultados:

La FIGURA 41 ilustra gráficamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón TS en el sobrenadante medida por fotometría) de eritrocitos murinos no recubiertos de manano por suero humano frente a un intervalo de concentraciones de suero en suero de NHS inactivado por calor (HI), MBL-/-, NHS pretratado con anticuerpo anti-MASP-2 y NHS de control. Tal como se muestra en la FIGURA 41, se demuestra que la inhibición de MASP-2 inhibe la lisis mediada por complemento de eritrocitos de ratón TS no sensibilizados.

La FIGURA 42 ilustra gráficamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón lisados (CD55/59-/-) en el sobrenadante medida por fotometría) de eritrocitos murinos no recubiertos de manano por suero humano frente a un intervalo de concentraciones de suero en suero de NHS inactivado por calor (HI), MBL-/-, NHS pretratado con anticuerpo anti-MASP-2 y NHS de control.

TABLA 12: Valores de CH_{50} expresados como concentraciones de suero

Suero	**TS**	**CD55/59 -/-**
NHS inactivado por calor	Sin lisis	Sin lisis
MBL AO/XX donante (deficiente para MBL)	7,2%	2,1%
NHS + anticuerpo anti-MASP-2	5,4%	1,5%
NHS	3,1%	0,73%

Nota: La "CH50" es el punto en el cual la hemólisis mediada por complemento alcanza un 50%.

En resumen, los resultados en este ejemplo demuestran que la inhibición de MASP-2 inhibe la lisis mediada por complemento de eritrocitos sensibilizados y no sensibilizados con protección deficiente frente a la activación autóloga del complemento. Por lo tanto, pueden usarse inhibidores de MASP-2 para tratar a sujetos que padecen HPN y también pueden usarse para mejorar (es decir, inhibir, prevenir o reducir la gravedad de) la hemólisis extravascular en pacientes con HPN que se someten a tratamiento con un inhibidor de C5, tal como eculizumab (Soliris®).

Ejemplo 34

Este ejemplo describe un estudio de seguimiento para el estudio descrito anteriormente en el ejemplo 29, que proporciona indicios adicionales que confirman que un inhibidor de MASP-2, tal como un anticuerpo contra MASP-2, es eficaz para el tratamiento de la exposición a una radiación y/o para el tratamiento, mejora o prevención del síndrome agudo por radiación.

Base lógica: En el estudio inicial descrito en el ejemplo 29, se demostró que el tratamiento antes de la irradiación con un anticuerpo anti-MASP-2 en ratones aumentó la supervivencia de los ratones irradiados en comparación con los animales de control irradiados tratados con vehículo a niveles de exposición tanto de 6,5 Gy como de 7,0 Gy. Además, en el ejemplo 29 se demostró que al nivel de exposición de 6,5 Gy, el tratamiento después de la irradiación con anticuerpo anti-MASP-2 dio como resultado un modesto aumento de la supervivencia en comparación con los animales de control irradiados con el control de vehículo. Este ejemplo describe un segundo estudio con radiación que se llevó a cabo para confirmar los resultados del primer estudio.

Métodos:

Diseño del estudio A:

Se expuso a ratones Swiss Webster (n=50) a radiación ionizante (8,0 Gy). Se evaluó el efecto de la terapia con anticuerpo anti-MASP-2 (mAbH6, 5mg/kg) administrado 18 horas antes y 2 horas después de la exposición a la radiación y de manera semanal posteriormente, sobre la mortalidad.

Resultados del estudio A:

Tal como se muestra en la FIGURA 43, se determinó que la administración del anticuerpo anti-MASP-2 mAbH6 aumentó la supervivencia en ratones expuestos a 8,0 Gy, con un aumento de la mediana de la tasa de supervivencia ajustada de 4 a 6 días en comparación con los ratones que recibieron control de vehículo y una mortalidad reducida en un 12% en comparación con los ratones que recibieron control de vehículo (prueba de rango log, p=0,040).

Diseño del estudio B:

Se expuso a ratones Swiss Webster (n=50) a radiación ionizante (8,0 Gy) en los siguientes grupos: (I: vehículo) control de salino; (II: bajo) anticuerpo anti-MASP-2 mAbH6 (5 mg/kg) administrado 18 horas antes de la irradiación y 2 horas después de la irradiación; (III: alto) mAbH6 (10 mg/kg) administrado 18 horas antes de la irradiación y 2 horas después de la irradiación; y (IV:alto después) mAbH6 (10mg/kg) administrado solo 2 horas después de la irradiación.

Resultados del estudio B:

La administración del anticuerpo anti-MASP-2 antes y después de la irradiación ajustó la supervivencia media de 4 a 5 días en comparación con los animales que recibieron el control de vehículo. La mortalidad en los ratones tratados con el anticuerpo anti-MASP-2 se redujo en un 6-12% en comparación con los ratones de control de vehículo. Además, cabe destacar que no se observaron efectos perjudiciales a causa del tratamiento significativos (datos no mostrados).

En resumen, los resultados mostrados en este ejemplo son coherentes con los resultados mostrados en el ejemplo 29 y además demuestran que los anticuerpos anti-MASP-2 son eficaces en el tratamiento de un mamífero con riesgo de padecer o que padece los efectos dañinos del síndrome agudo por radiación.

Ejemplo 35

Este estudio investiga el efecto de la deficiencia de MASP-2 en un modelo de ratón de trombosis inducida por LPS (lipopolisacárido).

Base lógica:

El síndrome hemolítico urémico (SHU), que está causado por la infección por *E. coli* productora de la toxina Shiga, es la principal causa de fallo renal agudo en niños. En este ejemplo, se llevó a cabo un modelo de Schwartzman de trombosis inducida por LPS (coagulación microvascular) en ratones MASP-2-/- (KO) para determinar si la inhibición de MASP-2 es eficaz para inhibir o prevenir la formación de trombos intravasculares.

Métodos:

Se analizaron ratones MASP-2-/- (n=9) y TS (n=10) en un modelo de Schwartzman de trombosis inducida por LPS (coagulación microvascular). Se administró a los ratones LPS de *Serratia* y se monitorizó la formación de trombos con el paso del tiempo. Se llevó a cabo una comparación de la incidencia de microtrombos y de coagulación microvascular inducida por LPS.

Resultados:

De manera destacable, todos los ratones MASP-2 -/- ensayados (9/9) no formaron trombos intravasculares después de la administración de LPS de *Serratia*. En cambio, se detectaron microtrombos en 7 de 10 ratones TS ensayados en paralelo (p=0,0031, prueba exacta de Fischer). Tal como se muestra en la FIGURA 44, se midió el tiempo hasta la aparición de oclusión microvascular después de la infección con LPS en ratones MASP-2-/- y TS, mostrando el porcentaje de ratones TS con formación de trombos medido a lo largo de 60 minutos, detectándose formación de trombos tan temprano como aproximadamente a los 15 minutos. Hasta un 80% de los ratones TS mostró formación de trombos a los 60 minutos. En cambio, como se muestra en la FIGURA 44, ninguno de los ratones MASP-2-/- tenía formación de trombos a los 60 minutos (rango log: p=0,0005).

Estos resultados demuestran que la inhibición de MASP-2 es protectora frente al desarrollo de trombos intravasculares en un modelo de SHU.

Ejemplo 36

Este ejemplo describe el efecto de anticuerpos ant-MASP-2 en un modelo de ratón de SHU usando inyección conjunta intraperitoneal de toxina Shiga 2 (STX2) más LPS.

Antecedentes:

Se desarrolló un modelo de ratón de SHU usando inyección conjunta intraperitoneal de toxina Shiga 2 (STX2) más LPS. Los análisis bioquímicos y de micromatriz de los riñones de ratón revelaron que la exposición a STX2 mas LPS tenía efectos distintos a los de la exposición a cualquiera de los dos agentes individualmente. Los análisis de sangre y suero de estos ratones mostraron neutrofilia, trombocitopenia, hemólisis de glóbulos rojos y aumento de suero,

creatinina y nitrógeno de urea en sangre. Además, el análisis histológico y por microscopía electrónica de los riñones de ratón demostraron deposición glomerular de fibrina, congestión de glóbulos rojos, formación de microtrombos y cambios ultraestructurales glomerulares. Se determinó que este modelo de SHU induce todos los síntomas clínicos de la patología del SHU en seres humanos en ratones C57BL/6, incluyendo trombocitopenia, anemia hemolítica y fallo renal, que definen la enfermedad en seres humanos. (J. Immunol 187(1):172-80 (2011))

Métodos:

Se adquirieron ratones C57BL/6 hembra con un peso de 18 a 20 g de Charles River Laboratories y se dividieron en 2 grupos (5 ratones en cada grupo). Se pretrató a un grupo de ratones mediante inyección intraperitoneal (i.p.) con el anticuerpo anti-MASP-2 recombinante, mAbM11 (100 µg por ratón; correspondiente a una concentración final de 5 mg/kg de peso corporal) diluido en un volumen total de 150 µl de suero salino. El grupo de control recibió suero salino sin anticuerpo alguno. Seis horas después de la inyección i.p. del anticuerpo anti-MASP-2 mAbM11, todos los ratones recibieron una inyección i.p. combinada de una dosis subletal (3 µg/animal; correspondiente a 150 µg/kg de peso corporal) de LPS de *Serratia marcescens* (L6136; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a una dosis de 4,5 ng/animal (correspondiente a 225 ng/kg) de STX2 (el doble de la dosis DL50) en un volumen total de 150 µl. Como control se usó inyección de suero salino.

Se monitorizó la supervivencia de los ratones cada 6 horas después de la dosis. Se sacrificó a los ratones tan pronto como alcanzasen un estado letárgico de patología por SHU. Después de 36 horas, se sacrificó a todos los ratones y se extrajeron ambos riñones para inmunohistoquímica y microscopía electrónica de barrido. Se tomaron muestras de sangre al final del experimento mediante punción cardíaca. Se separó el suero y se conservó almacenado a -80°C para medir los niveles de BUN y de creatinina en suero en los grupos tratados y de control.

Inmunohistoquímica

Se fijó una tercera parte de cada riñón de ratón en paraformaldehído al 4% durante 24 h, se procesó y se incluyó en parafina. Se cortaron secciones de tres micrómetros y se colocaron sobre portaobjetos cargados para su posterior tinción con tinte de H y E.

Microscopía electrónica

Se cortó la sección media de los riñones en bloques de aproximadamente 1 a 2 mm^3 y se fijaron durante una noche a 4°C en glutaraldehído al 2,5% en PBS 1x. Posteriormente, se procesó el tejido fijado por el departamento de microscopía electrónica de la University of Leicester.

Secciones de criostato

El otro tercio de los riñones se cortó en bloques de aproximadamente 1 a 2 mm^3 y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80°C para la toma de secciones de criostato y el análisis de ARNm.

Resultados:

La FIGURA 45 ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones de control tratados con suero salino (n=5) y ratones tratados con anticuerpo anti-MASP-2 (n=5) en el modelo frente al tiempo (horas). De manera destacable, como se muestra en la FIGURA 45, todos los ratones de control murieron a las 42 horas. En cambio, un 100 % de los ratones tratados con anticuerpo anti-MASP-2 sobrevivió durante el transcurso del experimento. De manera coherente con los resultados mostrados en la FIGURA 45, se observó que todos los ratones no tratados que fallecieron o que hubo que sacrificar con signos de enfermedad grave tenían lesiones glomerulares significativas, mientras que los glomérulos de todos os ratones tratados con anti-MASP-2 tenían una apariencia normal (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que los inhibidores de MASP-2, tales como anticuerpos anti-MASP-2, pueden usarse para tratar a sujetos que padecen o que se encuentran en riesgo de padecer una microangiopatía trombótica (MAT), tal como síndrome hemolítico urémico (SHU), SHU atípico (SHUa) o púrpura trombocitopénica trombótica (PTT).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Demopulos, G.A.
Dudler, T.
Schwaeble, H.-W.

<120> MÉTODOS PARA TRATAR AFECCIONES ASOCIADAS CON LA ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO DEPENDIENTE DE MASP-2

<130> MP.1.0126.PCT

<140> PCT/US2012/032650
<141> 06-04-2012

<150> US 61/473,698
<151> 08-04-2011

<160> 65

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 725
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<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
            125                 130                 135

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

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

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

tag cctcccctgg agctccggcc tgcccagcag gtcagaagcc agagccagcc             634

tgctggcctc agctccgggt tgggctgaga tggctgtgcc ccaactccca ttcacccacc      694

atggacccaa taataaacct ggccccaccc c                                     725
```

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

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
            180                 185
```

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

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 4

```
ggccagctgg acgggcacac c atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt ctg          51
                        Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu
                        1               5                   10

tgt ggc tcg gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct gtg          99
Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val
                15                  20                  25

ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat gac         147
Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp
            30                  35                  40

cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg cgc         195
Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg
        45                  50                  55

ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag tac         243
Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr
    60                  65                  70

gac ttc gtc aag ctg agc tcg ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg tgc         291
Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys
75                  80                  85                  90

ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act ttc         339
Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe
                95                  100                 105

tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac tcc         387
Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser
            110                 115                 120

aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag gac         435
Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp
        125                 130                 135

att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac cac         483
Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His
    140                 145                 150

cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca ggc         531
His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly
155                 160                 165                 170

tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gcc ctg tgc tcc ggc         579
Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly
                175                 180                 185
```

```
cag gtc ttc acc cag 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

cgg ccg tat ccc aaa ctc tcc agt tgc act tac agc atc agc ctg gag        675
Arg Pro Tyr Pro Lys Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu
        205                 210                 215

gag ggg ttc agt gtc att ctg gac ttt gtg gag tcc ttc gat gtg gag        723
Glu Gly Phe Ser Val Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu
    220                 225                 230

aca cac cct gaa acc ctg tgt ccc tac gac ttt ctc aag att caa aca        771
Thr His Pro Glu Thr Leu Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr
235                 240                 245                 250

gac aga gaa gaa cat ggc cca ttc tgt ggg aag aca ttg ccc cac agg        819
Asp Arg Glu Glu His Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg
                255                 260                 265

att gaa aca aaa agc aac acg gtg acc atc acc ttt gtc aca gat gaa        867
Ile Glu Thr Lys Ser Asn Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu
            270                 275                 280

tca gga gac cac aca ggc tgg aag atc cac tac acg agc aca gcg cag        915
Ser Gly Asp His Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln
        285                 290                 295

cct tgc cct tat ccg atg gcg cca cct aat ggc cac gtt tca cct gtg        963
Pro Cys Pro Tyr Pro Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val
    300                 305                 310

caa gcc aaa tac atc ctg aaa gac agc ttc tcc atc ttt tgc gag act       1011
Gln Ala Lys Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr
315                 320                 325                 330

ggc tat gag ctt ctg caa ggt cac ttg ccc ctg aaa tcc ttt act gca       1059
Gly Tyr Glu Leu Leu Gln Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala
                335                 340                 345

gtt tgt cag aaa gat gga tct tgg gac cgg cca atg ccc gcg tgc agc       1107
Val Cys Gln Lys Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser
            350                 355                 360

att gtt gac tgt ggc cct cct gat gat cta ccc agt ggc cga gtg gag       1155
Ile Val Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu
        365                 370                 375

tac atc aca ggt cct gga gtg acc acc tac aaa gct gtg att cag tac       1203
Tyr Ile Thr Gly Pro Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr
    380                 385                 390

agc tgt gaa gag acc ttc tac aca atg aaa gtg aat gat ggt aaa tat       1251
Ser Cys Glu Glu Thr Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr
395                 400                 405                 410

gtg tgt gag gct gat gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa aaa tca       1299
Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser
                415                 420                 425

ctc cca gtc tgt gag cct gtt tgt gga cta tca gcc cgc aca aca gga       1347
Leu Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly
            430                 435                 440
```

```
ggg cgt ata tat gga ggg caa aag gca aaa cct ggt gat ttt cct tgg       1395
Gly Arg Ile Tyr Gly Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp
        445                 450                 455

caa gtc ctg ata tta ggt gga acc aca gca gca ggt gca ctt tta tat       1443
Gln Val Leu Ile Leu Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr
    460                 465                 470

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

att agt gat ttt taa cttgcgtgtc 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 tacccattga ctcaagggga cataaaccac gagagtgaca 2302

gtcatctttg cccacccagt gtaatgtcac tgctcaaatt acatttcatt accttaaaaa 2362

gccagtctct tttcatactg gctgttggca tttctgtaaa ctgcctgtcc atgctctttg 2422

tttttaaact tgttcttatt gaaaaaaaaa aaaaaaaa 2460

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

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn

```
                165                 170                 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser Ile Val Asp Cys Gly Pro
        355                 360                 365

Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro Gly
    370                 375                 380

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

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

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

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

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

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 sapiens

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val
        195                 200                 205
```

```
Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr
    210                 215                 220

Leu Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His
225                 230                 235                 240

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

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

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

Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val Gln Ala Lys Tyr Ile
    290                 295                 300

Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Leu
305                 310                 315                 320

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

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

Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro
        355                 360                 365

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

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

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

Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly
            420                 425                 430

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

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

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

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

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

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

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 sapiens

<400> 7
cctgtcctgc ctgcctggaa ctctgagcag gctggagtca tggagtcgat tcccagaatc 60

ccagagtcag ggaggctggg ggcaggggca ggtcactgga caaacagatc aaaggtgaga 120

ccagcgtagg actgcagacc aggccaggcc agctggacgg gcacaccatg aggtaggtgg 180

gcgccacagc ctccctgcag ggtgtggggt gggagcacag gcctgggcct caccgccccct 240

gccctgccca taggctgctg accctcctgg gccttctgtg tggctcggtg gccacccccct 300

taggcccgaa gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc atcccccggc tttccagggg 360

agtatgccaa tgaccaggag cggcgctgga ccctgactgc acccccggc taccgcctgc 420

gcctctactt cacccacttc gacctggagc tctcccacct ctgcgagtac gacttcgtca 480

aggtgccgtc agacgggagg gctggggttt ctcagggtcg gggggtcccc aaggagtagc 540

cagggttcag ggacacctgg gagcaggggc caggcttggc caggagggag atcaggcctg 600

ggtcttgcct tcactccctg tgacacctga ccccacagct gagctcgggg gccaaggtgc 660

tggccacgct gtgcgggcag gagagcacag acacggagcg ggcccctggc aaggacactt 720

tctactcgct gggctccagc ctggacatta ccttccgctc cgactactcc aacgagaagc 780

cgttcacggg gttcgaggcc ttctatgcag ccgagggtga gccaagaggg gtcctgcaac 840

atctcagtct gcgcagctgg ctgtgggggt aactctgtct taggccaggc agccctgcct 900

tcagtttccc caccttccc agggcagggg agaggcctct ggcctgacat catccacaat 960

gcaaagacca aaacagccgt gacctccatt cacatgggct gagtgccaac tctgagccag 1020

ggatctgagg acagcatcgc ctcaagtgac gcagggactg gccgggcgcg gcagctcacg 1080

cctgtaattc cagcactttg ggaggccgag gctggcttga taatttgagg gtcaggagtt 1140

caaggccagc cagggcaaca cggtgaaact ctatctccac taaaactaca aaaattagct 1200

gggcgtggtg gtgcgcacct ggaatcccag ctactaggga ggctgaggca ggagaattgc 1260

ttgaacctgc gaggtggagg ctgcagtgaa cagagattgc accactacac tccacctggg 1320

cgacagacta gactccgtct caaaaaacaa aaaacaaaaa ccacgcaggg ccgagggccc 1380

atttacaagc tgacaaagtg ggccctgcca gcgggagcgc tgcaggatgt ttgattttca 1440

gatcccagtc cctgcagaga ccaactgtgt gacctctggc aagtggctca atttctctgc 1500

tccttagaag ctgctgcaag ggttcagcgc tgtagccccg ccccctgggt ttgattgact 1560

cccctcatta gctgggtgac ctcggccgga cactgaaact cccactggtt taacagaggt 1620

gatgtttgca tctttctccc agcgctgctg ggagcttgca gcgaccctag gcctgtaagg 1680

tgattggccc ggcaccagtc ccgcacccta gacaggacct aggcctcctc tgaggtccac 1740

tctgaggtca tggatctcct gggaggagtc caggctggat cccgcctctt tccctcctga 1800

cggcctgcct ggccctgcct ctcccccaga cattgacgag tgccaggtgg ccccgggaga 1860

ggcgcccacc tgcgaccacc actgccacaa ccacctgggc ggtttctact gctcctgccg 1920

cgcaggctac gtcctgcacc gtaacaagcg cacctgctca ggtgagggag gctgcctggg 1980

ccccaacgca ccctctcctg ggatacccgg ggctcctcag ggccattgct gctctgccca 2040

ggggtgcgga gggcctgggc ctggacactg ggtgcttcta ggccctgctg cctccagctc 2100

cccttctcag ccctgcttcc cctctcagca gccaggctca tcagtgccac cctgccctag 2160

cactgagact aattctaaca tcccactgtg tacctggttc cacctgggct ctgggaaccc 2220

ctcatgtagc cacgggagag tcggggtatc taccctcgtt ccttggactg ggttcctgtt 2280

ccctgcactg ggggacgggc cagtgctctg gggcgtgggc agccccaccc tgtggcgctg 2340

accctgctcc cccgactcgg tttctcctct cggggtctct ccttgcctct ctgatctctc 2400

ttccagagca gagcctctag cctcccctgg agctccggct gcccagcagg tcagaagcca 2460

gagccaggct gctggcctca gctccgggtt gggctgagat gctgtgcccc aactcccatt 2520

cacccaccat ggacccaata ataaacctgg ccccacccca cctgctgccg cgtgtctctg 2580

gggtgggagg gtcgggaggc ggtggggcgc gctcctctct gcctaccctc ctcacagcct 2640

catgaacccc aggtctgtgg gagcctcctc catggggcca cacggtcctt ggcctcaccc 2700

cctgttttga agatggggca ctgaggccgg agaggggtaa ggcctcgctc gagtccaggt 2760

ccccagaggc tgagcccaga gtaatcttga accacccccа ttcagggtct ggcctggagg 2820

agcctgaccc acagaggaga caccctggga gatattcatt gaggggtaat ctggtccccc 2880

gcaaatccag gggtgattcc cactgcccca taggcacagc cacgtggaag aaggcaggca 2940

atgttggggc tcctcacttc ctagaggcct cacaactcaa atgcccccca ctgcagctgg 3000

gggtggggtg gtggtatggg atggggacca agccttcctt gaaggataga gcccagccca 3060

acaccccgcc ccgtggcagc agcatcacgt gttccagcga ggaaggagag caccagactc 3120

agtcatgatc actgttgcct tgaacttcca agaacagccc cagggcaagg gtcaaaacag 3180

gggaaagggg gtgatgagag atccttcttc cggatgttcc tccaggaacc agggggctgg 3240

ctggtcttgg ctgggttcgg gtaggagacc catgatgaat aaacttggga atcactgggg 3300

tggctgtaag ggaatttagg ggagctccga aggggccctt aggctcgagg agatgctcct 3360

ctcttttccc gaattcccag ggacccagga gagtgtccct tcttcctctt cctgtgtgtc 3420

catccacccc cgccccccgc cctggcagag ctggtggaac tcagtgctct agcccctacc 3480

ctggggttgc gactctggct caggacacca ccacgctccc tgggggtgtg agtgagggcc 3540

tgtgcgctcc atcccgagtg ctgcctgttt cagctaaagc ctcaaagcaa gagaaacccc 3600

ctctctaagc ggcccctcag ccatcgggtg ggtcgtttgg tttctgggta ggcctcaggg 3660

gctggccacc tgcagggccc agcccaaccc agggatgcag atgtcccagc cacatccctg 3720

tcccagtttc ctgctcccca aggcatccac cctgctgttg gtgcgagggc tgatagaggg 3780

cacgccaagt cactcccctg cccttccctc cttccagccc tgtgctccgg ccaggtcttc 3840

acccagaggt ctggggagct cagcagccct gaatacccac ggccgtatcc caaactctcc 3900

agttgcactt acagcatcag cctggaggag gggttcagtg tcattctgga ctttgtggag 3960

tccttcgatg tggagacaca ccctgaaacc ctgtgtccct acgactttct caaggtctgg 4020

ctcctgggcc cctcatcttg tcccagatcc tccccttca gcccagctgc acccctact 4080

tcctgcagca tggcccccac cacgttcccg tcaccctcgg tgaccccacc tcttcaggtg 4140

ctctatggag gtcaaggctg gggcttcgag tacaagtgtg ggaggcagag tggggagggg 4200

caccccaatc catggcctgg gttggcctca ttggctgtcc ctgaaatgct gaggaggtgg 4260

gttacttccc tccgcccagg ccagacccag gcagctgctc cccagctttc atgagcttct 4320

ttctcagatt caaacagaca gagaagaaca tggcccattc tgtgggaaga cattgcccca 4380

caggattgaa acaaaaagca acacggtgac catcaccttt gtcacagatg aatcaggaga 4440

ccacacaggc tggaagatcc actacacgag cacagtgagc aagtgggctc agatccttgg 4500

tggaagcgca gagctgcctc tctctggagt gcaaggagct gtagagtgta gggctcttct 4560

gggcaggact aggaagggac accaggttta gtggtgctga ggtctgaggc agcagcttct 4620

aaggggaagc acccgtgccc tcctcagcag cacccagcat cttcaccact cattcttcaa 4680

ccacccattc acccatcact catcttttac ccacccaccc tttgccactc atccttctgt 4740

ccctcatcct tccaaccatt catcaatcac ccacccatcc atcctttgcc acacaaccat 4800

ccacccattc ttctacctac ccatcctatc catccatcct tctatcagca tccttctacc 4860

acccatcctt cgttcggtca tccatcatca tccatccatc 4900

<210> 8
<211> 136
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala
130 135

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Arg Thr Cys Ser
180

<210> 10
<211> 293
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Lys Ile His Tyr
290

<210> 11
<211> 41
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys
1 5 10 15

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

Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys
35 40

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

<400> 12
Ile Tyr Gly Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val
1 5 10 15

Leu Ile Leu Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn
20 25 30

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala

```
        35                  40                  45

Ser Ala Leu Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His
    50                  55                  60

Tyr Thr Gln Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr
65                  70                  75                  80

His Asp Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn
                85                  90                  95

Lys Val Val Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys
            100                 105                 110

Glu Ala Glu Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly
        115                 120                 125

Trp Gly Leu Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val
    130                 135                 140

Asp Ile Pro Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys
145                 150                 155                 160

Pro Pro Tyr Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly
                165                 170                 175

Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala
            180                 185                 190

Leu Val Phe Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile
        195                 200                 205

Val Ser Trp Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val
    210                 215                 220

Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser
225                 230                 235                 240

Asp Phe
```

<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 13

```
Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ala Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu
1               5                   10                  15
```

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

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

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

<220>
<223> Sintético

<400> 15
Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp
1 5 10 15

Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser
20 25 30

Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln
35 40

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

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

<210> 17
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 17
Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr
1 5 10 15

Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe
20 25

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

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

<210> 19
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

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

Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val
20 25

<210> 20
<211> 960
<212> ADN
<213> Homo sapiens

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

<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
Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly Lys Asp
35                  40                  45                  50

ggg cgt gat ggc acc aag gga gaa aag ggg gaa cca ggc caa ggg ctc        248
Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln Gly Leu
                55                  60                  65

aga ggc tta cag ggc ccc cct gga aag ttg ggg cct cca gga aat cca        296
Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly Asn Pro
            70                  75                  80

ggg cct tct ggg tca cca gga cca aag ggc caa aaa gga gac cct gga        344
Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp Pro Gly
        85                  90                  95

aaa agt ccg gat ggt gat agt agc ctg gct gcc tca gaa aga aaa gct        392
Lys Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg Lys Ala
    100                 105                 110

ctg caa aca gaa atg gca cgt atc aaa aag tgg ctc acc ttc tct ctg        440
Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe Ser Leu
115                 120                 125                 130

ggc aaa caa gtt ggg aac aag ttc ttc ctg acc aat ggt gaa ata atg        488
Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu Ile Met
                135                 140                 145

acc ttt gaa aaa gtg aag gcc ttg tgt gtc aag ttc cag gcc tct gtg        536
Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala Ser Val
            150                 155                 160

gcc acc ccc agg aat gct gca gag aat gga gcc att cag aat ctc atc        584
Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn Leu Ile
        165                 170                 175

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

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

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

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

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

ttttactgca acccacaggc ccacagtatg cttgaaaaga taaattatat caatttcctc      887

atatccagta ttgttccttt tgtgggcaat cactaaaaat gatcactaac agcaccaaca      947

aagcaataat agt                                                        960
```

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

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Glu Gly Glu Pro Asn Asn Ala Gly Ser Asp Glu Asp Cys Val Leu

    210                 215                 220

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

Leu Ala Val Cys Glu Phe Pro Ile
                245
```

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1) .. (1)
<223> En donde X en posición 1 representa hidroxiprolina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (4)..(4)
<223> En donde X en posición 4 representa un residuo hidrófobo

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

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1) .. (1)
<223> En donde X representa hidroxiprolina

<400> 23
Xaa Gly Lys Leu Gly
1 5

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<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

<210> 25
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

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

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

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

<210> 26
<211> 53
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

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

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

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

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (41)..(41)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<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

Asp Xaa Gly Lys Ser
50

<210> 27
<211> 33
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (3)..(33)
<223> En donde X en las posiciones 3, 6, 12, 18, 21, 30, 33 representa hidroxiprolina

<400> 27
Gly Ala Xaa Gly Ser Xaa Gly Glu Lys Gly Ala Xaa Gly Pro Gln Gly
1 5 10 15

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

Xaa

<210> 28
<211> 45
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 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

<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

<210> 29
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 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

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

<400> 30

atgaggctgc tgaccctcct gggccttctg tgtggctcgg tggccacccc cttgggcccg 60

aagtggcctg aacctgtgtt cgggcgcctg gcatcccccg gctttccagg ggagtatgcc 120

aatgaccagg agcggcgctg gaccctgact gcacccccgg gctaccgcct gcgcctctac 180

ttcacccact tcgacctgga gctctcccac ctctgcgagt acgacttcgt caagctgagc 240

tcgggggcca aggtgctggc cacgctgtgc gggcaggaga gcacagacac ggagcgggcc 300

cctggcaagg acactttcta ctcgctgggc tccagcctgg acattacctt ccgctccgac 360

tactccaacg agaagccgtt cacggggttc gaggccttct atgcagccga ggacattgac 420

gagtgccagg tggccccggg agaggcgccc acctgcgacc accactgcca caaccacctg 480

ggcggtttct actgctcctg ccgcgcaggc tacgtcctgc accgtaacaa gcgcacctgc 540
tcagccctgt gctccggcc 559

<210> 31
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 31
cgggcacacc atgaggctgc tgaccctcct gggc 34

<210> 32
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 32
gacattacct tccgctccga ctccaacgag aag 33

<210> 33
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 33
agcagccctg aatacccacg gccgtatccc aaa 33

<210> 34
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 34
cgggatccat gaggctgctg accctc 26

<210> 35
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 35
ggaattccta ggctgcata 19

<210> 36
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 36
ggaattccta cagggcgct 19

<210> 37
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 37
ggaattccta gtagtggat 19

<210> 38
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 38
tgcggccgct gtaggtgctg tcttt 25

<210> 39
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 39
ggaattcact cgttattctc gga 23

<210> 40
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 40
tccgagaata acgagtg 17

<210> 41
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 41
cattgaaagc tttggggtag aagttgttc 29

<210> 42
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 42
cgcggccgca gctgctcaga gtgtaga 27

<210> 43
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 43
cggtaagctt cactggctca gggaaata 28

<210> 44
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 44
aagaagcttg ccgccaccat ggattggctg tggaact 37

<210> 45
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 45
cgggatcctc aaactttctt gtccaccttg g 31

<210> 46
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 46
aagaaagctt gccgccacca tgttctcact agctct 36

<210> 47
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 47
cgggatcctt ctccctctaa cactct 26

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

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

<210> 49
<211> 4960
<212> ADN
<213> Homo Sapiens

<400> 49
ccggacgtgg tggcgcatgc ctgtaatccc agctactcgg gaggctgagg caggagaatt 60

gctcgaaccc cggaggcaga ggtttggtgg ctcacacctg taatcccagc actttgcgag 120

gctgaggcag gtgcatcgct ttggctcagg agttcaagac cagcctgggc aacacaggga 180

gacccccatc tctacaaaaa acaaaaacaa atataaaggg gataaaaaaa aaaaaaagac 240

aagacatgaa tccatgagga cagagtgtgg aagaggaagc agcagcctca aagttctgga 300

agctggaaga acagataaac aggtgtgaaa taactgcctg gaaagcaact tctttttttt 360

ttttttttt tttgaggtgg agtctcactc tgtcgtccag gctggagtgc agtggtgcga 420

tctcggatca ctgcaacctc cgcctcccag gctcaagcaa ttctcctgcc tcagcctccc 480

gagtagctgg gattataagt gcgcgctgcc acacctggat gatttttgta tttttagtag 540

agatgggatt tcaccatgtt ggtcaggctg gtctcaaact cccaacctcg tgatccaccc 600

accttggcct cccaaagtgc tgggattaca ggtataagcc accgagccca gccaaaagcg 660

acttctaagc ctgcaaggga atcgggaatt ggtggcacca ggtccttctg acagggttta 720

agaaattagc cagcctgagg ctgggcacgg tggctcacac ctgtaatccc agcactttgg 780

gaggctaagg caggtggatc acctgagggc aggagttcaa gaccagcctg accaacatgg 840

agaaacccca tccctaccaa aaataaaaaa ttagccaggt gtggtggtgc tcgcctgtaa 900

tcccagctac ttgggaggct gaggtgggag gattgcttga acacaggaag tagaggctgc 960

agtgagctat gattgcagca ctgcactgaa gccggggcaa cagaacaaga tccaaaaaaa 1020

agggaggggt gaggggcaga gccaggattt gtttccaggc tgttgttacc taggtccgac 1080

tcctggctcc cagagcagcc tgtcctgcct gcctggaact ctgagcaggc tggagtcatg 1140

gagtcgattc ccagaatccc agagtcaggg aggctggggg caggggcagg tcactggaca 1200

aacagatcaa aggtgagacc agcgtagggc tgcagaccag gccaggccag ctggacgggc 1260

acaccatgag gtaggtgggc gcccacagcc tccctgcagg gtgtggggtg ggagcacagg 1320

cctgggccct caccgccccc gccctgccca taggctgctg accctcctgg gccttctgtg 1380

tggctcggtg gccacccccc tgggcccgaa gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc 1440

atcccccggc tttccagggg agtatgccaa tgaccaggag cggcgctgga ccctgactgc 1500

acccccggc taccgcctgc gcctctactt cacccacttc gacctggagc tctcccacct 1560

ctgcgagtac gacttcgtca aggtgccgtc aggacgggag ggctggggtt tctcagggtc 1620

gggggtccc caaggagtag ccagggttca gggacacctg ggagcagggg ccaggcttgg 1680

ccaggaggga gatcaggcct gggtcttgcc ttcactccct gtgacacctg accccacagc 1740

tgagctcggg ggccaaggtg ctggccacgc tgtgcgggca ggagagcaca gacacggagc 1800

gggcccctgg caaggacact ttctactcgc tgggctccag cctggacatt accttccgct 1860

ccgactactc caacgagaag ccgttcacgg ggttcgaggc cttctatgca gccgagggtg 1920

agccaagagg ggtcctgcaa catctcagtc tgcgcagctg gctgtggggg taactctgtc 1980

ttaggccagg cagccctgcc ttcagtttcc ccacctttcc cagggcaggg gagaggcctc 2040

tggcctgaca tcatccacaa tgcaaagacc aaaacagccg tgacctccat tcacatgggc 2100

tgagtgccaa ctctgagcca gggatctgag gacagcatcg cctcaagtga cgcagggact 2160

ggccgggcgc agcagctcac gcctgtaatt ccagcacttt gggaggccga ggctggctga 2220

tcatttgagg tcaggagttc aaggccagcc agggcaacac ggtgaaactc tatctccact 2280

aaaactacaa aaattagctg ggcgtggtgg tgcgcacctg gaatcccagc tactagggag 2340

gctgaggcag gagaattgct tgaacctgcg aggtggaggc tgcagtgaac agagattgca 2400

ccactacact ccagcctggg cgacagagct agactccgtc tcaaaaaaca aaaaacaaaa 2460

acgacgcagg ggccgagggc cccatttaca gctgacaaag tggggccctg ccagcgggag 2520

cgctgccagg atgtttgatt tcagatccca gtccctgcag agaccaactg tgtgacctct 2580

ggcaagtggc tcaatttctc tgctccttag gaagctgctg caagggttca gcgctgtagc 2640

cccgccccct gggtttgatt gactcccctc attagctggg tgacctcggg ccggacactg 2700

aaactcccac tggtttaaca gaggtgatgt ttgcatcttt ctcccagcgc tgctgggagc 2760

ttgcagcgac cctaggcctg taaggtgatt ggcccggcac cagtcccgca ccctagacag 2820

gacgaggcct cctctgaggt ccactctgag gtcatggatc tcctgggagg agtccaggct 2880

ggatcccgcc tctttccctc ctgacggcct gcctggccct gcctctcccc cagacattga 2940

cgagtgccag gtggccccgg gagaggcgcc cacctgcgac caccactgcc acaaccacct 3000

gggcggtttc tactgctcct gccgcgcagg ctacgtcctg caccgtaaca agcgcacctg 3060

ctcagccctg tgctccggcc aggtcttcac ccagaggtct ggggagctca gcagccctga 3120

atacccacgg ccgtatccca aactctccag ttgcacttac agcatcagcc tggaggaggg 3180

gttcagtgtc attctggact ttgtggagtc cttcgatgtg gagacacacc ctgaaaccct 3240

gtgtccctac gactttctca agattcaaac agacagagaa gaacatggcc cattctgtgg 3300

gaagacattg ccccacagga ttgaaacaaa aagcaacacg gtgaccatca cctttgtcac 3360

agatgaatca ggagaccaca caggctggaa gatccactac acgagcacag cgcacgcttg 3420

cccttatccg atggcgccac ctaatggcca cgtttcacct gtgcaagcca aatacatcct 3480

gaaagacagc ttctccatct tttgcgagac tggctatgag cttctgcaag gtcacttgcc 3540

cctgaaatcc tttactgcag tttgtcagaa agatggatct tgggaccggc caatgcccgc 3600

gtgcagcatt gttgactgtg gccctcctga tgatctaccc agtggccgag tggagtacat 3660

cacaggtcct ggagtgacca cctacaaagc tgtgattcag tacagctgtg aagagacctt 3720

ctacacaatg aaagtgaatg atggtaaata tgtgtgtgag gctgatggat tctggacgag 3780

ctccaaagga gaaaaatcac tcccagtctg tgagcctgtt tgtggactat cagcccgcac 3840

aacaggaggg cgtatatatg gagggcaaaa ggcaaaacct ggtgattttc cttggcaagt 3900

cctgatatta ggtggaacca cagcagcagg tgcactttta tatgacaact gggtcctaac 3960

agctgctcat gccgtctatg agcaaaaaca tgatgcatcc gccctggaca ttcgaatggg 4020

caccctgaaa agactatcac ctcattatac acaagcctgg tctgaagctg tttttataca 4080

tgaaggttat actcatgatg ctggctttga caatgacata gcactgatta aattgaataa 4140

caaagttgta atcaatagca acatcacgcc tatttgtctg ccaagaaaag aagctgaatc 4200

ctttatgagg acagatgaca ttggaactgc atctggatgg ggattaaccc aaaggggttt 4260

tcttgctaga aatctaatgt atgtcgacat accgattgtt gaccatcaaa aatgtactgc 4320

tgcatatgaa aagccaccct atccaagggg aagtgtaact gctaacatgc tttgtgctgg 4380

cttagaaagt gggggcaagg acagctgcag aggtgacagc ggaggggcac tggtgtttct 4440

agatagtgaa acagagaggt ggtttgtggg aggaatagtg tcctggggtt ccatgaattg 4500

```
tggggaagca ggtcagtatg gagtctacac aaaagttatt aactatattc cctggatcga     4560

gaacataatt agtgattttt aacttgcgtg tctgcagtca aggattcttc atttttagaa     4620

atgcctgtga agaccttggc agcgacgtgg ctcgagaagc attcatcatt actgtggaca     4680

tggcagttgt tgctccaccc aaaaaaacag actccaggtg aggctgctgt catttctcca     4740

cttgccagtt taattccagc cttacccatt gactcaaggg gacataaacc acgagagtga     4800

cagtcatctt tgcccaccca gtgtaatgtc actgctcaaa ttacatttca ttaccttaaa     4860

aagccagtct cttttcatac tggctgttgg catttctgta aactgcctgt ccatgctctt     4920

tgtttttaaa cttgttctta ttgaaaaaaa aaaaaaaaaa                           4960
```

<210> 50
<211> 2090
<212> ADN
<213> Murina

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

<400> 50

```
ggcgctggac tgcagagcta tggtggcaca cc atg agg cta ctc atc ttc ctg         53
                                    Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu
                                    1               5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

tgt gac cat tat tgc cac aac tac ttg ggc ggc tac tat tgc tcc tgc        533
Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys
            155                 160                 165

aga gcg ggc tac att ctc cac cag aac aag cac acg tgc tca gcc ctt        581
Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu
        170                 175                 180

tgt tca ggc cag gtg ttc aca gga aga tct ggg tat ctc agt agc cct        629
Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly Arg Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Pro
    185                 190                 195

gag tac ccg cag cca tac ccc aag ctc tcc agc tgc acc tac agc atc        677
Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile
200                 205                 210                 215

cgc ctg gag gac ggc ttc agt gtc atc ctg gac ttc gtg gag tcc ttc        725
Arg Leu Glu Asp Gly Phe Ser Val Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe
                220                 225                 230

gat gtg gag acg cac cct gaa gcc cag tgc ccc tat gac tcc ctc aag        773
Asp Val Glu Thr His Pro Glu Ala Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys
            235                 240                 245

att caa aca gac aag ggg gaa cac ggc cca ttt tgt ggg aag acg ctg        821
Ile Gln Thr Asp Lys Gly Glu His Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu
        250                 255                 260

cct ccc agg att gaa act gac agc cac aag gtg acc atc acc ttt gcc        869
Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser His Lys Val Thr Ile Thr Phe Ala
    265                 270                 275

act gac gag tcg ggg aac cac aca ggc tgg aag ata cac tac aca agc        917
Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser
280                 285                 290                 295

aca gca cgg ccc tgc cct gat cca acg gcg cca cct aat ggc agc att        965
Thr Ala Arg Pro Cys Pro Asp Pro Thr Ala Pro Pro Asn Gly Ser Ile
                300                 305                 310

tca cct gtg caa gcc acg tat gtc ctg aag gac agg ttt tct gtc ttc       1013
Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe
            315                 320                 325

tgc aag aca ggc ttc gag ctt ctg caa ggt tct gtc ccc ctg aaa tca       1061
Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser
        330                 335                 340

ttc act gct gtc tgt cag aaa gat gga tct tgg gac cgg ccg atg cca       1109
Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro
    345                 350                 355

gag tgc agc att att gat tgt ggc cct ccc gat gac cta ccc aat ggc       1157
Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly
360                 365                 370                 375

cat gtg gac tat atc aca ggc cct caa gtg act acc tac aaa gct gtg       1205
His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Gln Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val
```

```
                380                 385                 390

att cag tac agc tgt gaa gag act ttc tac aca atg agc agc aat ggt       1253
Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly
            395                 400                 405

aaa tat gtg tgt gag gct gat gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa       1301
Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu
        410                 415                 420

aaa ctc ccc ccg gtt tgt gag cct gtt tgt ggg ctg tcc aca cac act       1349
Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr
    425                 430                 435

ata gga gga cgc ata gtt gga ggg cag cct gca aag cct ggt gac ttt       1397
Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe
440                 445                 450                 455

cct tgg caa gtc ttg ttg ctg ggt caa act aca gca gca gca ggt gca       1445
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Gln Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala
                460                 465                 470

ctt ata cat gac aat tgg gtc cta aca gcc gct cat gct gta tat gag       1493
Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu
            475                 480                 485

aaa aga atg gca gcg tcc tcc ctg aac atc cga atg ggc atc ctc aaa       1541
Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu Asn Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys
        490                 495                 500

agg ctc tca cct cat tac act caa gcc tgg ccc gag gaa atc ttt ata       1589
Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile
    505                 510                 515

cat gaa ggc tac act cac ggt gct ggt ttt gac aat gat ata gca ttg       1637
His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu
520                 525                 530                 535

att aaa ctc aag aac aaa gtc aca atc aac gga agc atc atg cct gtt       1685
Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile Asn Gly Ser Ile Met Pro Val
                540                 545                 550

tgc cta ccg cga aaa gaa gct gca tcc tta atg aga aca gac ttc act       1733
Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr
            555                 560                 565

gga act gtg gct ggc tgg ggg tta acc cag aag ggg ctt ctt gct aga       1781
Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg
        570                 575                 580

aac cta atg ttt gtg gac ata cca att gct gac cac caa aaa tgt acc       1829
Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile Ala Asp His Gln Lys Cys Thr
    585                 590                 595

acc gtg tat gaa aag ctc tat cca gga gta aga gta agc gct aac atg       1877
Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro Gly Val Arg Val Ser Ala Asn Met
600                 605                 610                 615

ctc tgt gct ggc tta gag act ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac       1925
Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp
                620                 625                 630

agt ggg ggg gca tta gtg ttt cta gat aat gag aca cag cga tgg ttt       1973
```

```
Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe
            635                 640                 645

gtg gga gga ata gtt tcc tgg ggt tcc att aat tgt ggg gcg gca ggc       2021
Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly
        650                 655                 660

cag tat ggg gtc tac aca aaa gtc atc aac tat att ccc tgg aat gag       2069
Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu
    665                 670                 675

aac ata ata agt aat ttc taa                                          2090
Asn Ile Ile Ser Asn Phe
680                 685
```

<210> 51
<211> 685
<212> PRT
<213> Murina

<400> 51

```
Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr
1               5                   10                  15

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

Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp Thr
        35                  40                  45

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

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

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

Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro Ser
            100                 105                 110

Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
        115                 120                 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Val
    130                 135                 140

Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu
145                 150                 155                 160
```

```
Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn
                165                 170                 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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> Murina

<400> 52

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

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

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

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

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

Asp Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro
                85                  90                  95

Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
            100                 105                 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg
        115                 120                 125

Val Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr
    130                 135                 140

Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln
145                 150                 155                 160

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

Arg Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Arg Leu Glu Asp Gly Phe Ser Val
        195                 200                 205
```

```
Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Ala
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly
            420                 425                 430

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

Gln Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu
```

```
    450                 455                 460

Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu
465                 470                 475                 480

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

Ala Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala
            500                 505                 510

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

Ile Asn Gly Ser Ile Met Pro Val Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala
    530                 535                 540

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

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

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

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

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

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

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

Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu Asn Ile Ile Ser Asn Phe
            660                 665                 670
```

<210> 53
<211> 2091
<212> ADN
<213> Rata

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

<400> 53

```
tggcacaca atg agg cta ctg atc gtc ctg ggt ctg ctt tgg agt ttg gtg       51
          Met Arg Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val
          1               5                   10

gcc aca ctt ttg ggc tcc aag tgg cct gag cct gta ttc ggg cgc ctg         99
Ala Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu
15                  20                  25                  30

gtg tcc ctg gcc ttc cca gag aag tat ggc aac cat cag gat cga tcc        147
Val Ser Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser
                35                  40                  45

tgg acg ctg act gca ccc cct ggc ttc cgc ctg cgc ctc tac ttc acc        195
Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Phe Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr
            50                  55                  60

cac ttc aac ctg gaa ctc tct tac cgc tgc gag tat gac ttt gtc aag        243
His Phe Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys
        65                  70                  75

ttg acc tca ggg acc aag gtg cta gcc acg ctg tgt ggg cag gag agt        291
Leu Thr Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser
    80                  85                  90

aca gat act gag cgg gca cct ggc aat gac acc ttc tac tca ctg ggt        339
Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly
95                  100                 105                 110

ccc agc cta aag gtc acc ttc cac tcc gac tac tcc aat gag aag cca        387
Pro Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro
                115                 120                 125

ttc aca gga ttt gag gcc ttc tat gca gcg gag gat gtg gat gaa tgc        435
Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys
            130                 135                 140

aga aca tcc ctg gga gac tca gtc cct tgt gac cat tat tgc cac aac        483
Arg Thr Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn
        145                 150                 155

tac ctg ggc ggc tac tac tgc tcc tgc cga gtg ggc tac att ctg cac        531
Tyr Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His
    160                 165                 170

cag aac aag cat acc tgc tca gcc ctt tgt tca ggc cag gtg ttc act        579
Gln Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr
175                 180                 185                 190

ggg agg tct ggc ttt ctc agt agc cct gag tac cca cag cca tac ccc        627
Gly Arg Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro
                195                 200                 205

aaa ctc tcc agc tgc gcc tac aac atc cgc ctg gag gaa ggc ttc agt        675
Lys Leu Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser
            210                 215                 220

atc acc ctg gac ttc gtg gag tcc ttt gat gtg gag atg cac cct gaa        723
Ile Thr Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu
        225                 230                 235
```

```
gcc cag tgc ccc tac gac tcc ctc aag att caa aca gac aag agg gaa        771
Ala Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu
    240                 245                 250

tac ggc ccg ttt tgt ggg aag acg ctg ccc ccc agg att gaa act gac        819
Tyr Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp
255                 260                 265                 270

agc aac aag gtg acc att acc ttt acc acc gac gag tca ggg aac cac        867
Ser Asn Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Gly Asn His
                275                 280                 285

aca ggc tgg aag ata cac tac aca agc aca gca cag ccc tgc cct gat        915
Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp
            290                 295                 300

cca acg gcg cca cct aat ggt cac att tca cct gtg caa gcc acg tat        963
Pro Thr Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr
        305                 310                 315

gtc ctg aag gac agc ttt tct gtc ttc tgc aag act ggc ttc gag ctt       1011
Val Leu Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu
    320                 325                 330

ctg caa ggt tct gtc ccc ctg aag tca ttc act gct gtc tgt cag aaa       1059
Leu Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys
335                 340                 345                 350

gat gga tct tgg gac cgg ccg ata cca gag tgc agc att att gac tgt       1107
Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys
                355                 360                 365

ggc cct ccc gat gac cta ccc aat ggc cac gtg gac tat atc aca ggc       1155
Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly
            370                 375                 380

cct gaa gtg acc acc tac aaa gct gtg att cag tac agc tgt gaa gag       1203
Pro Glu Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu
        385                 390                 395

act ttc tac aca atg agc agc aat ggt aaa tat gtg tgt gag gct gat       1251
Thr Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp
    400                 405                 410

gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa aaa tcc ctc ccg gtt tgc aag       1299
Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Lys
415                 420                 425                 430

cct gtc tgt gga ctg tcc aca cac act tca gga ggc cgt ata att gga       1347
Pro Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly
                435                 440                 445

gga cag cct gca aag cct ggt gac ttt cct tgg caa gtc ttg tta ctg       1395
Gly Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu
            450                 455                 460

ggt gaa act aca gca gca ggt gct ctt ata cat gac gac tgg gtc cta       1443
Gly Glu Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu
        465                 470                 475

aca gcg gct cat gct gta tat ggg aaa aca gag gcg atg tcc tcc ctg       1491
Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu
    480                 485                 490
```

```
gac atc cgc atg ggc atc ctc aaa agg ctc tcc ctc att tac act caa       1539
Asp Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln
495                 500                 505                 510

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

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

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

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

<400> 54

```
Met Arg Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr
1               5                  10                  15
```

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

Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser Trp Thr
        35                  40                  45

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

Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Thr
65                  70                  75                  80

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

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

Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
        115                 120                 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Thr
    130                 135                 140

Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu
145                 150                 155                 160

Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn
                165                 170                 175

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

Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu
        195                 200                 205

Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser Ile Thr
    210                 215                 220

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu Ala Gln
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 55
<211> 670
<212> PRT
<213> Rata

<400> 55

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

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

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

Phe Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
    50                  55                  60
```

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

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

Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
            100                 105                 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg
        115                 120                 125

Thr Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr
    130                 135                 140

Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His Gln
145                 150                 155                 160

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

Arg Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser Ile
        195                 200                 205

Thr Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu Ala
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

Leu Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu
```

305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly Gly
420 425 430

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

Glu Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu Thr
450 455 460

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

Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln Ala
485 490 495

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

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

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

Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr
545 550 555 560

```
Gln Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile
                565                 570                 575

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

Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly
        595                 600                 605

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

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

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

Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe
            660                 665                 670
```

<210> 56
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Homo Sapiens

<400> 56
atgaggctgc tgaccctcct gggccttc 28

<210> 57
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Homo Sapiens

<400> 57
gtgcccctcc tgcgtcacct ctg 23

<210> 58
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Homo Sapiens

<400> 58
cagaggtgac gcaggagggg cac 23

<210> 59
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Homo Sapiens

<400> 59
ttaaaatcac taattatgtt ctcgatc 27

<210> 60
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Murina

<400> 60
atgaggctac tcatcttcct gg 22

<210> 61
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Murina

<400> 61
ctgcagaggt gacgcagggg ggg 23

<210> 62
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Murina

<400> 62
ccccccctgc gtcacctctg cag 23

<210> 63
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Murina

<400> 63
ttagaaatta cttattatgt tctcaatcc 29

<210> 64
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Rata

<400> 64
gaggtgacgc aggaggggca ttagtgttt 29

<210> 65
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Rata

<400> 65
ctagaaacac taatgcccct cctgcgtcac ctctgca 37

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal contra MASP-2 o un fragmento del mismo que inhibe la activación de la vía de complemento de la lectina dependiente de MASP-2 para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), en donde dicho anticuerpo contra MASP-2 o fragmento del mismo se une específicamente a una parte de la SEQ ID NO: 6 e inhibe de manera selectiva la activación de la vía de complemento de la lectina dependiente de MASP-2 mientras que deja intacta la vía de activación de complemento clásica dependiente de C1q.

2. Un anticuerpo contra MASP-2 o un fragmento del mismo para su uso según la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo aumenta la supervivencia de los glóbulos rojos en el sujeto.

3. Un anticuerpo contra MASP-2 o un fragmento del mismo para su uso según la reivindicación 1, en donde dicho sujeto se ha sometido previamente o se está sometiendo en la actualidad, a tratamiento con un inhibidor del complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína C5 de complemento.

4. Un anticuerpo contra MASP-2 o un fragmento del mismo para su uso según la reivindicación 1, en donde dicho sujeto muestra uno o más síntomas seleccionados entre el grupo que consiste en (i) niveles por debajo de lo normal de hemoglobina, (ii) niveles por debajo de lo normal de plaquetas; (iii) niveles por encima de lo normal de reticulocitos y (iv) niveles por encima de lo normal de bilirrubina.

5. Un anticuerpo contra MASP-2 o un fragmento del mismo para su uso según la reivindicación 3, en donde el inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína C5 de complemento, es un anticuerpo anti-C5 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

6. Un anticuerpo contra MASP-2 o un fragmento del mismo para su uso según la reivindicación 5, en donde el anticuerpo anti-C5 o el fragmento de unión a antígeno del mismo es eculizumab.

7. Un anticuerpo contra MASP-2 o un fragmento del mismo para su uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo es un anticuerpo recombinante.

8. Un anticuerpo contra MASP-2 o un fragmento del mismo para su uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo tiene una función efectora reducida.

9. Un anticuerpo contra MASP-2 o un fragmento del mismo para su uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo es un anticuerpo quimérico.

10. Un anticuerpo contra MASP-2 o un fragmento del mismo para su uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo está humanizado.

11. Un anticuerpo contra MASP-2 o un fragmento del mismo para su uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo es humano.

12. Una composición farmacéutica adecuada para inhibir la activación de la vía de complemento de la lectina dependiente de MASP-2 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal inhibidor de MASP-2 o un fragmento del mismo y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde dicho anticuerpo contra MASP-2 o fragmento del mismo se une específicamente a una parte de la SEQ ID NO: 6 e inhibe de manera selectiva la activación de la vía de complemento de la lectina dependiente de MASP-2 mientras que deja intacta la vía de activación de complemento clásica dependiente de C1q.

13. Una composición para su uso según la reivindicación 12, en donde la composición se formula para suministro sistémico.

14. Una composición para su uso según la reivindicación 12, en donde la composición se formula para suministro subcutáneo.

15. Una composición para su uso según la reivindicación 12, en donde la composición comprende además un inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína C5 de complemento, tal como un anticuerpo anti-C5 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

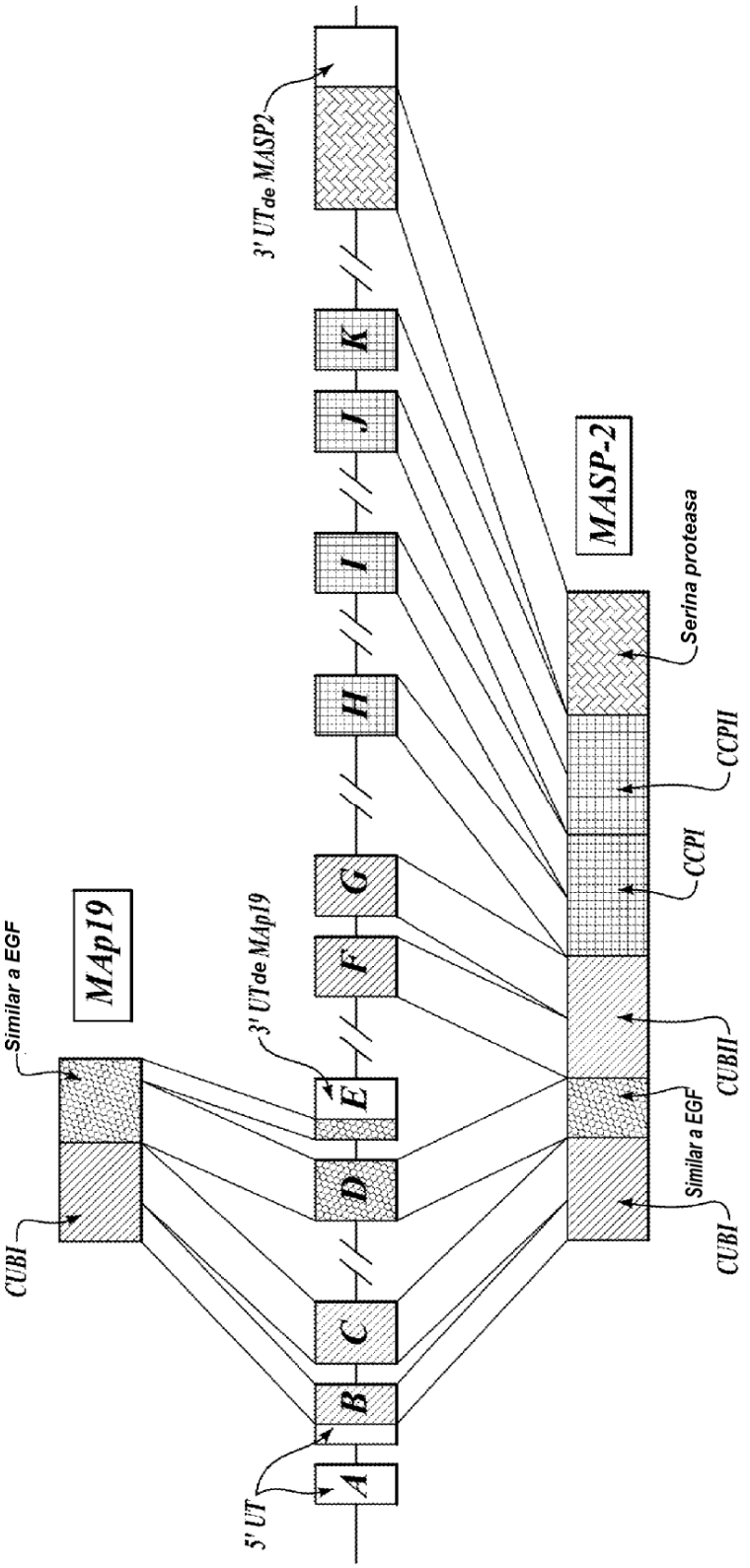
3' UT de MASP2
K
J
I
H
G
F
E
D
C
B
A
5' UT
3' UT de MAp19
MAp19
Similar a EGF
CUBI
MASP-2
Serina proteasa
CCPII
CCPI
CUBII
Similar a EGF
CUBI

Fig.1.

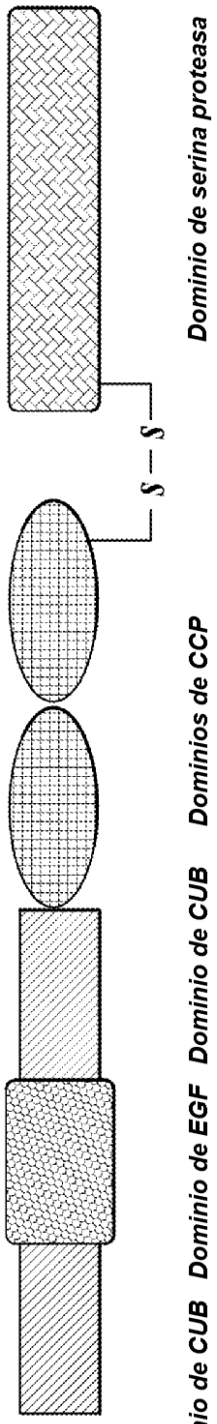
Clr/Cls/MASP-1/MASP-2/MASP-3
S — S
Dominio de CUB Dominio de EGF Dominio de CUB Dominios de CCP
Dominio de serina proteasa

Fig.2A.

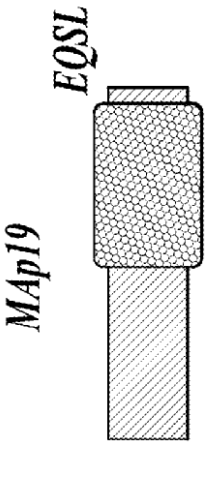
MAp19
EQSL
Dominio de CUB Dominio de EGF

Fig.2B.

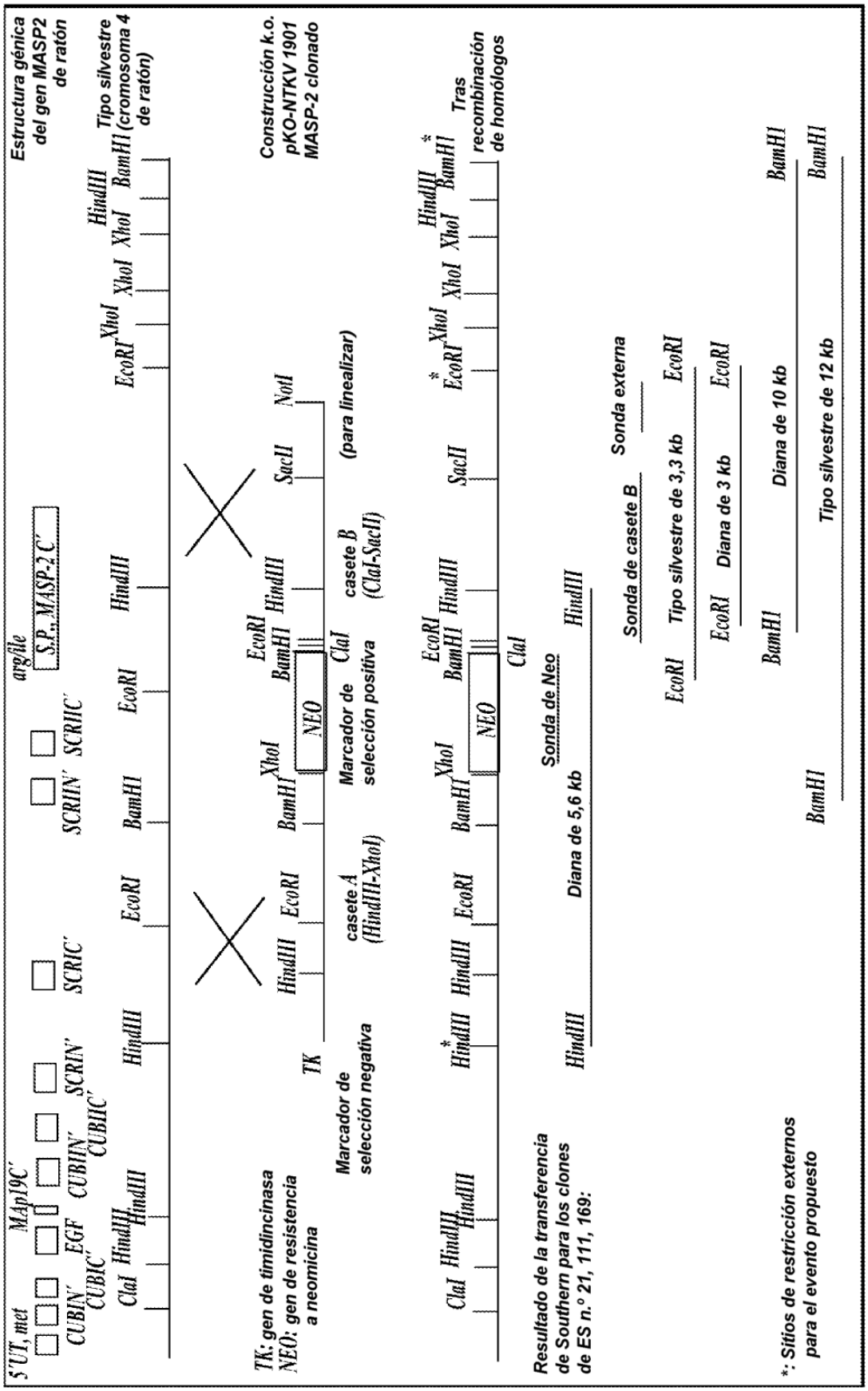
Estructura génica del gen MASP2 de ratón
Tipo silvestre (cromosoma 4 de ratón)
Construcción k.o. pKO-NTKV 1901 MASP-2 clonado
Tras recombinación de homólogos
TK: gen de timidincinasa
NEO: gen de resistencia a neomicina
Marcador de selección negativa
casete A (HindIII-XhoI)
Marcador de selección positiva
casete B (ClaI-SacII)
(para linealizar)
Resultado de la transferencia de Southern para los clones de ES n.º 21, 111, 169:
Diana de 5,6 kb
Sonda de Neo
Sonda de casete B
Sonda externa
Tipo silvestre de 3,3 kb
Diana de 3 kb
Diana de 10 kb
Tipo silvestre de 12 kb
*: Sitios de restricción externos para el evento propuesto

Fig.3.

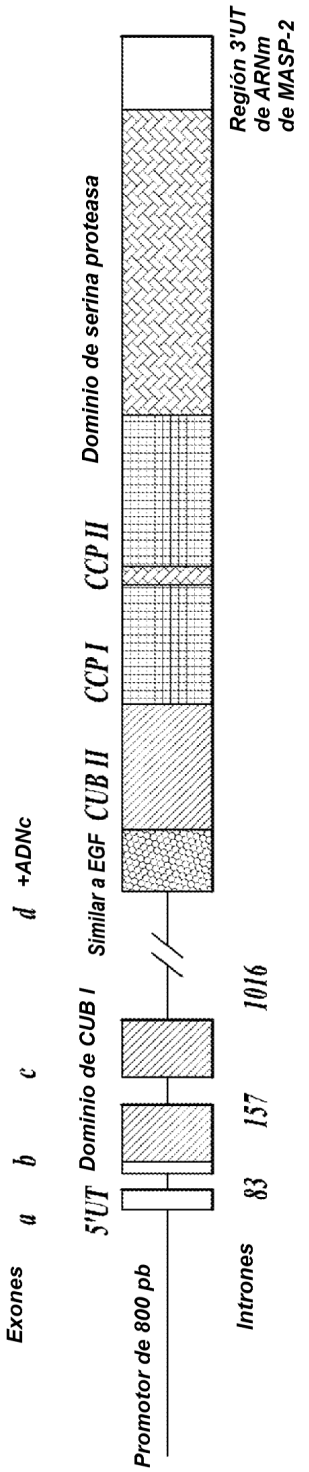
Exones
a
b
c
d
+ADNc
5'UT
Dominio de CUB I
Similar a EGF
CUB II
CCP I
CCP II
Dominio de serina proteasa
Región 3'UT de ARNm de MASP-2
Promotor de 800 pb
Intrones
83
157
1016

Fig.4.

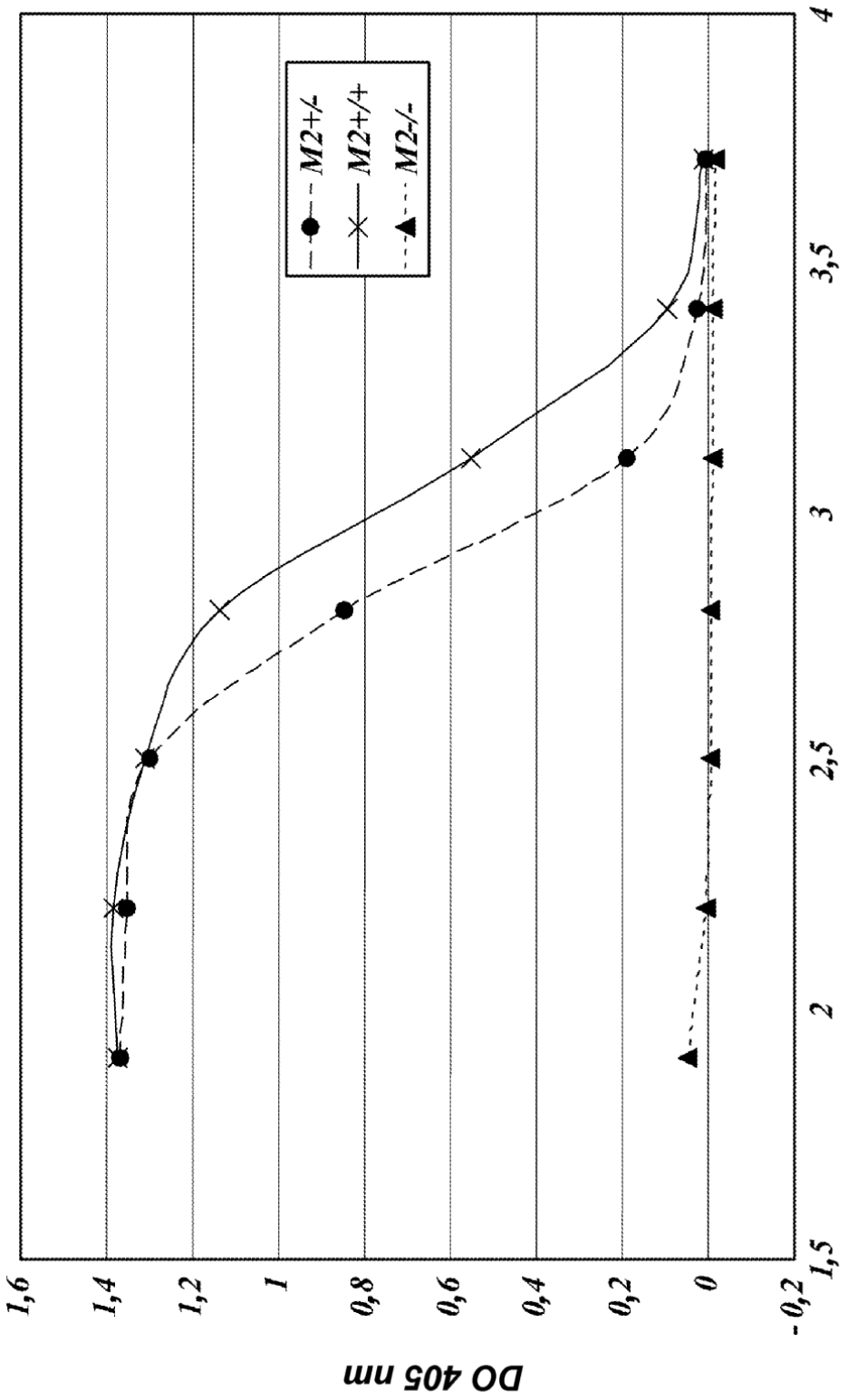
M2+/-
M2+/+
M2-/-
DO 405 nm
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
- 0,2
1,5
2
2,5
3
3,5
4
Log de diluciones de suero

Fig.5A.

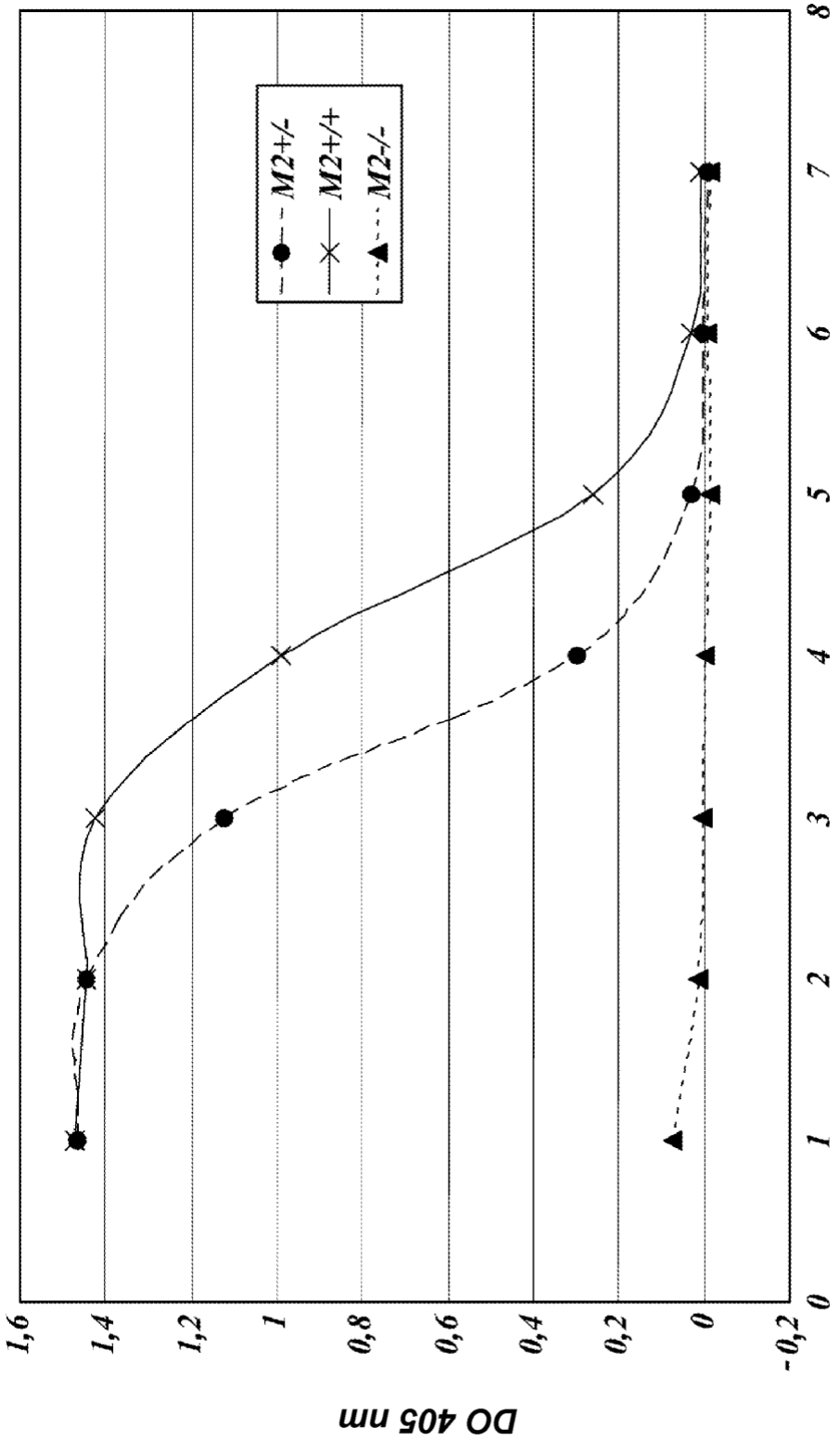
M2+/-
M2+/+
M2-/-
DO 405 nm
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
-0,2
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Log de diluciones de suero

Fig.5B.

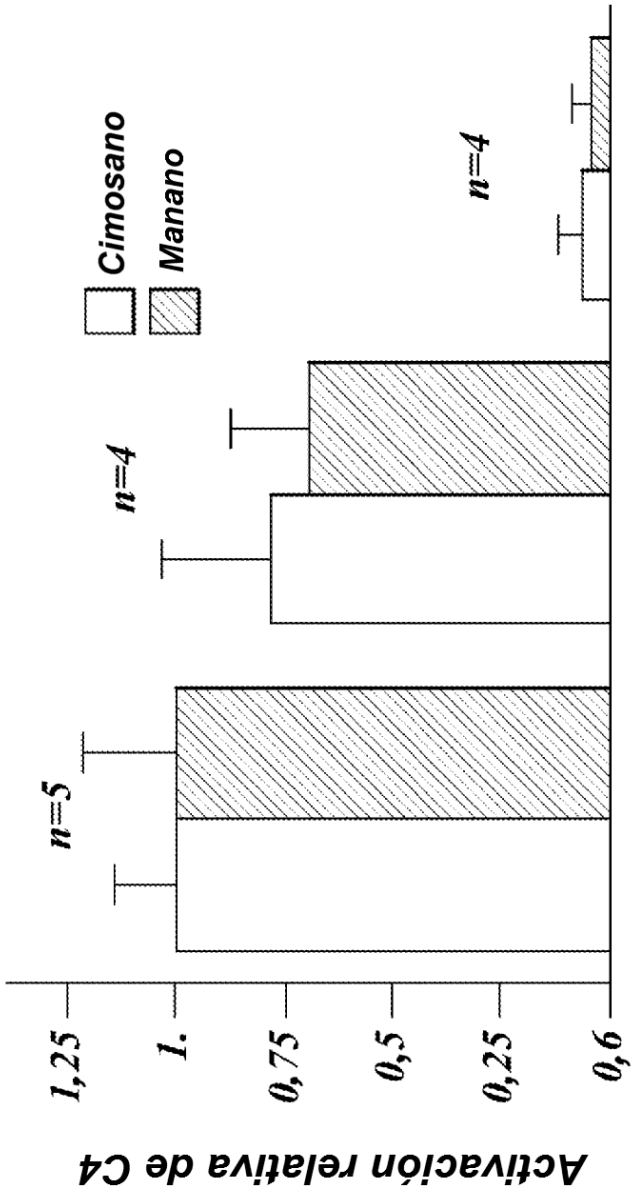
Activación relativa de C4
1,25
1.
0,75
0,5
0,25
0,6
n=5
n=4
n=4
Cimosano
Manano
WT
M2 +/-
M2 -/-

Fig.5C.

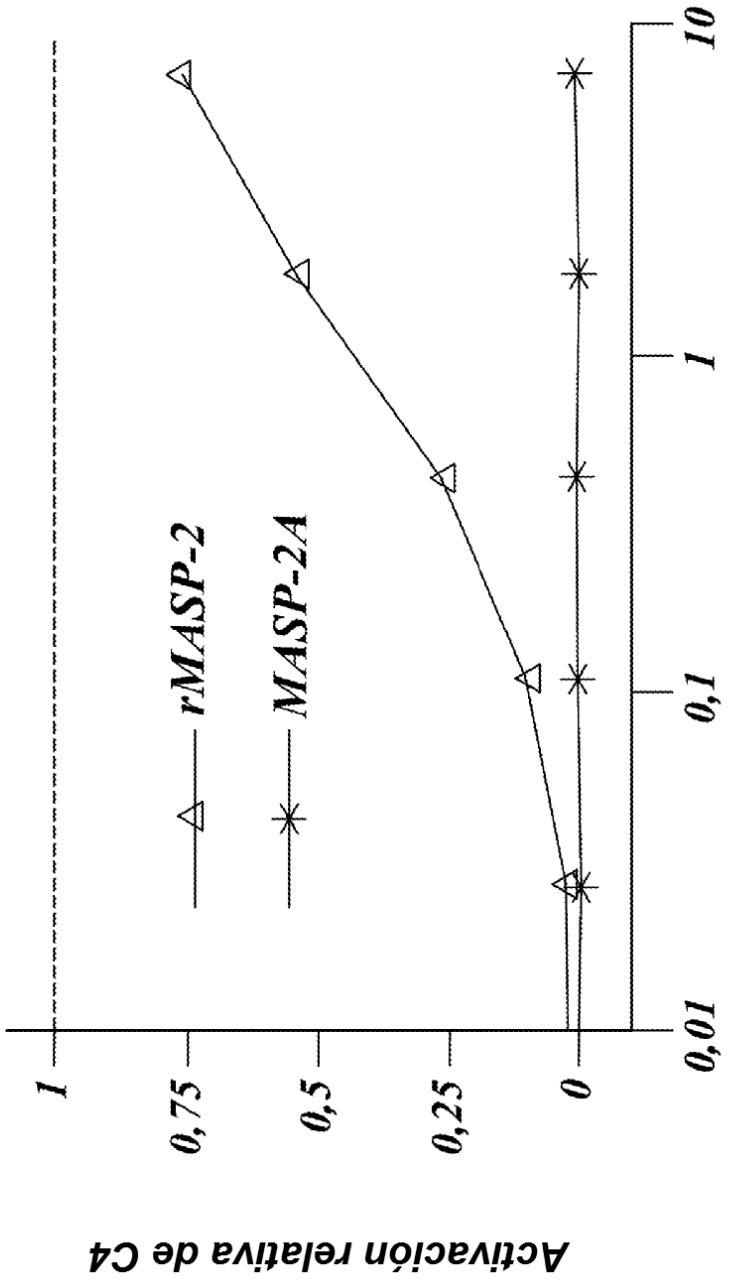
Activación relativa de C4
1
0,75
0,5
0,25
0
0,01
0,1
1
10
[Proteína recombinante] µg/ml
rMASP-2
MASP-2A

Fig. 6.

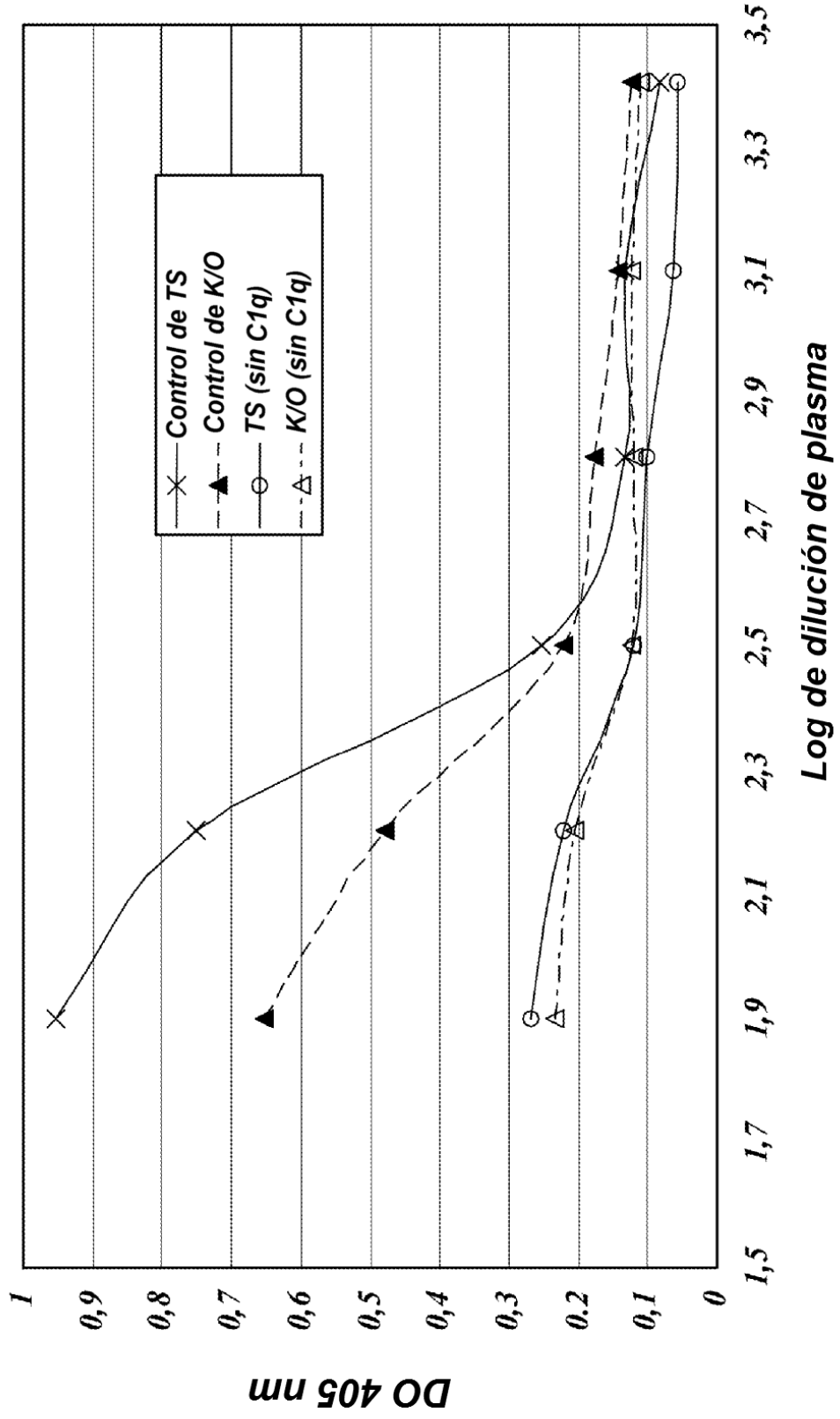
DO 405 nm
1
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0.2
0,1
0
1,5
1,7
1,9
2,1
2,3
2,5
2,7
2,9
3,1
3,3
3,5
Log de dilución de plasma
Control de TS
Control de K/O
TS (sin C1q)
K/O (sin C1q)

Fig. 7.

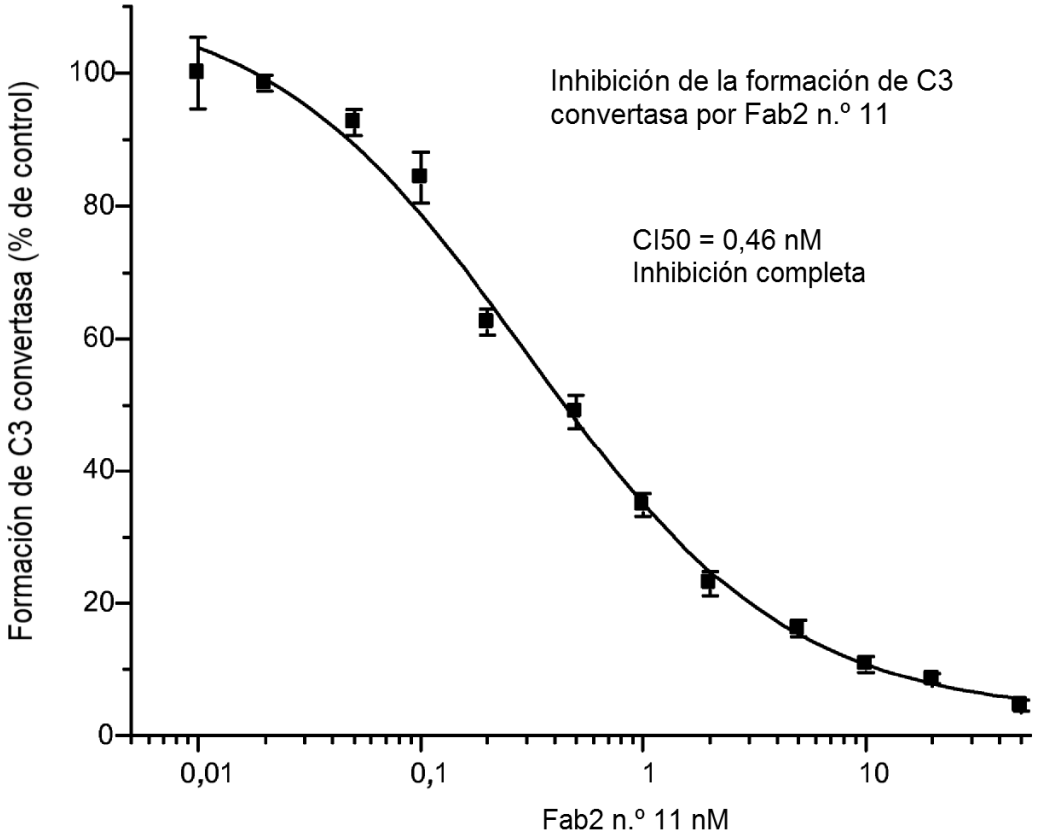
Inhibición de la formación de C3 convertasa por Fab2 n.º 11
CI50 = 0,46 nM
Inhibición completa
Formación de C3 convertasa (% de control)
100
80
60
40
20
0
0,01
0,1
1
10
Fab2 n.º 11 nM

Fig.8A.

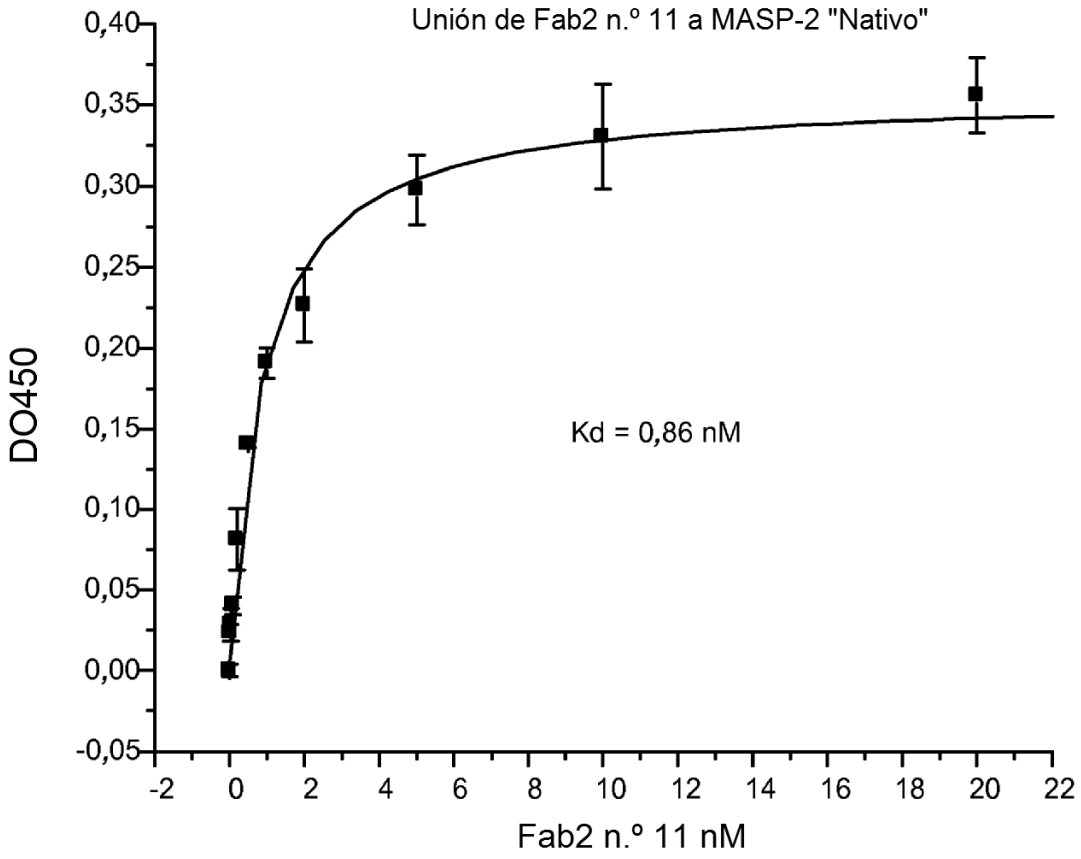
Unión de Fab2 n.º 11 a MASP-2 "Nativo"
DO450
Kd = 0,86 nM
Fab2 n.º 11 nM
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
-0,05
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22

Fig.8B.

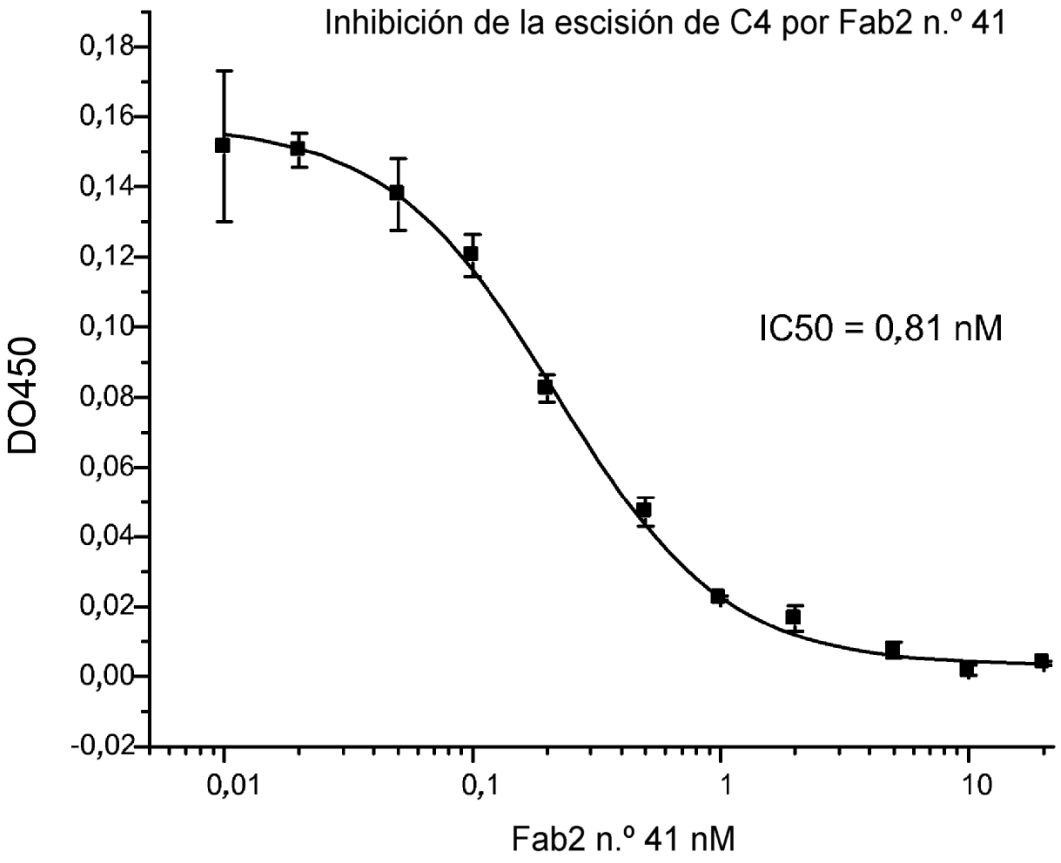
Inhibición de la escisión de C4 por Fab2 n.º 41
IC50 = 0,81 nM
DO450
0,18
0,16
0,14
0,12
0,10
0,08
0,06
0,04
0,02
0,00
-0,02
0,01
0,1
1
10
Fab2 n.º 41 nM

Fig.8C.

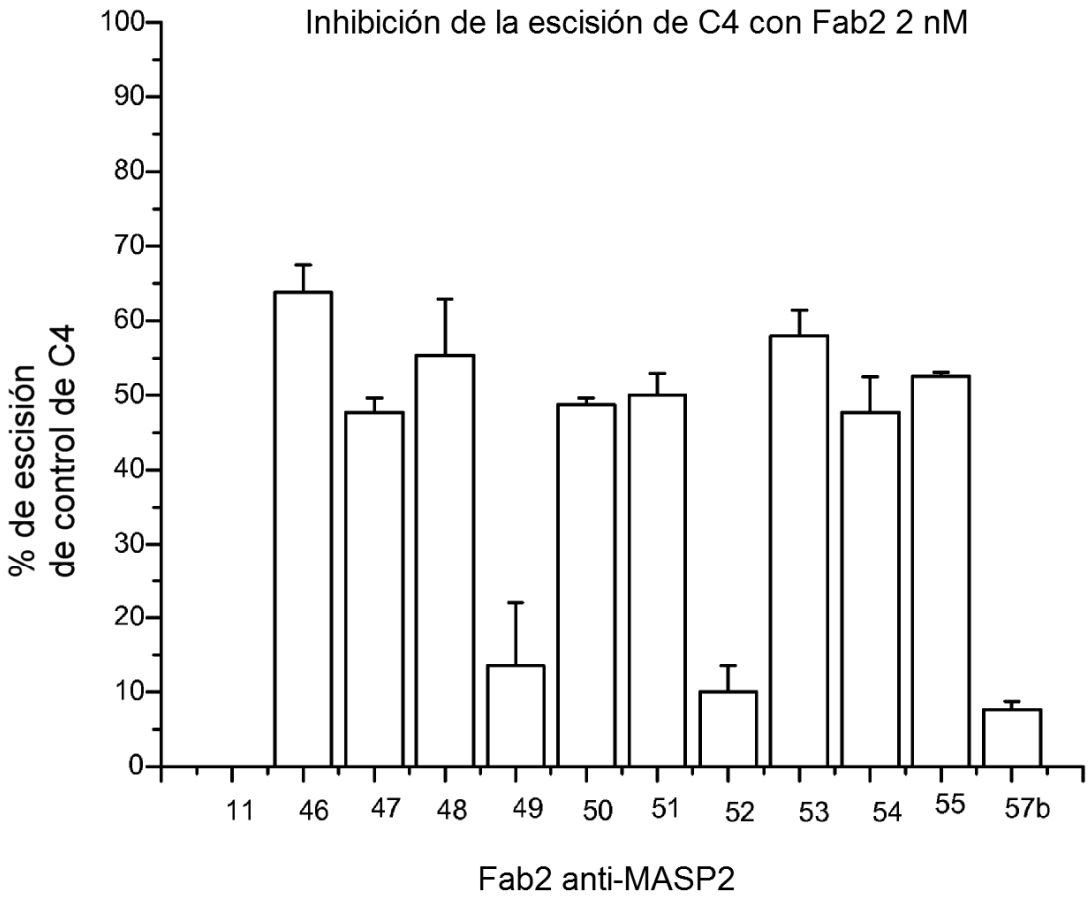
Inhibición de la escisión de C4 con Fab2 2 nM
% de escisión de control de C4
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
11
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
57b
Fab2 anti-MASP2

Fig.9.

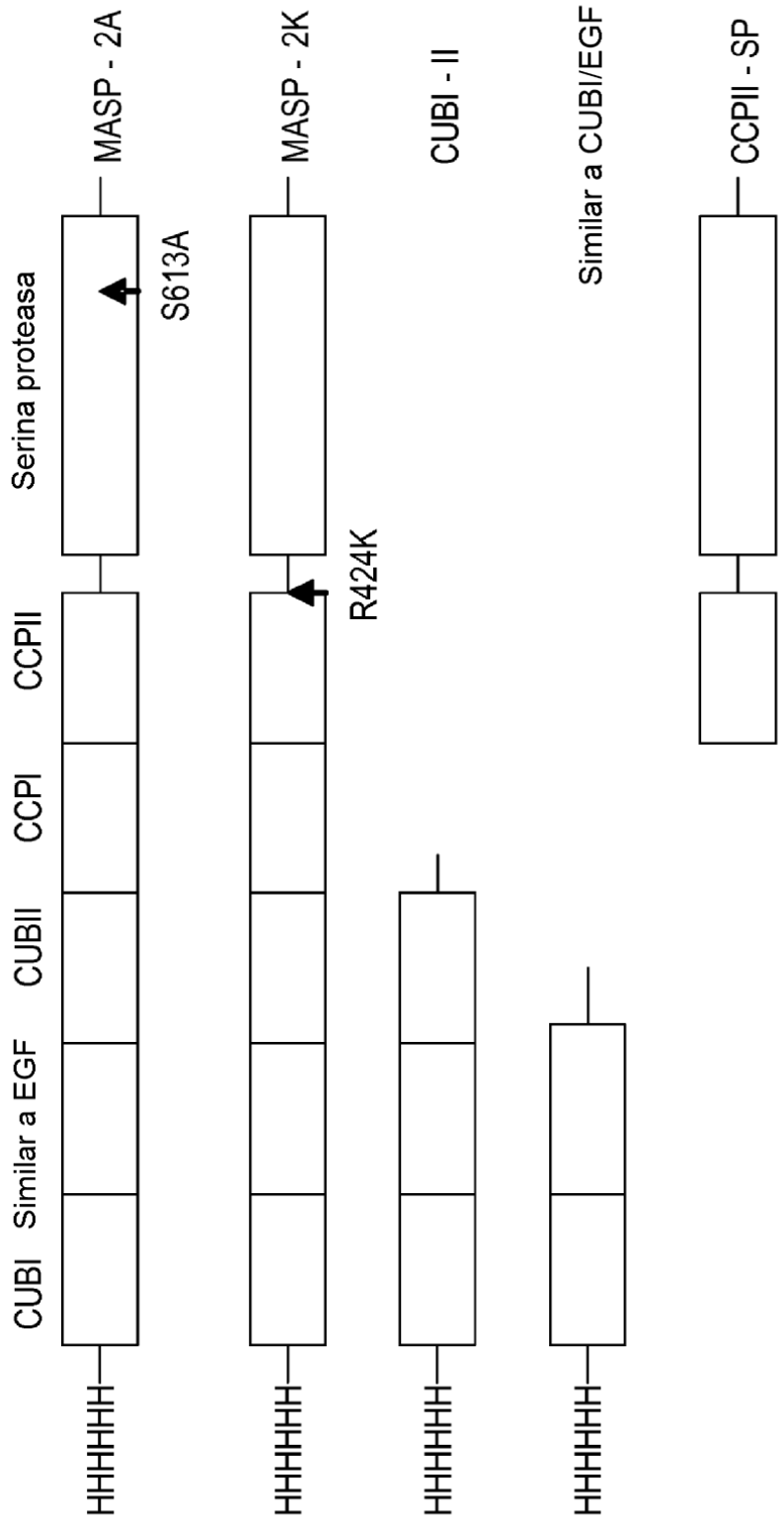
CUBI
Similar a EGF
CUBII
CCPI
CCPII
Serina proteasa
MASP - 2A
S613A
HHHHHH
MASP - 2K
R424K
CUBI - II
Similar a CUBI/EGF
CCPII - SP

Fig.10.

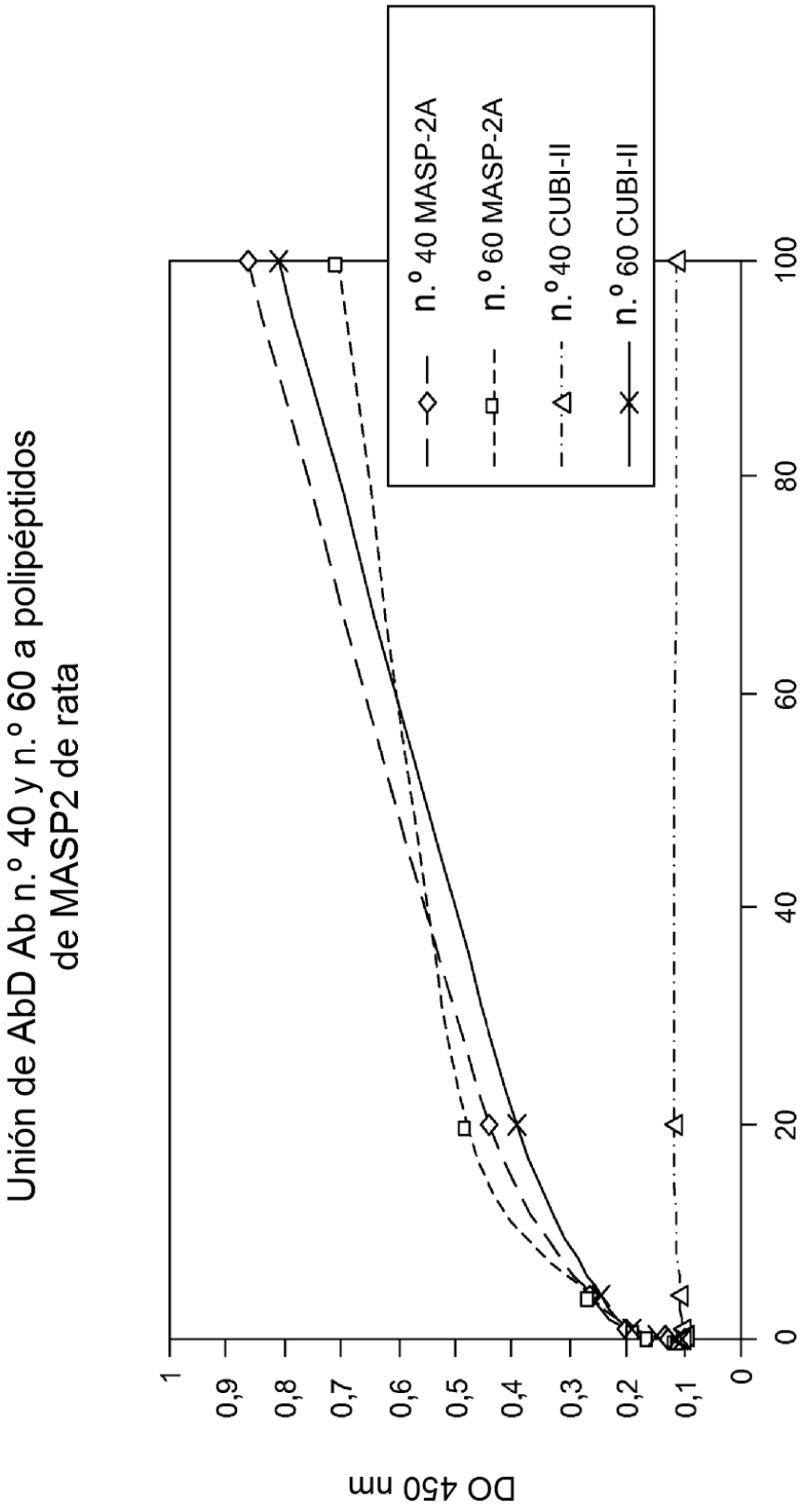
Unión de AbD Ab n.º 40 y n.º 60 a polipéptidos de MASP2 de rata
DO 450 nm
[Ab] nM
n.º 40 MASP-2A
n.º 60 MASP-2A
n.º 40 CUBI-II
n.º 60 CUBI-II
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1
0
20
40
60
80
100

Fig.11.

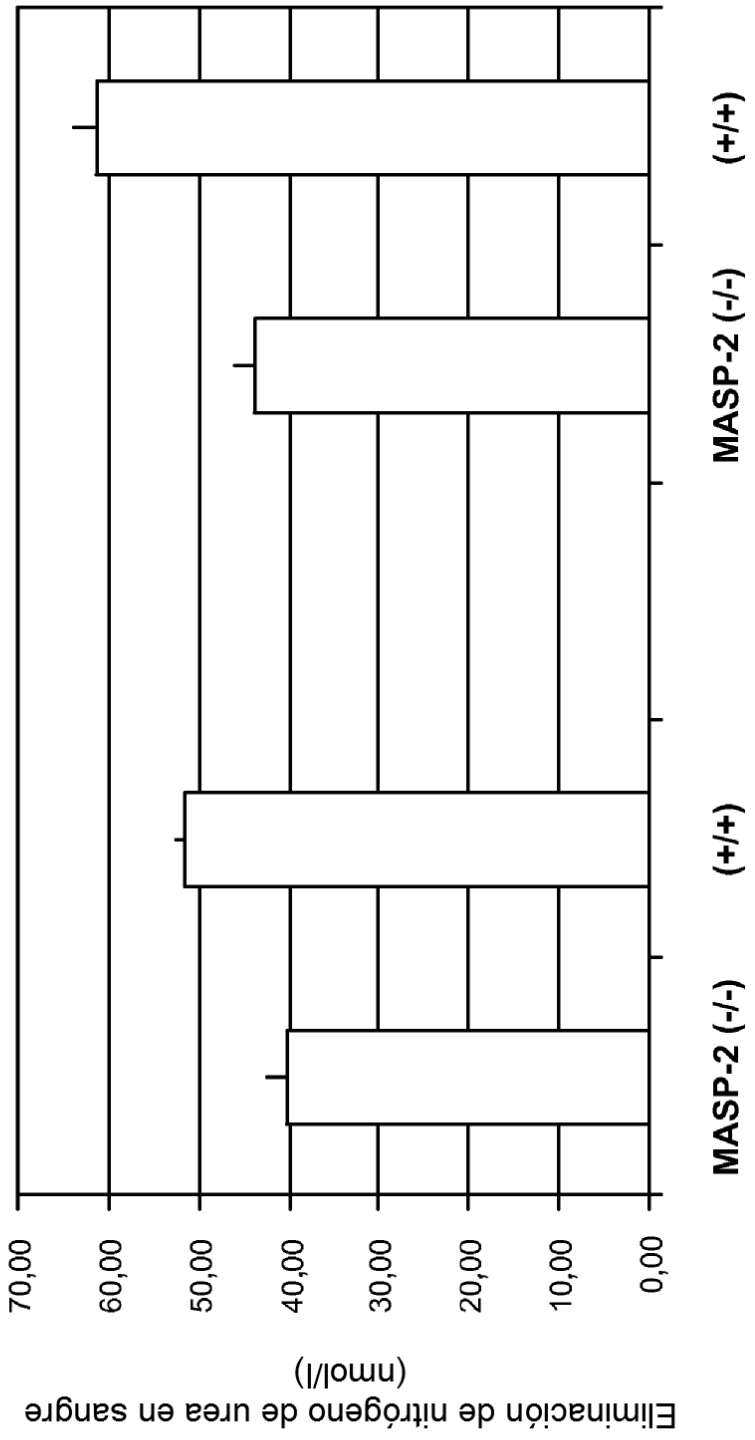
Eliminación de nitrógeno de urea en sangre
(nmol/l)
70,00
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
MASP-2 (-/-)
(+/+)
24 h
MASP-2 (-/-)
(+/+)
48 h

Fig.12.

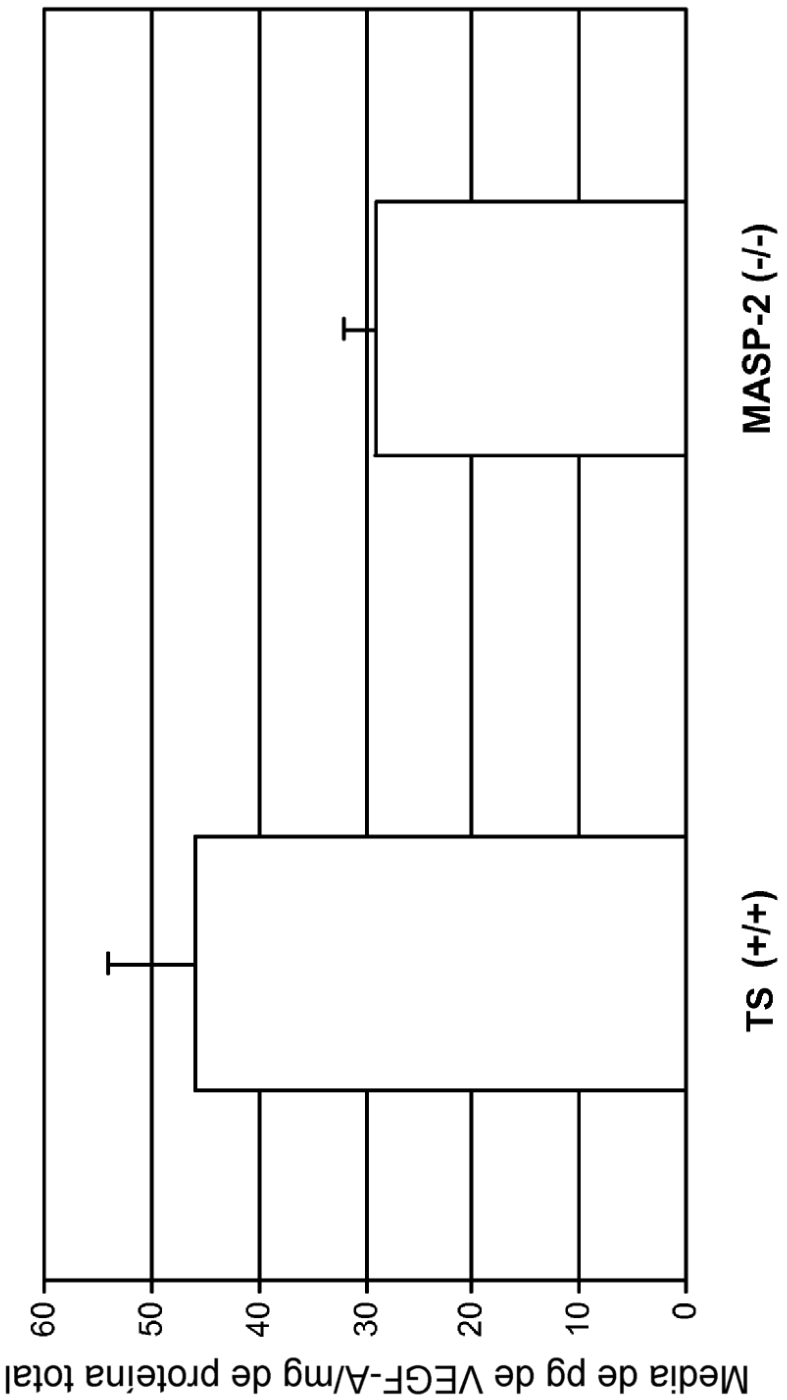
Media de pg de VEGF-A/mg de proteína total
60
50
40
30
20
10
0
TS (+/+)
MASP-2 (-/-)

Fig.13A.

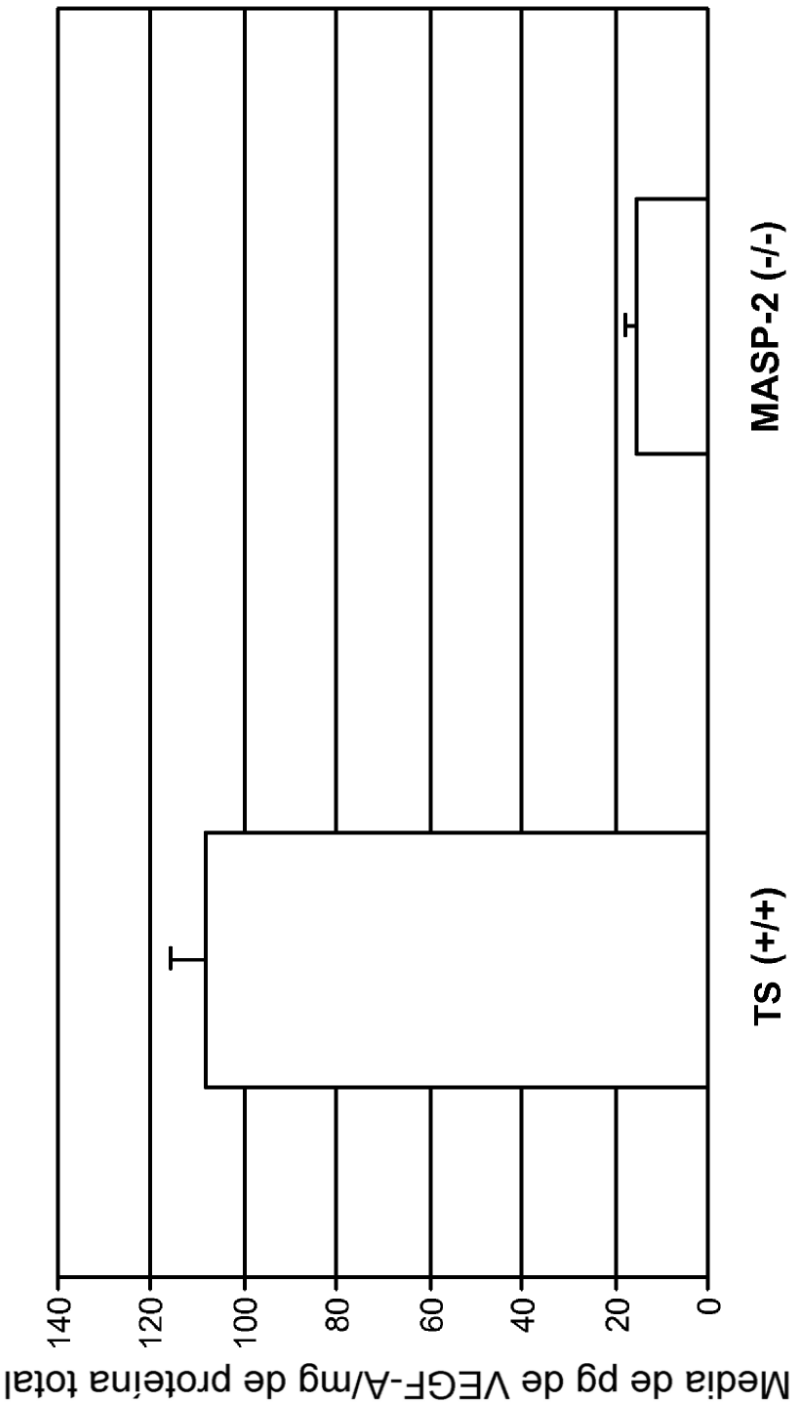
Media de pg de VEGF-A/mg de proteína total
140
120
100
80
60
40
20
0
TS (+/+)
MASP-2 (-/-)

Fig.13B.

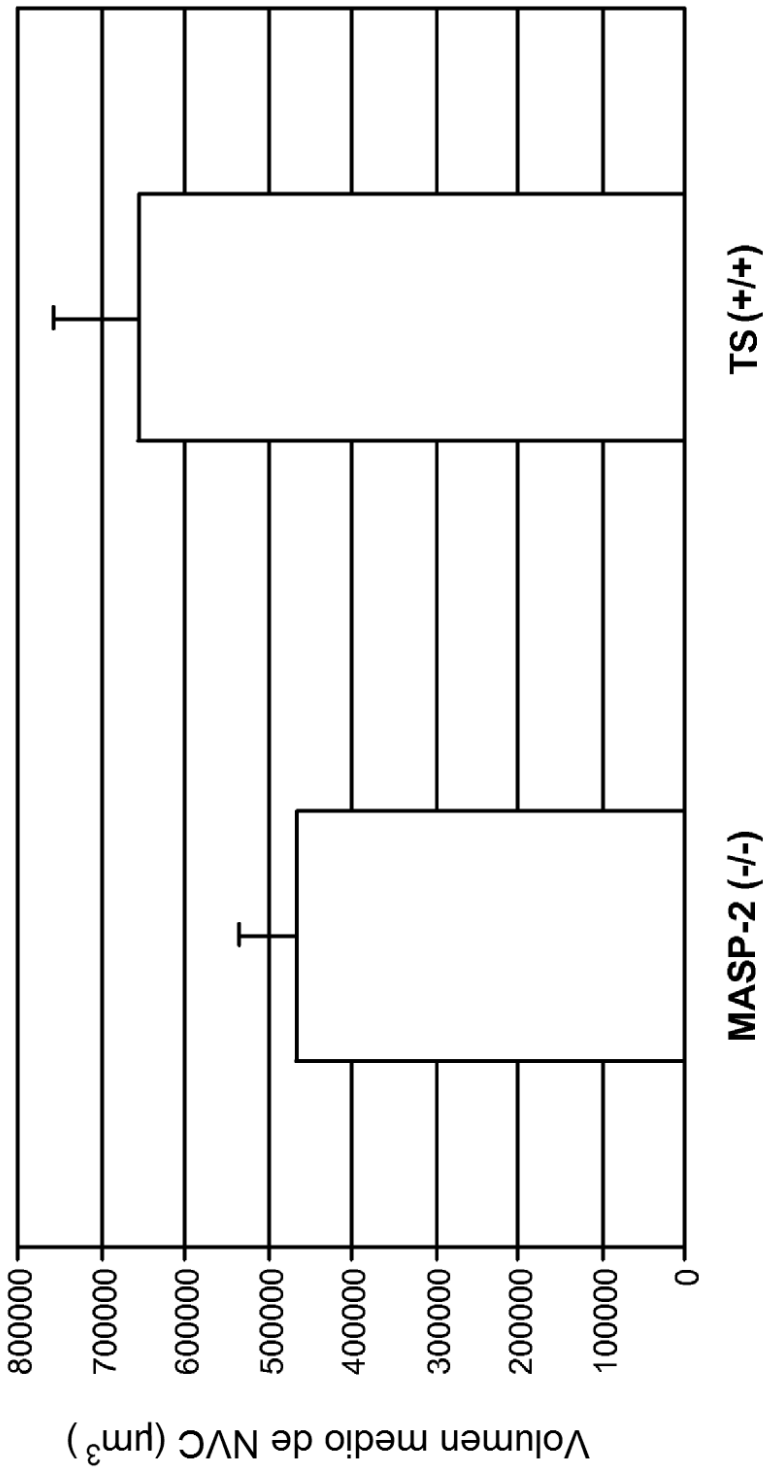
Volumen medio de NVC (µm³)
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
MASP-2 (-/-)
TS (+/+)

Fig.14.

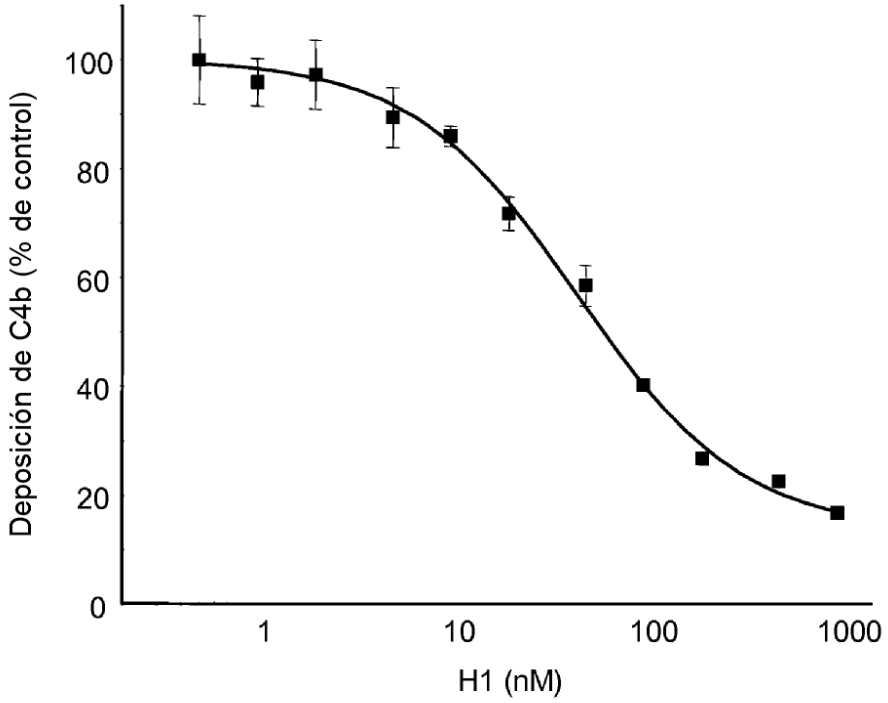

Fig.15A.

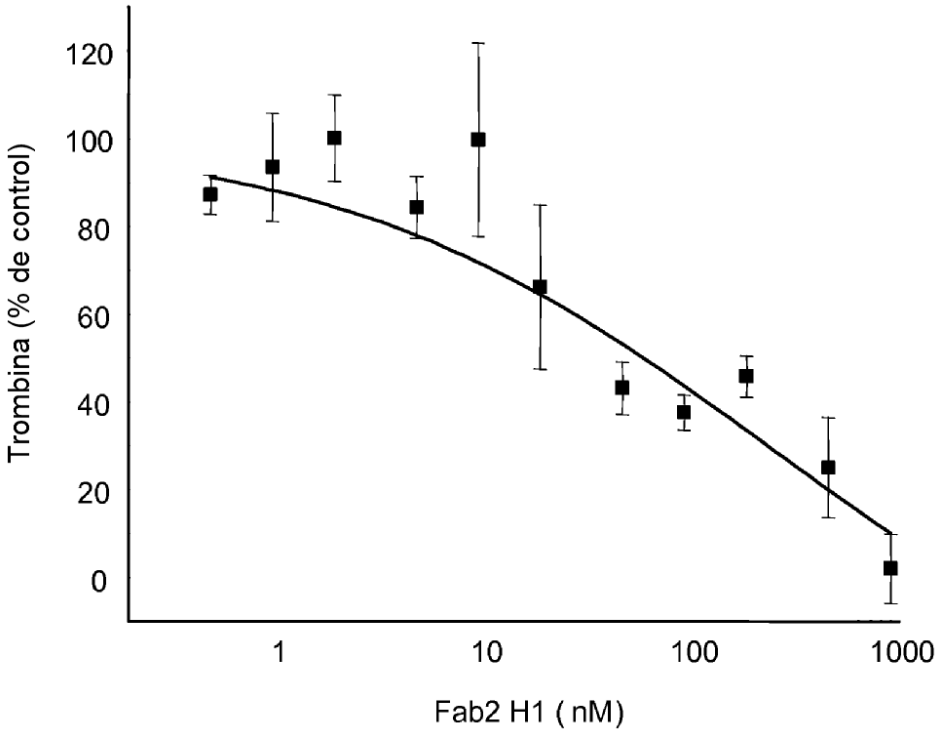

Fig.15B.

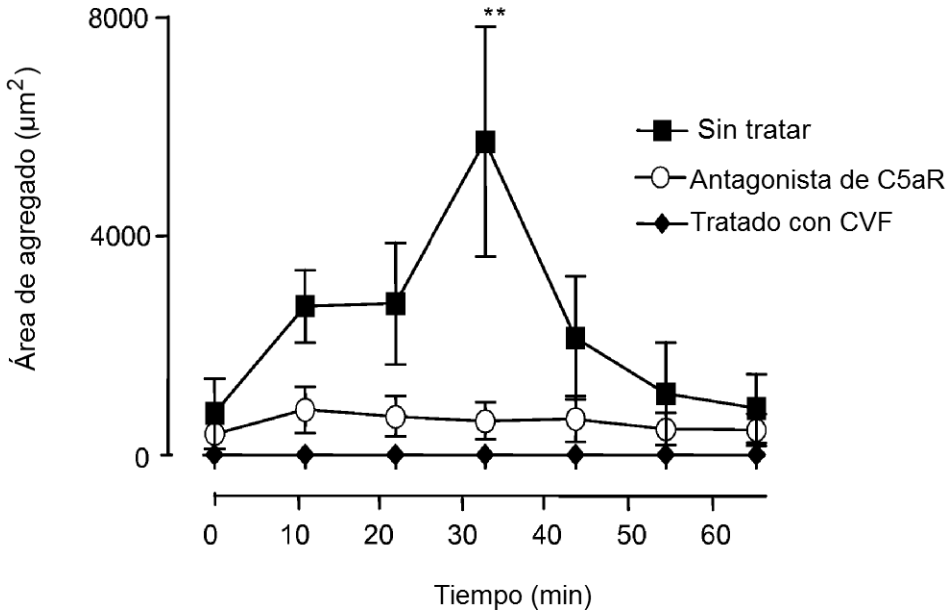

Fig.16A.

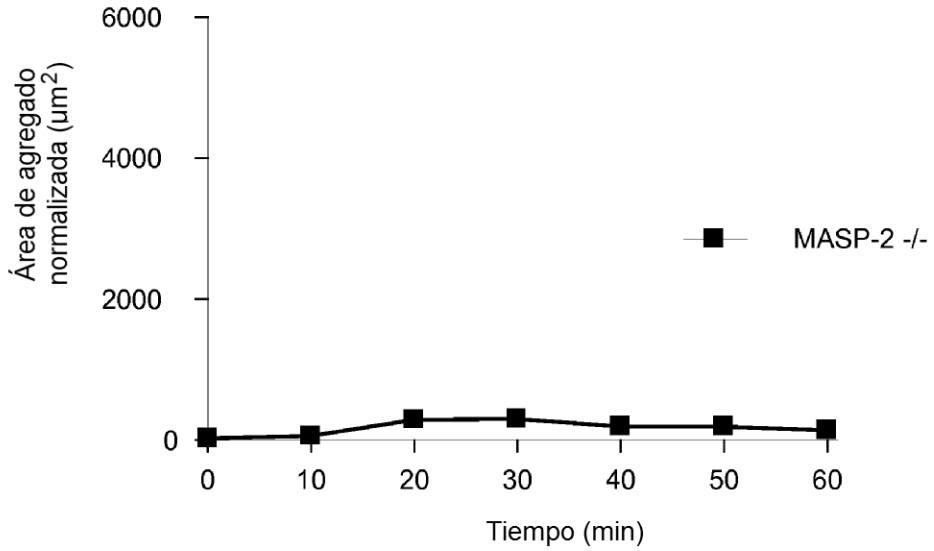

Fig.16B.

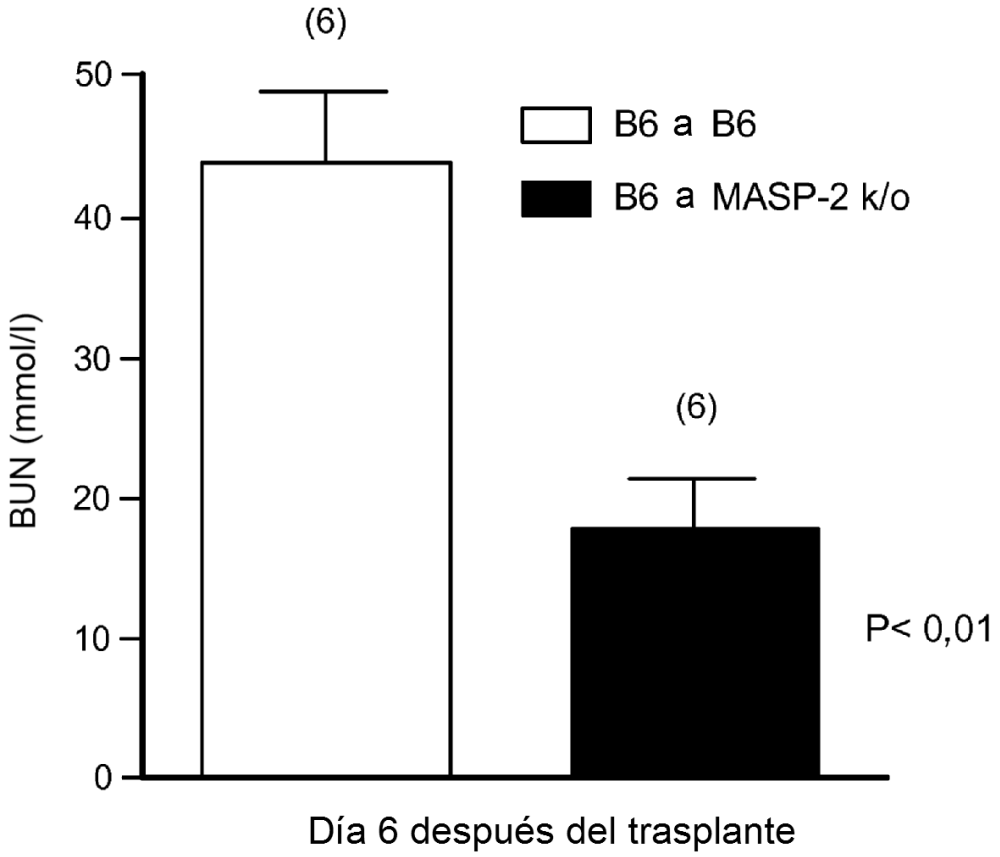
(6)
50
40
30
20
10
0
BUN (mmol/l)
B6 a B6
B6 a MASP-2 k/o
(6)
P< 0,01
Día 6 después del trasplante

Fig.17.

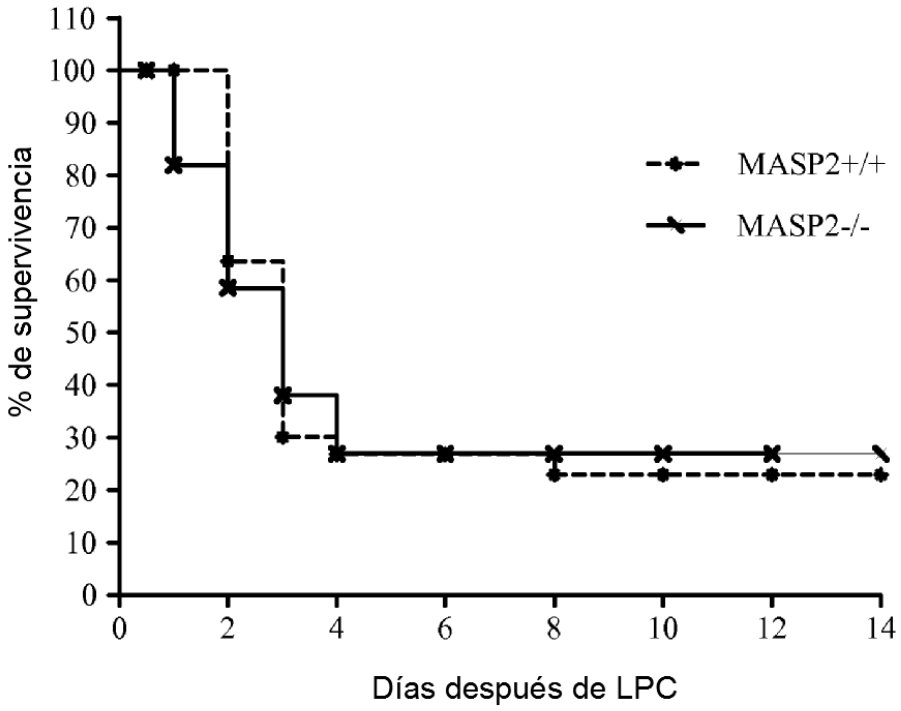
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% de supervivencia
0
2
4
6
8
10
12
14
Días después de LPC
MASP2+/+
MASP2-/-

Fig.18.

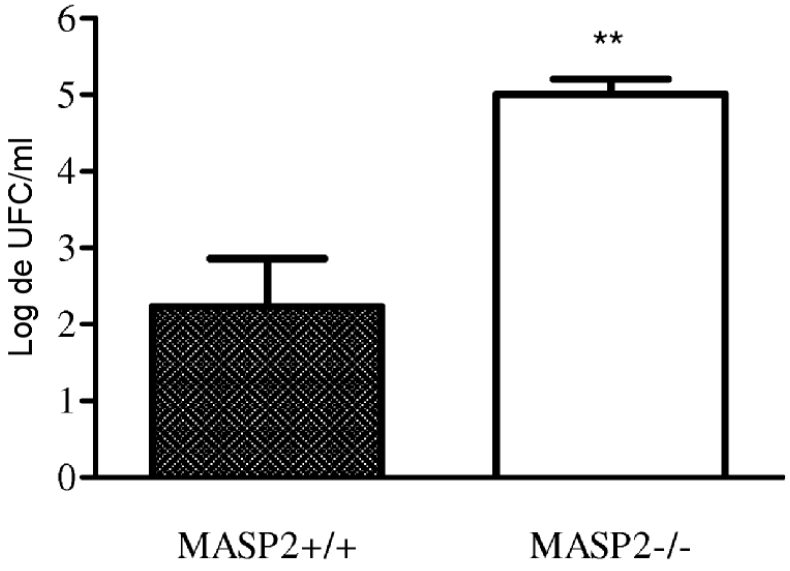
6
5
4
3
2
1
0
Log de UFC/ml
**
MASP2+/+
MASP2-/-

Fig.19.

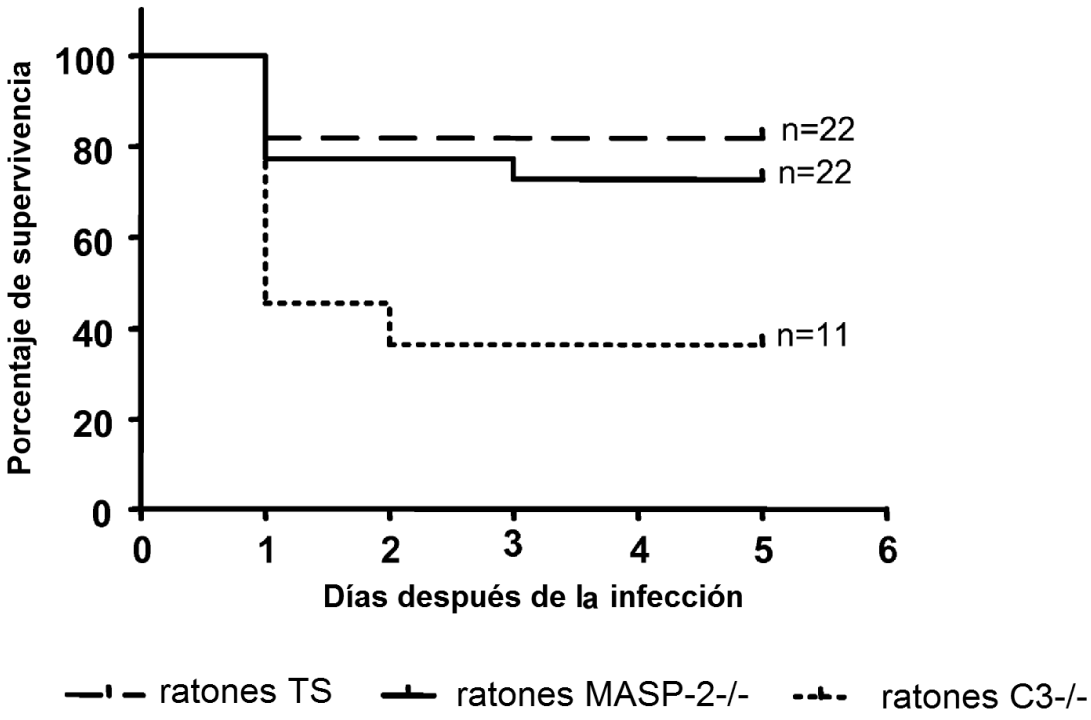
Porcentaje de supervivencia
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
Días después de la infección
n=22
n=22
n=11
ratones TS
ratones MASP-2-/-
ratones C3-/-

Fig.20.

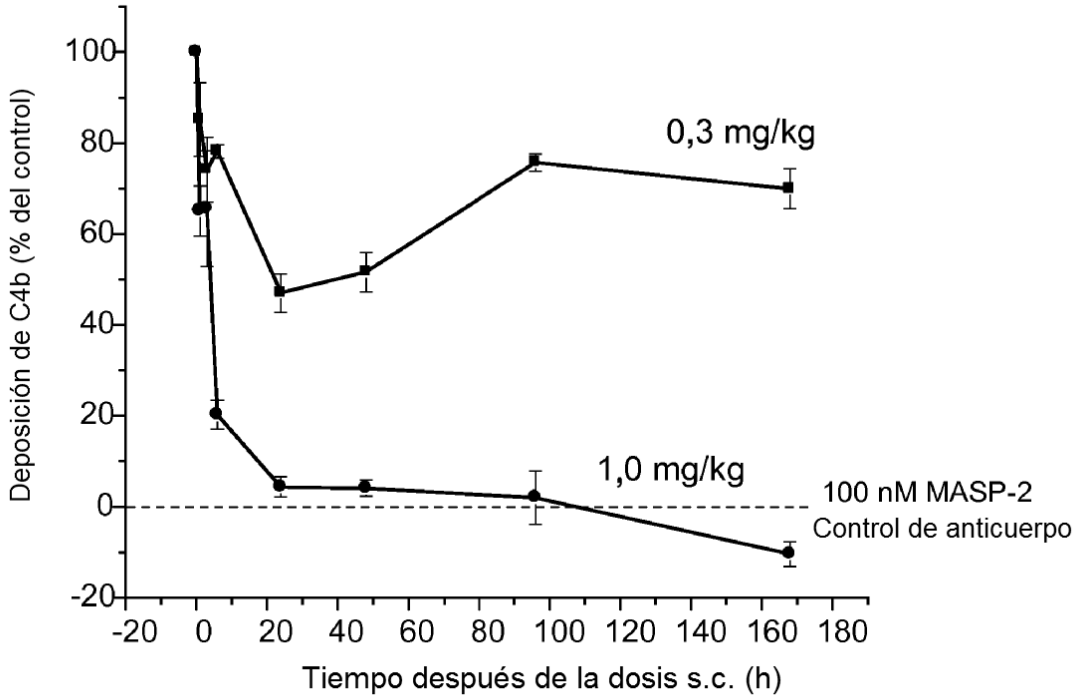
Deposición de C4b (% del control)
100
80
60
40
20
0
-20
0,3 mg/kg
1,0 mg/kg
100 nM MASP-2
Control de anticuerpo
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Tiempo después de la dosis s.c. (h)

Fig.21.

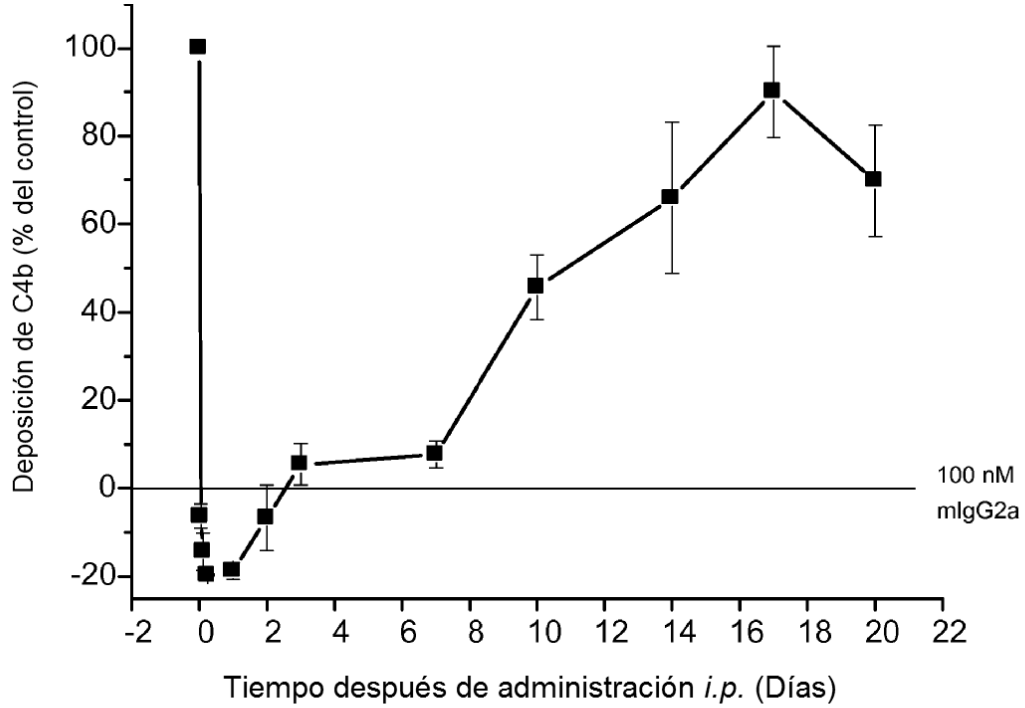
Deposición de C4b (% del control)
100
80
60
40
20
0
-20
100 nM
mIgG2a
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
Tiempo después de administración *i.p.* (Días)

Fig.22.

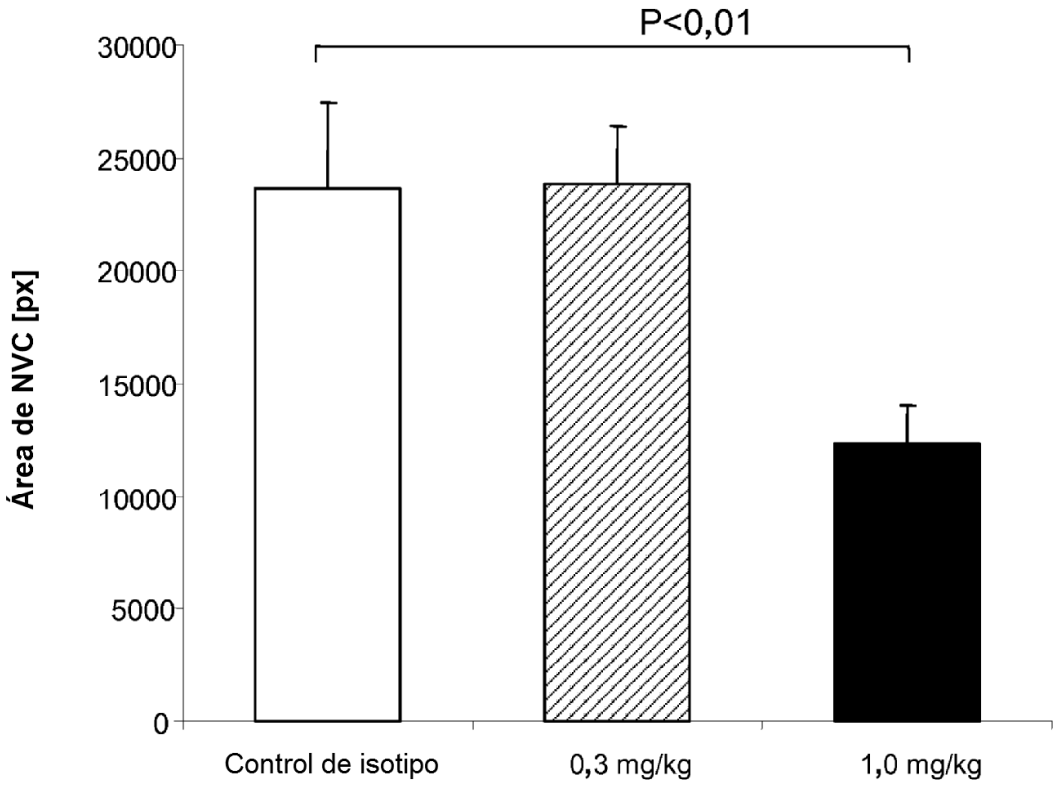
P<0,01
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Área de NVC [px]
Control de isotipo
0,3 mg/kg
1,0 mg/kg

Fig.23.

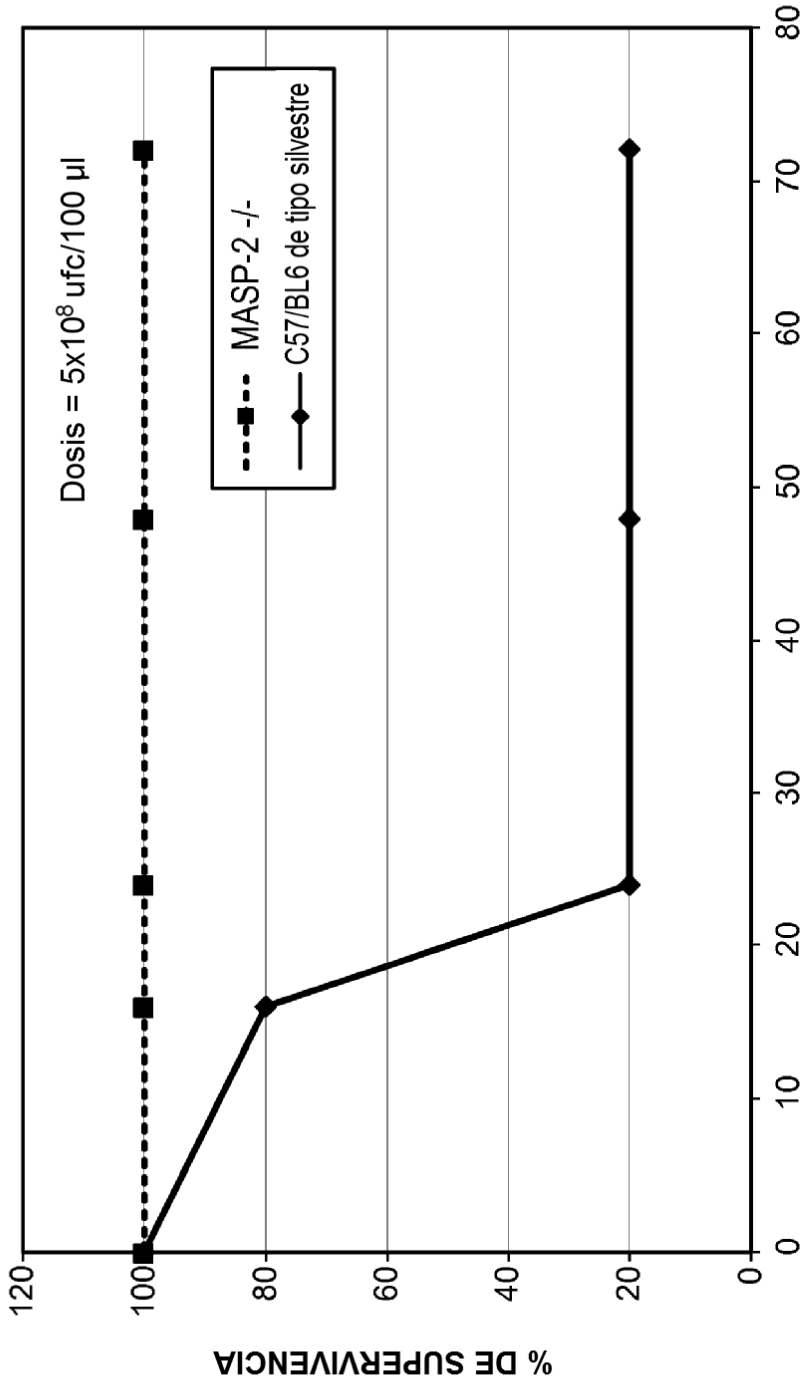
Dosis = 5x10^8 ufc/100 µl
MASP-2 -/-
C57/BL6 de tipo silvestre
% DE SUPERVIVENCIA
TIEMPO (HORAS)
0
20
40
60
80
100
120
0
10
20
30
40
50
60
70
80

Fig.24A.

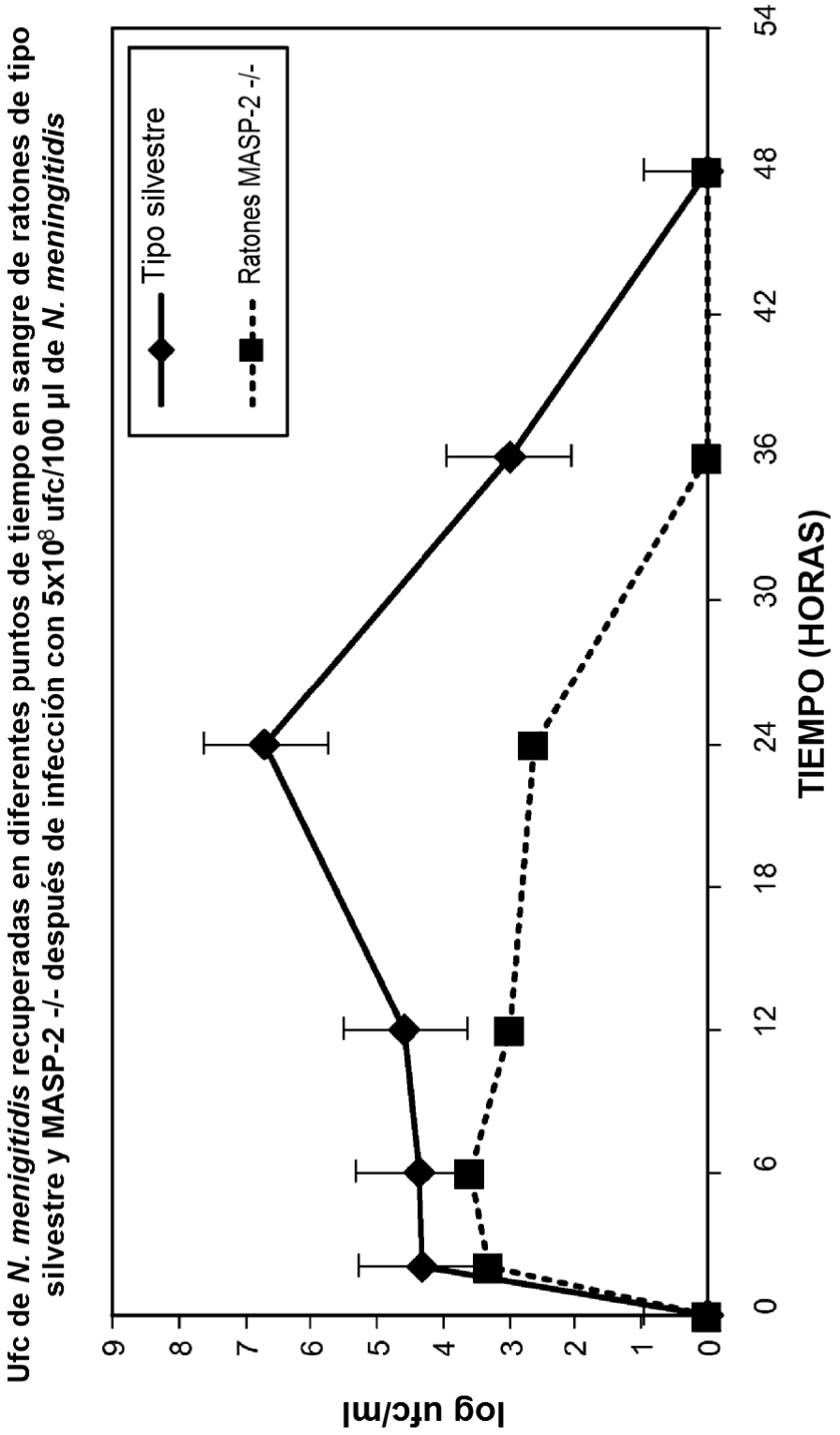
Ufc de N. menigitidis recuperadas en diferentes puntos de tiempo en sangre de ratones de tipo silvestre y MASP-2 -/- después de infección con 5x10^8 ufc/100 µl de N. meningitidis
Tipo silvestre
Ratones MASP-2 -/-
log ufc/ml
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
TIEMPO (HORAS)
0
6
12
18
24
30
36
42
48
54

Fig.24B.

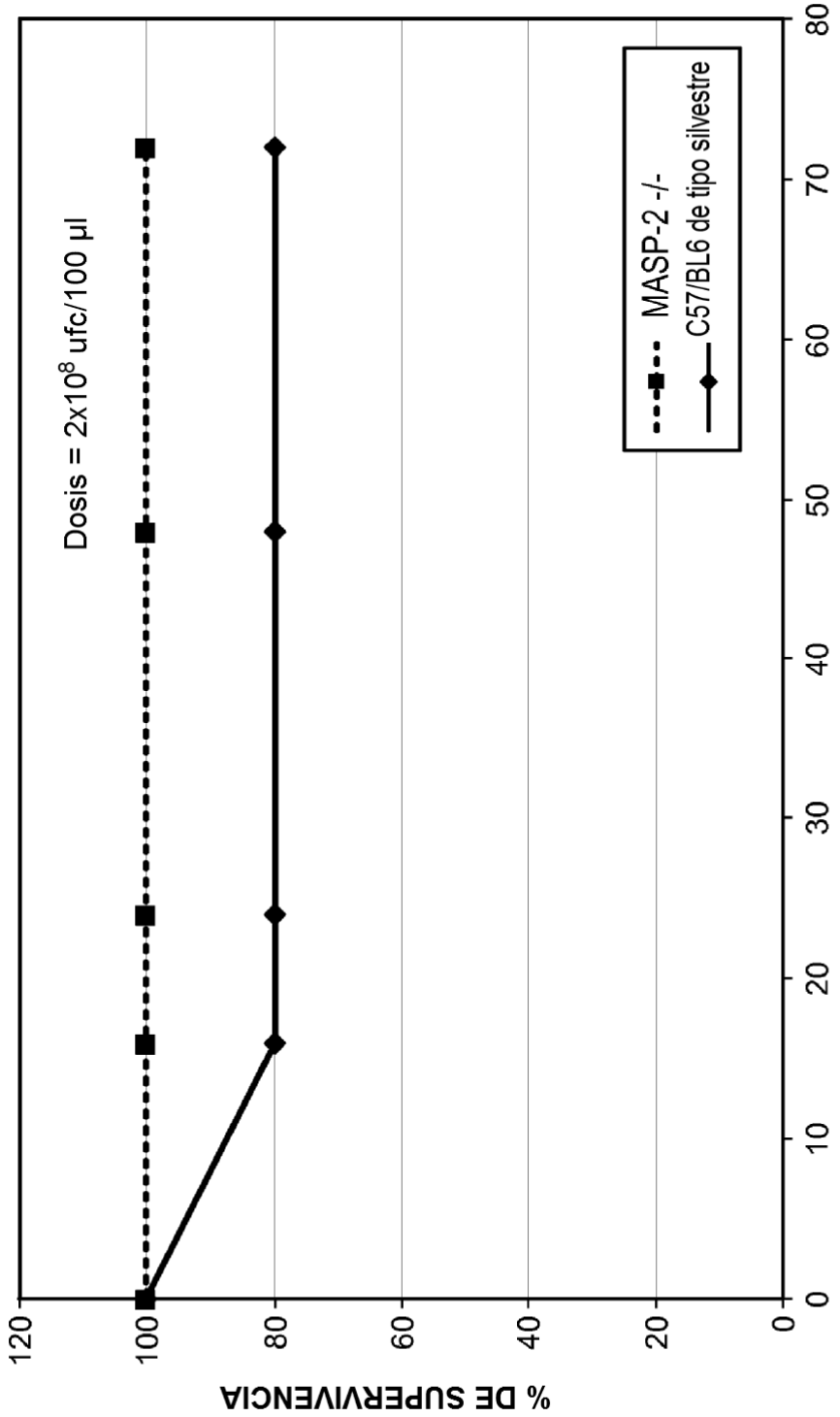
Dosis = 2x10^8 ufc/100 µl
MASP-2 -/-
C57/BL6 de tipo silvestre
% DE SUPERVIVENCIA
TIEMPO (HORAS)
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80

Fig.25A.

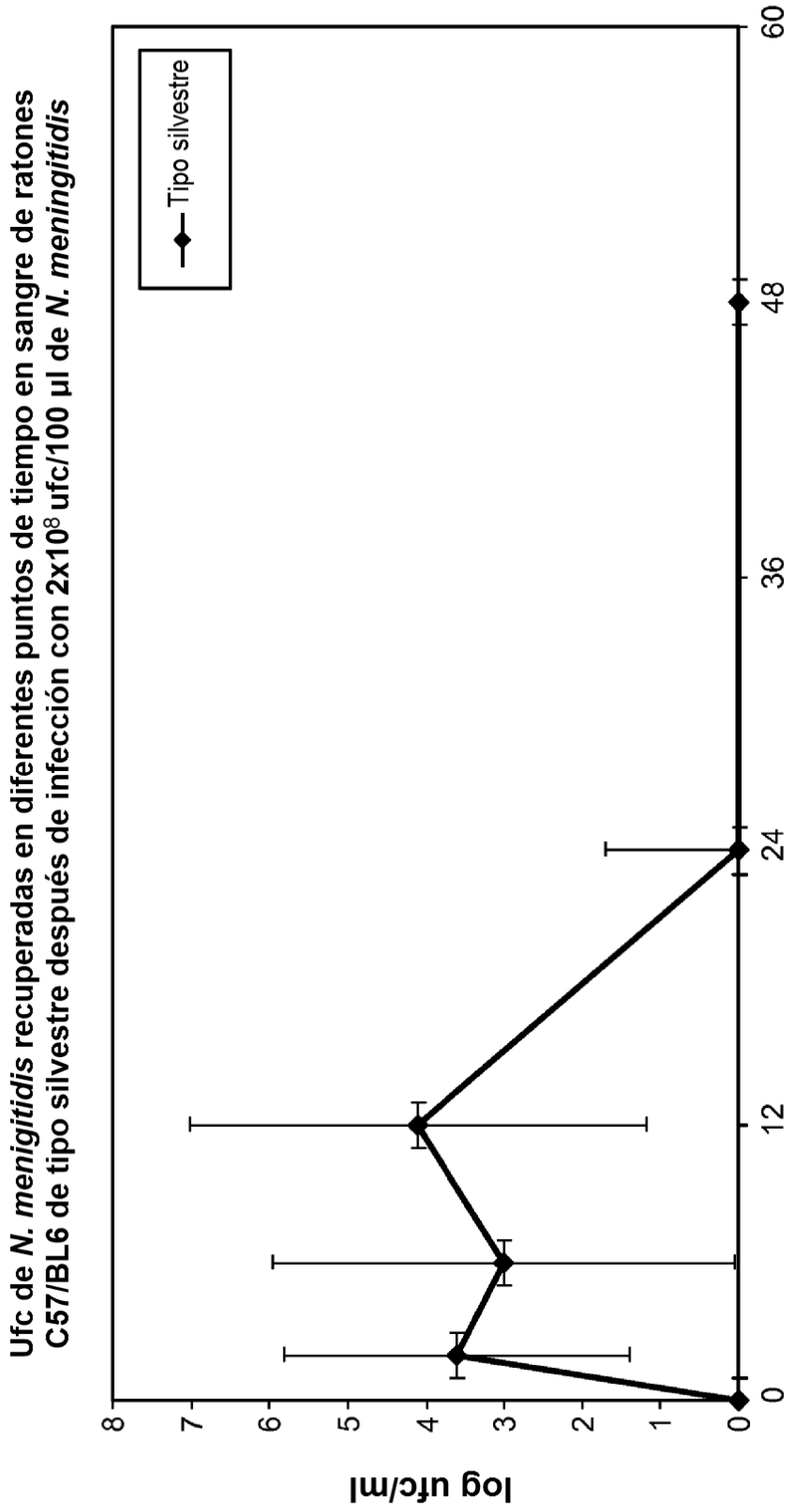
Ufc de N. menigitidis recuperadas en diferentes puntos de tiempo en sangre de ratones C57/BL6 de tipo silvestre después de infección con 2x10^8 ufc/100 µl de N. meningitidis
Tipo silvestre
log ufc/ml
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0
12
24
36
48
60
TIEMPO (HORAS)

Fig.25B.

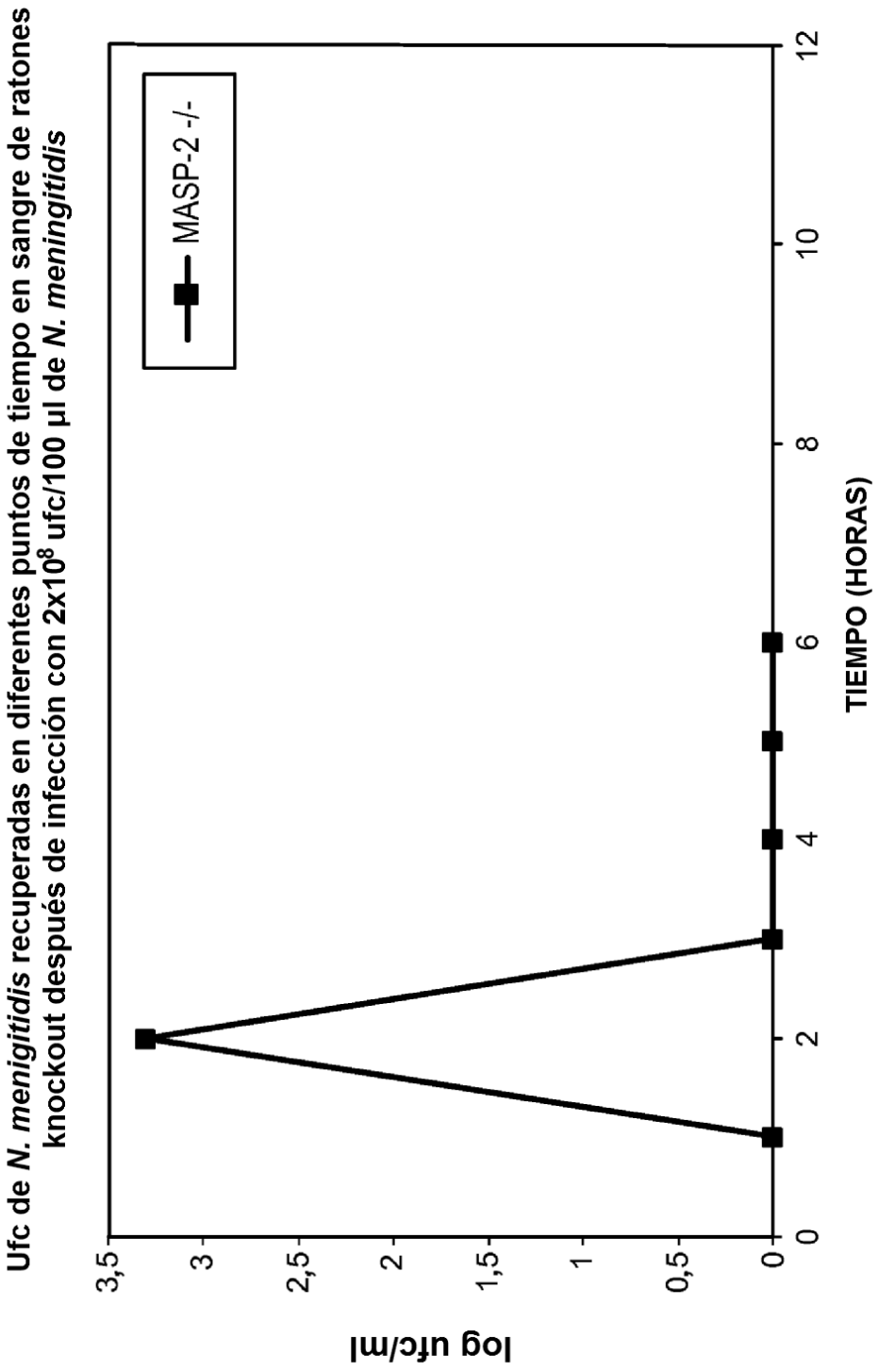
Ufc de N. menigitidis recuperadas en diferentes puntos de tiempo en sangre de ratones knockout después de infección con 2x10^8 ufc/100 µl de N. meningitidis
MASP-2 -/-
log ufc/ml
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0
2
4
6
8
10
12
TIEMPO (HORAS)

Fig.25C.

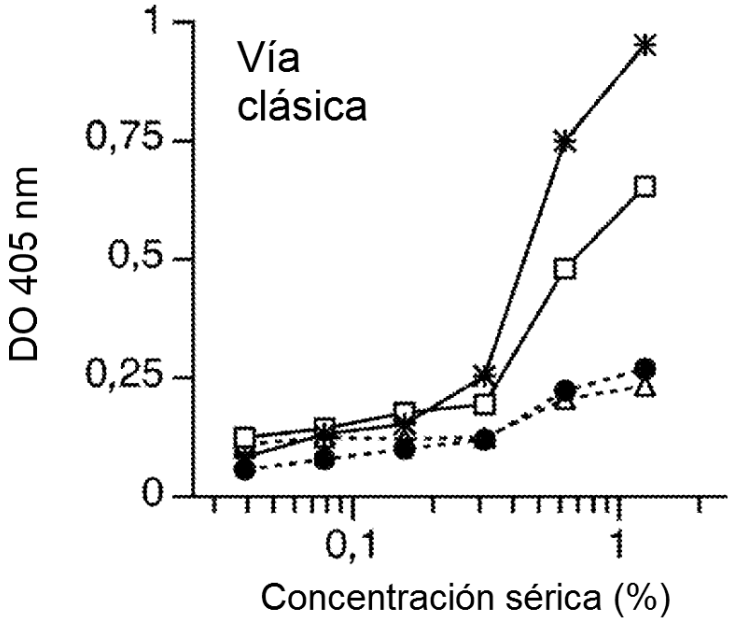

Fig.26A.

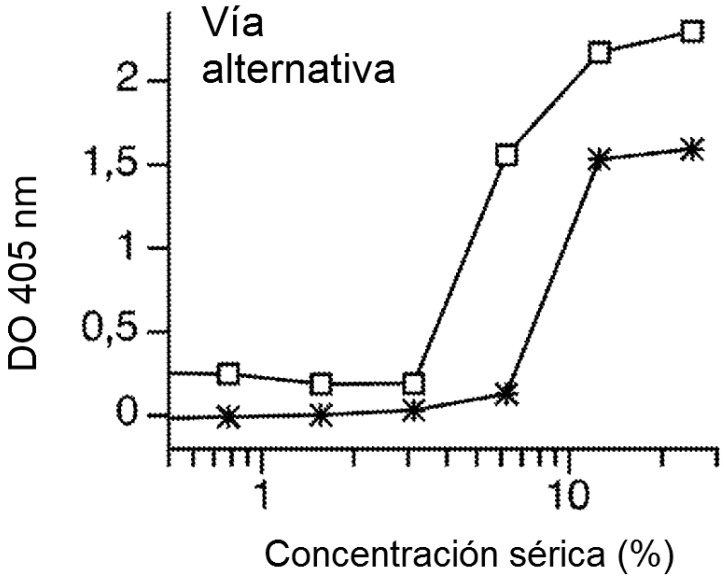

Fig.26B.

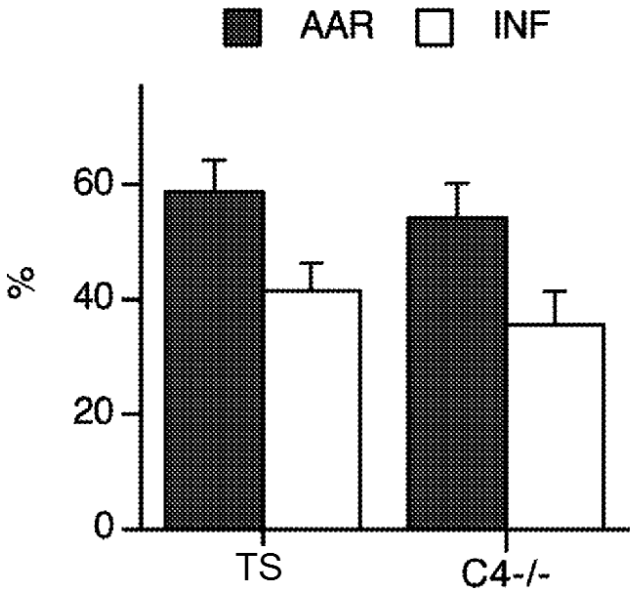

Fig.27A.

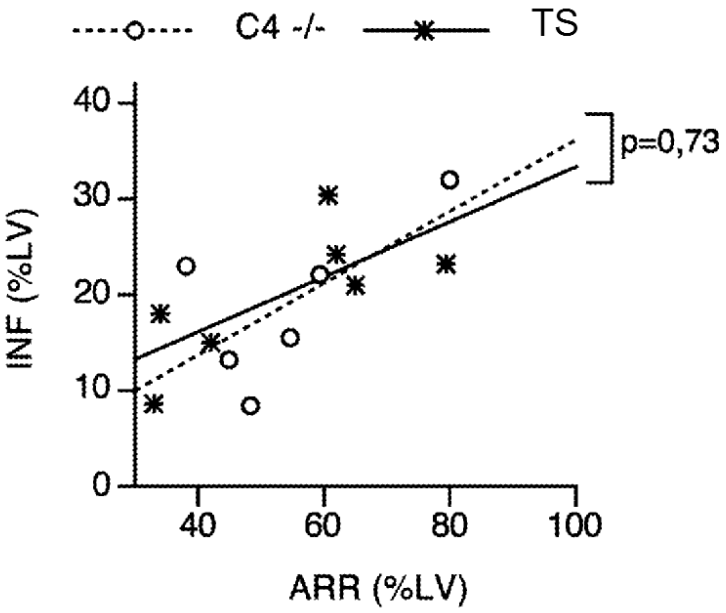

Fig.27B.

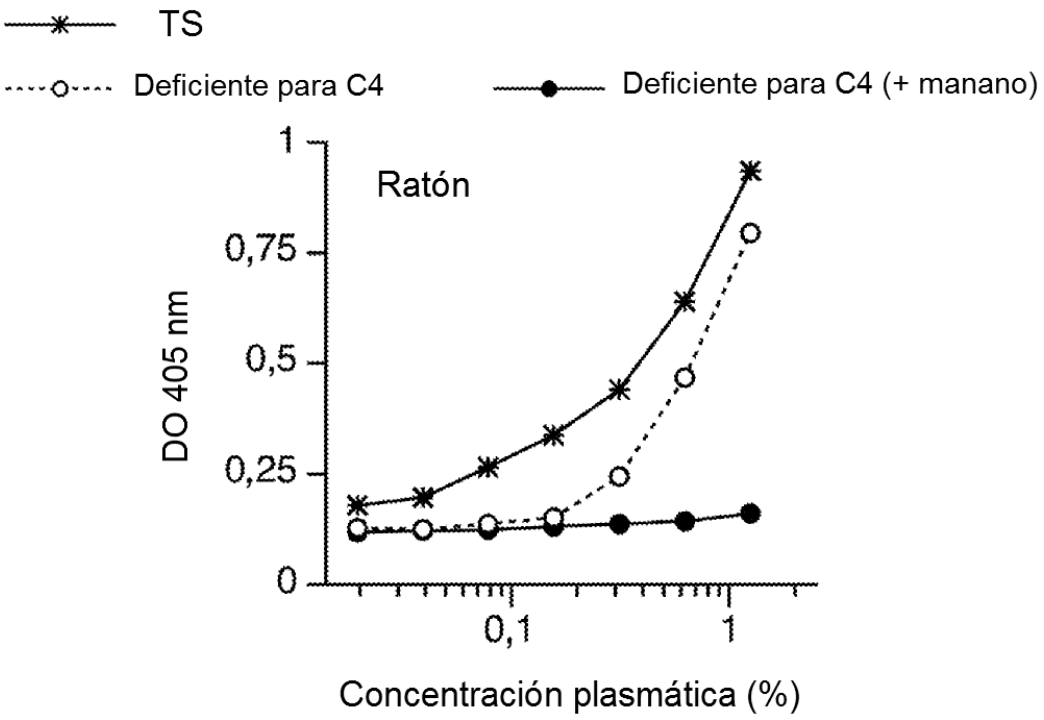

Fig.28A.

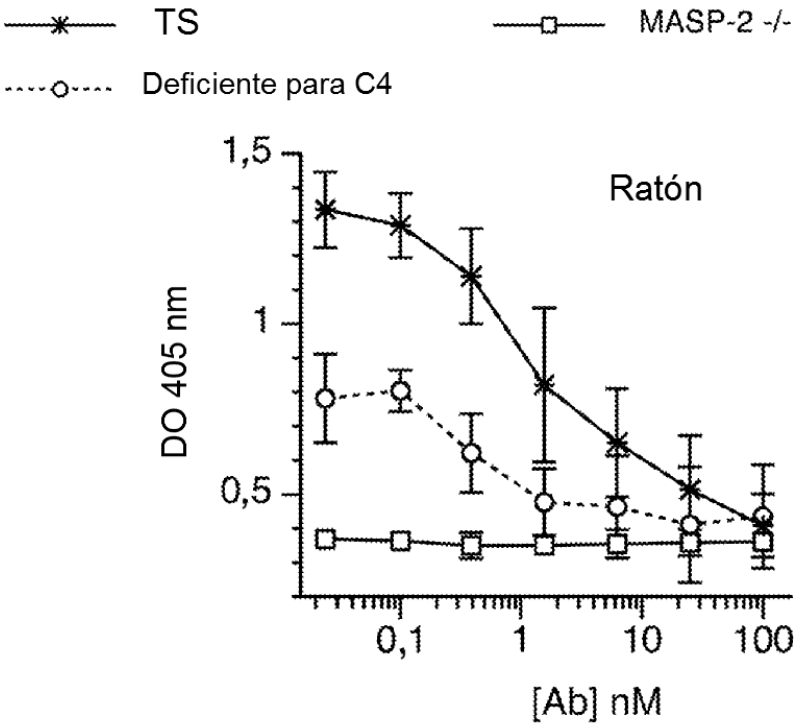

Fig.28B.

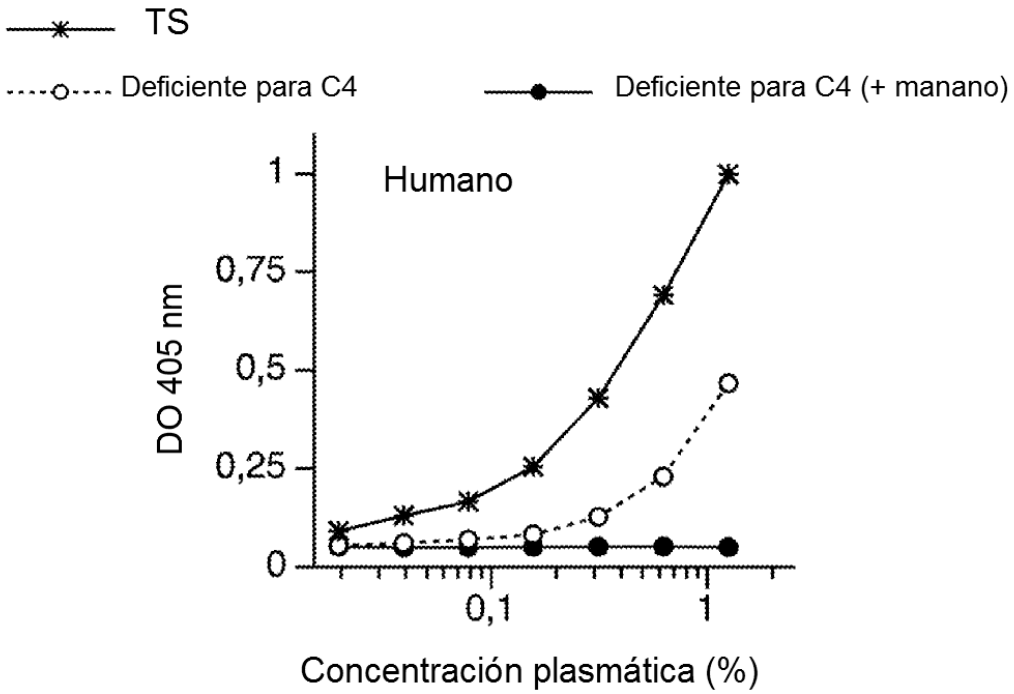

Fig.28C.

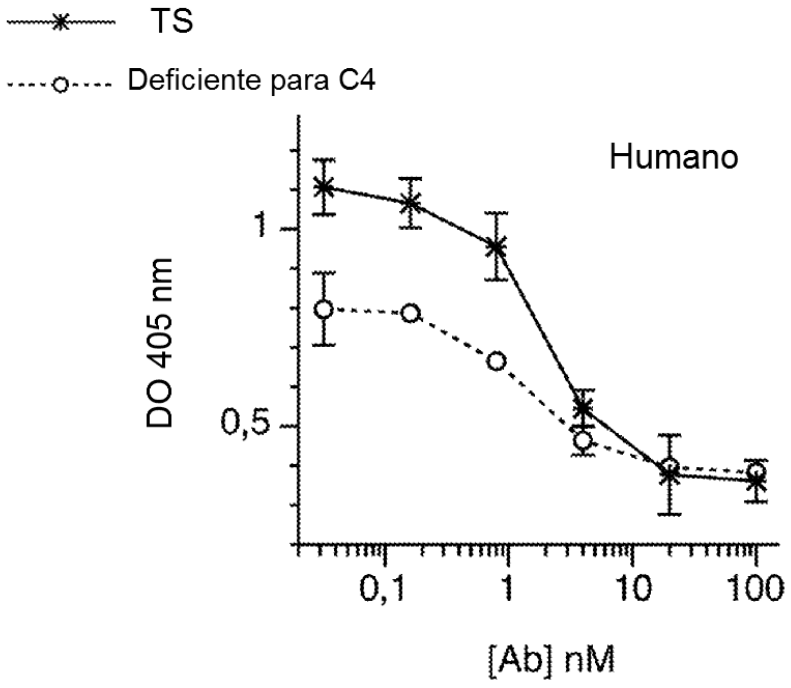

Fig.28D.

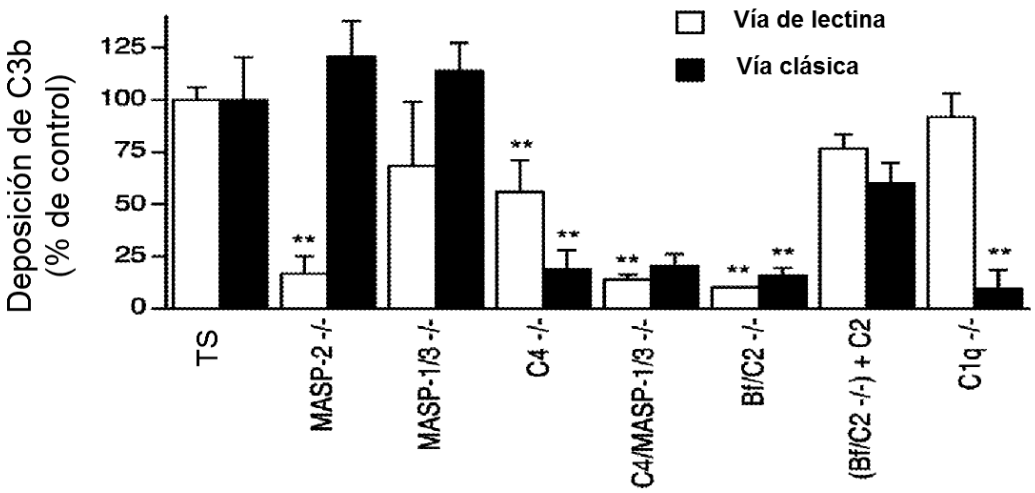

Fig.29A.

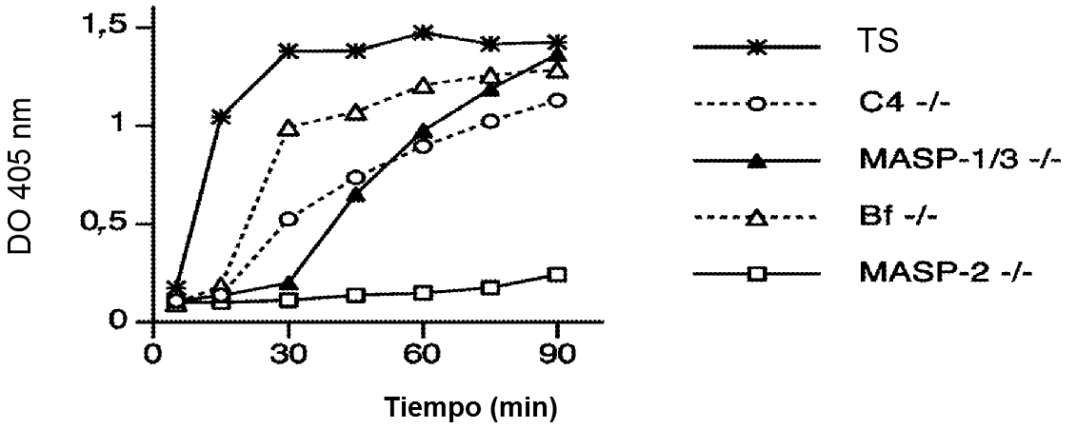

Fig.29B.

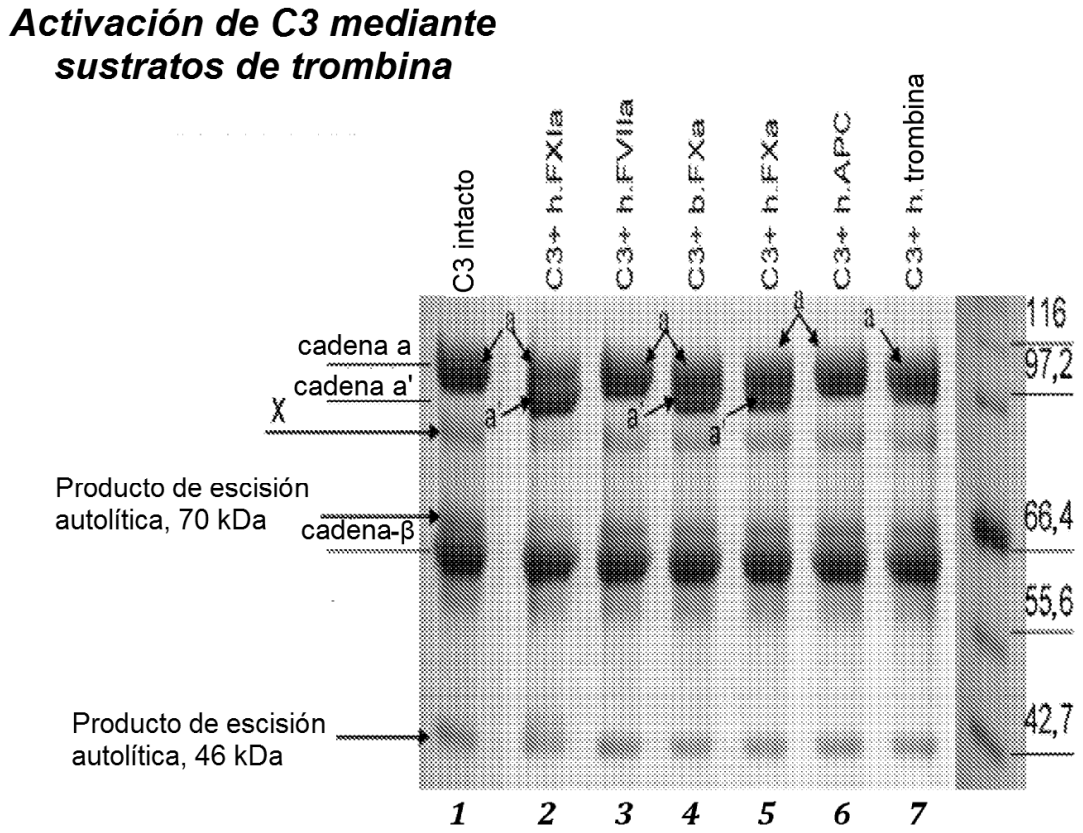
Activación de C3 mediante sustratos de trombina
C3 intacto
C3+ h.FXIa
C3+ h.FVIIa
C3+ b.FXa
C3+ h.FXa
C3+ h.APC
C3+ h. trombina
cadena a
cadena a'
X
Producto de escisión autolítica, 70 kDa
cadena-β
Producto de escisión autolítica, 46 kDa
116
97,2
66,4
55,6
42,7
1
2
3
4
5
6
7

Fig.30

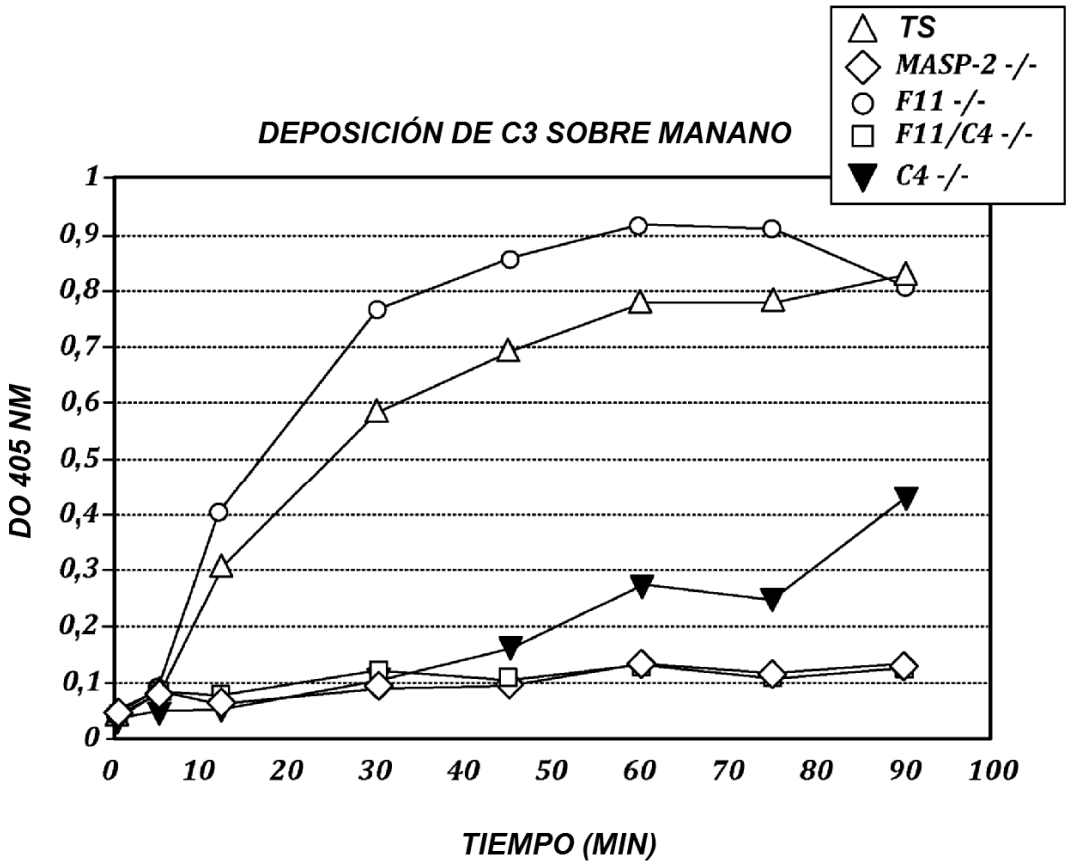
DEPOSICIÓN DE C3 SOBRE MANANO
TS
MASP-2 -/-
F11 -/-
F11/C4 -/-
C4 -/-
DO 405 NM
1
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
TIEMPO (MIN)

Fig.31.

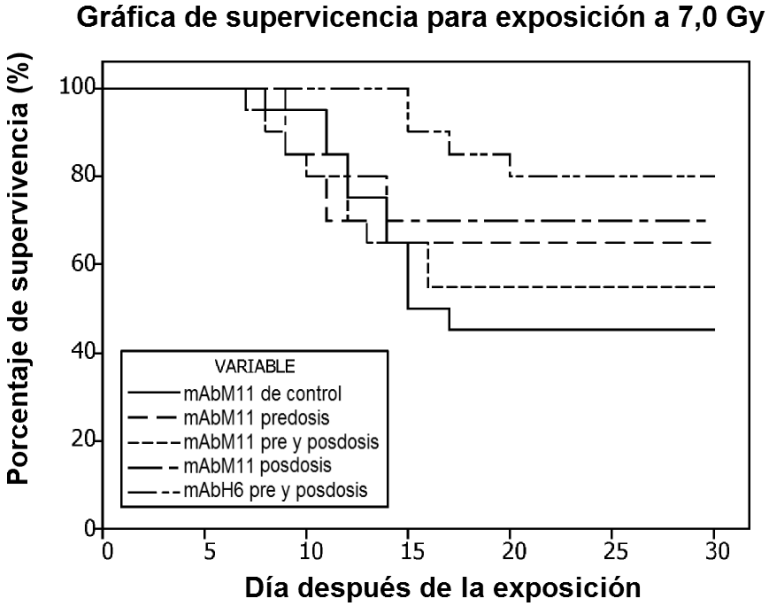

Fig.32A.

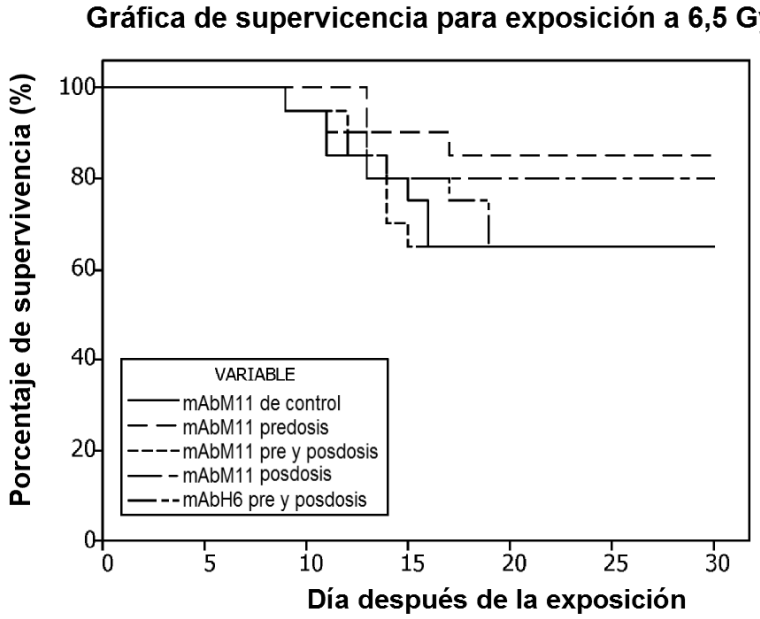

Fig.32B.

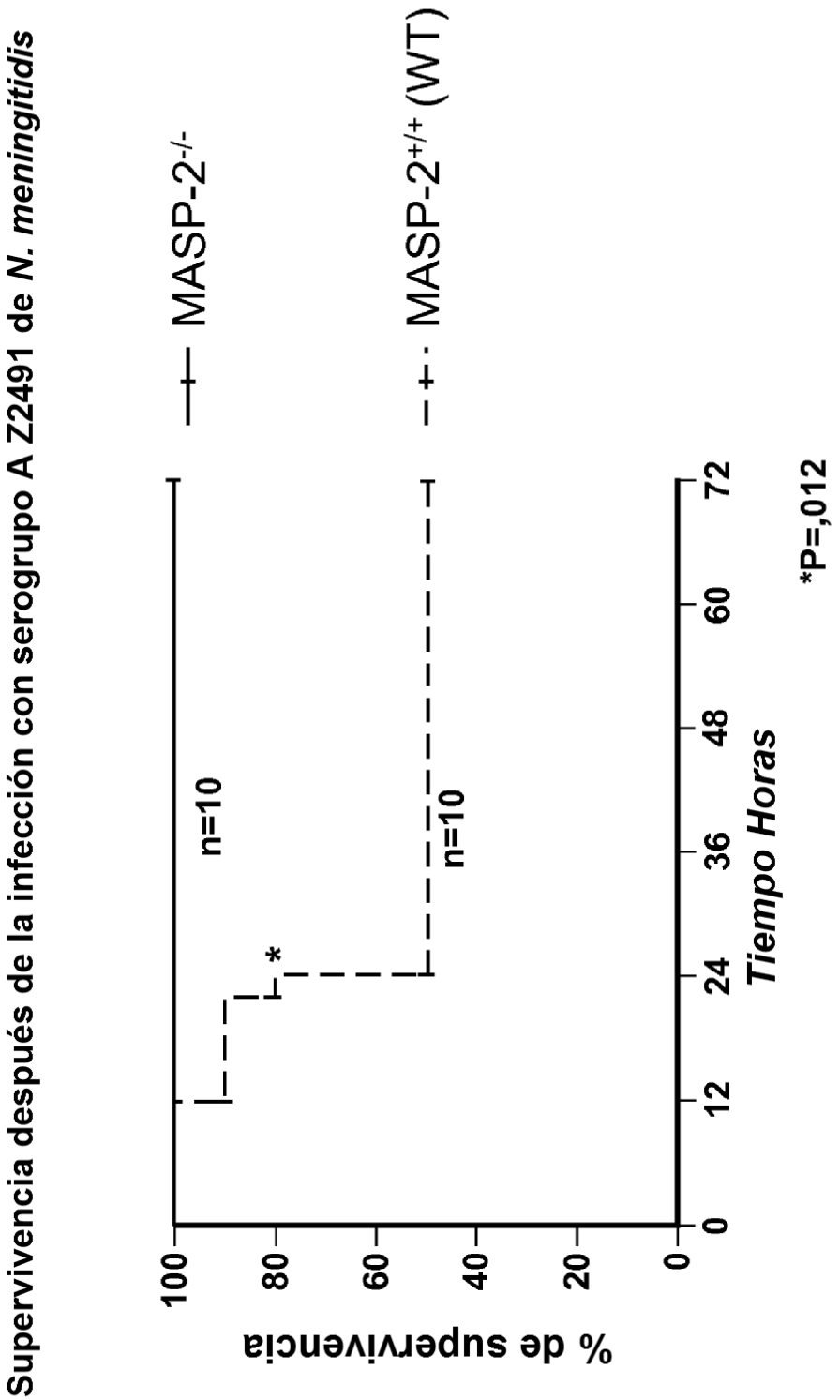
Supervivencia después de la infección con serogrupo A Z2491 de N. meningitidis
MASP-2-/-
MASP-2+/+ (WT)
n=10
n=10
*
% de supervivencia
100
80
60
40
20
0
0
12
24
36
48
60
72
Tiempo Horas
*P=,012

Fig.33.

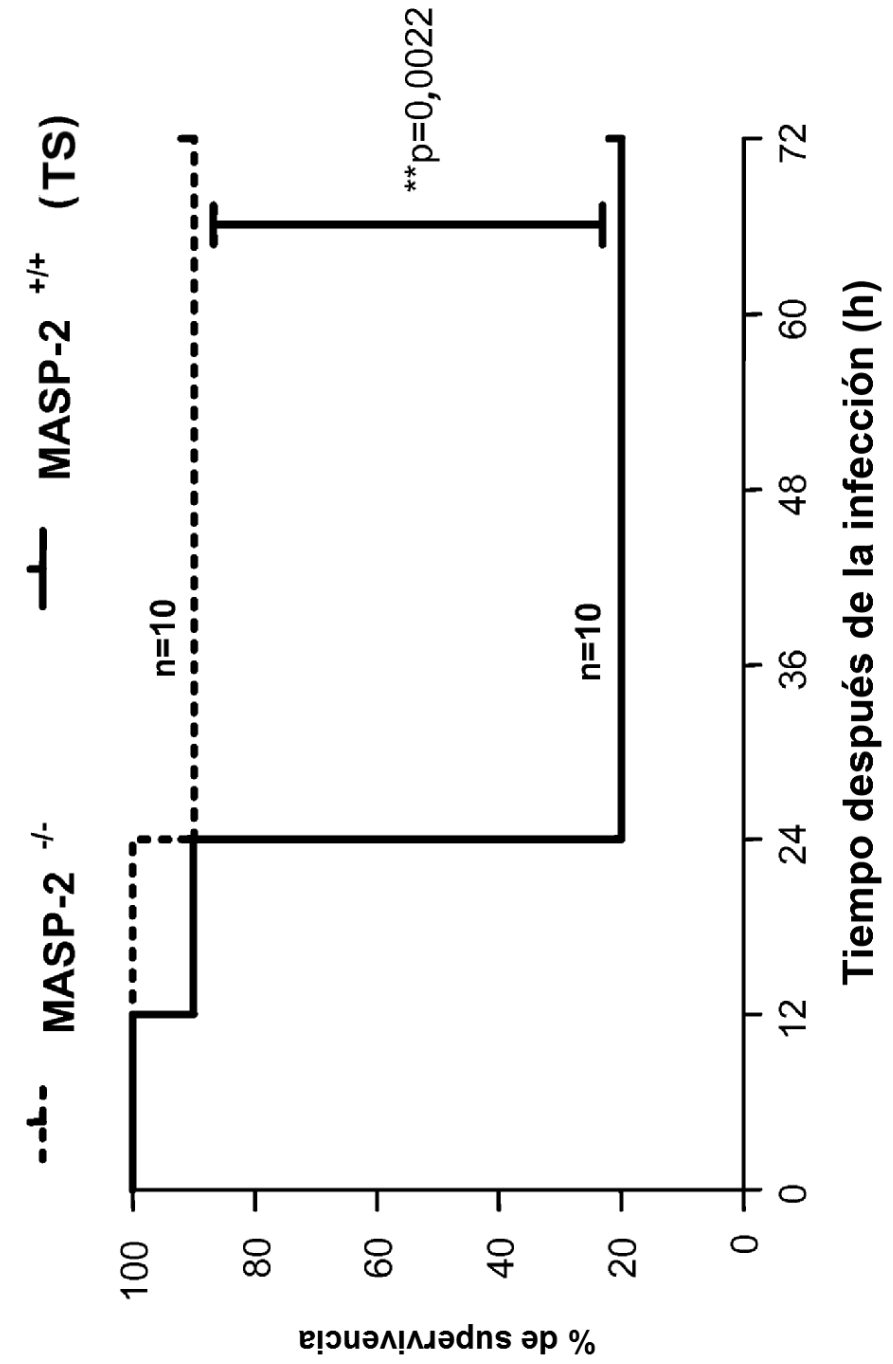
MASP-2 -/-
MASP-2 +/+ (TS)
**p=0,0022
n=10
n=10
% de supervivencia
Tiempo después de la infección (h)
0
20
40
60
80
100
0
12
24
36
48
60
72

Fig.34.

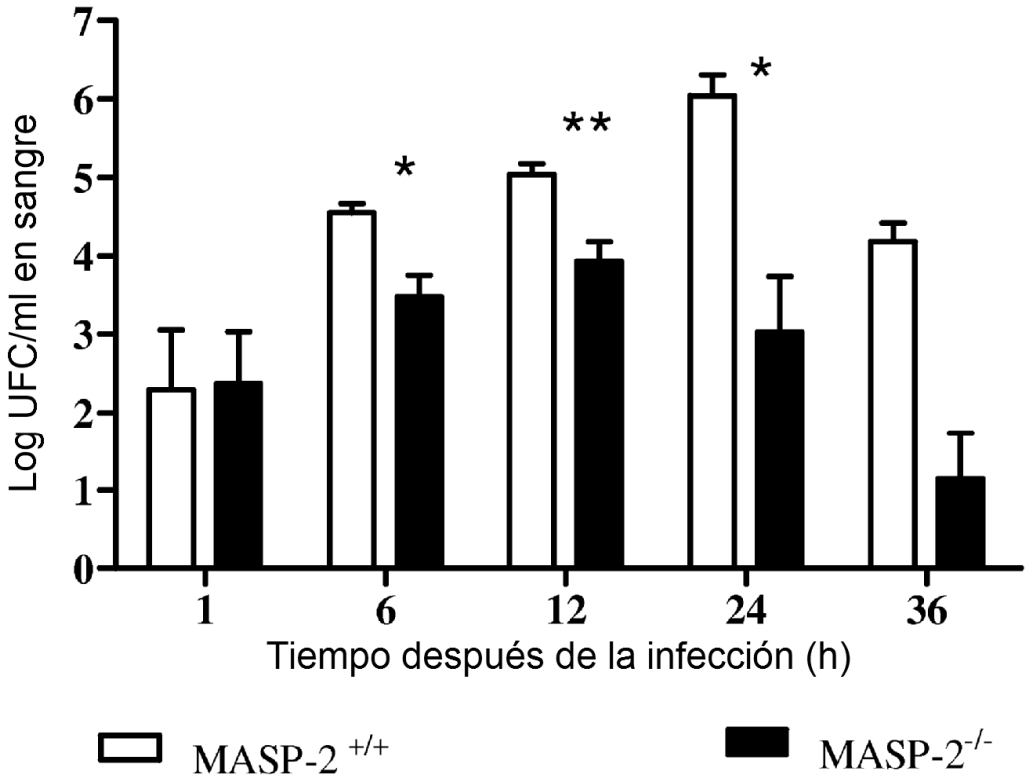
Log UFC/ml en sangre
0
1
2
3
4
5
6
7
*
**
*
1
6
12
24
36
Tiempo después de la infección (h)
MASP-2 +/+
MASP-2-/-

Fig.35.

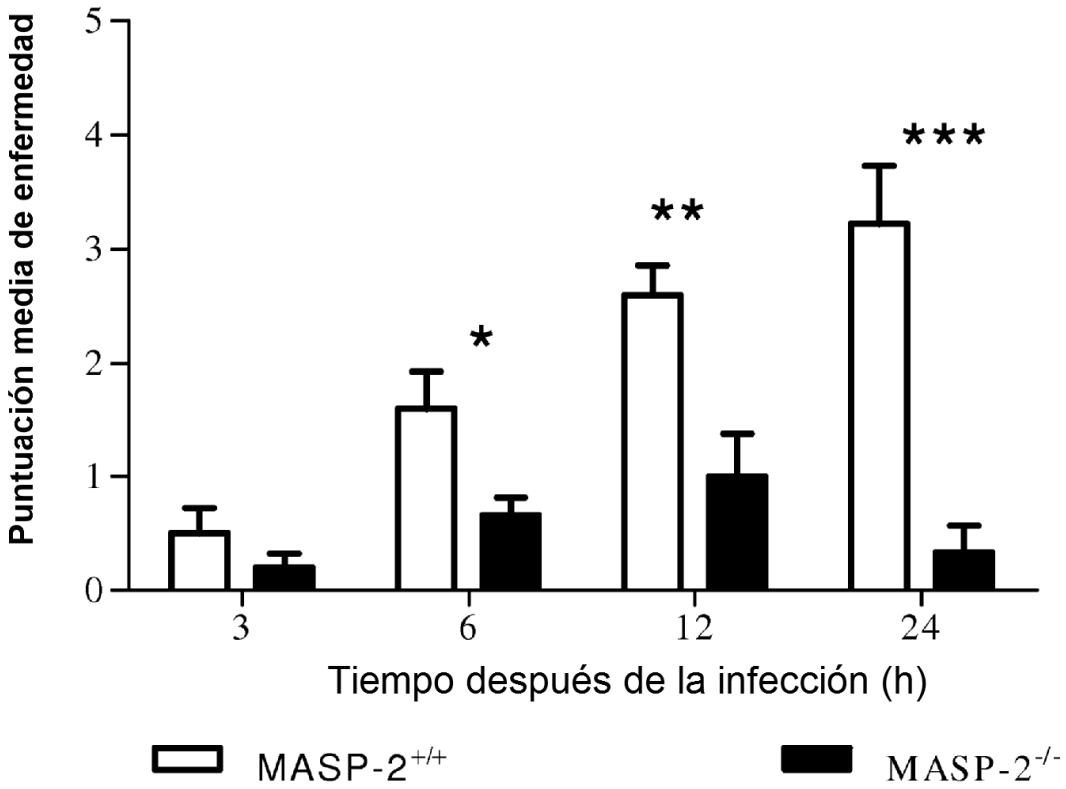
Puntuación media de enfermedad
5
4
3
2
1
0
*
**
***
3
6
12
24
Tiempo después de la infección (h)
MASP-2+/+
MASP-2-/-

Fig.36.

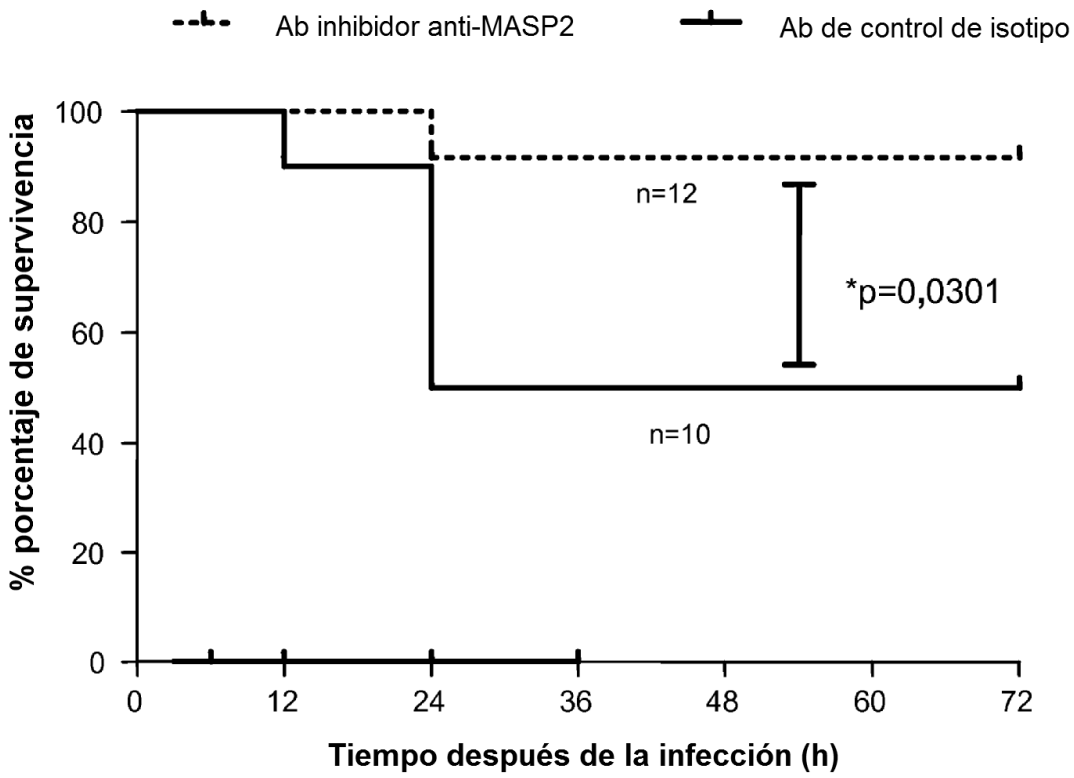
Ab inhibidor anti-MASP2
Ab de control de isotipo
% porcentaje de supervivencia
100
80
60
40
20
0
n=12
*p=0,0301
n=10
0
12
24
36
48
60
72
Tiempo después de la infección (h)

Fig.37.

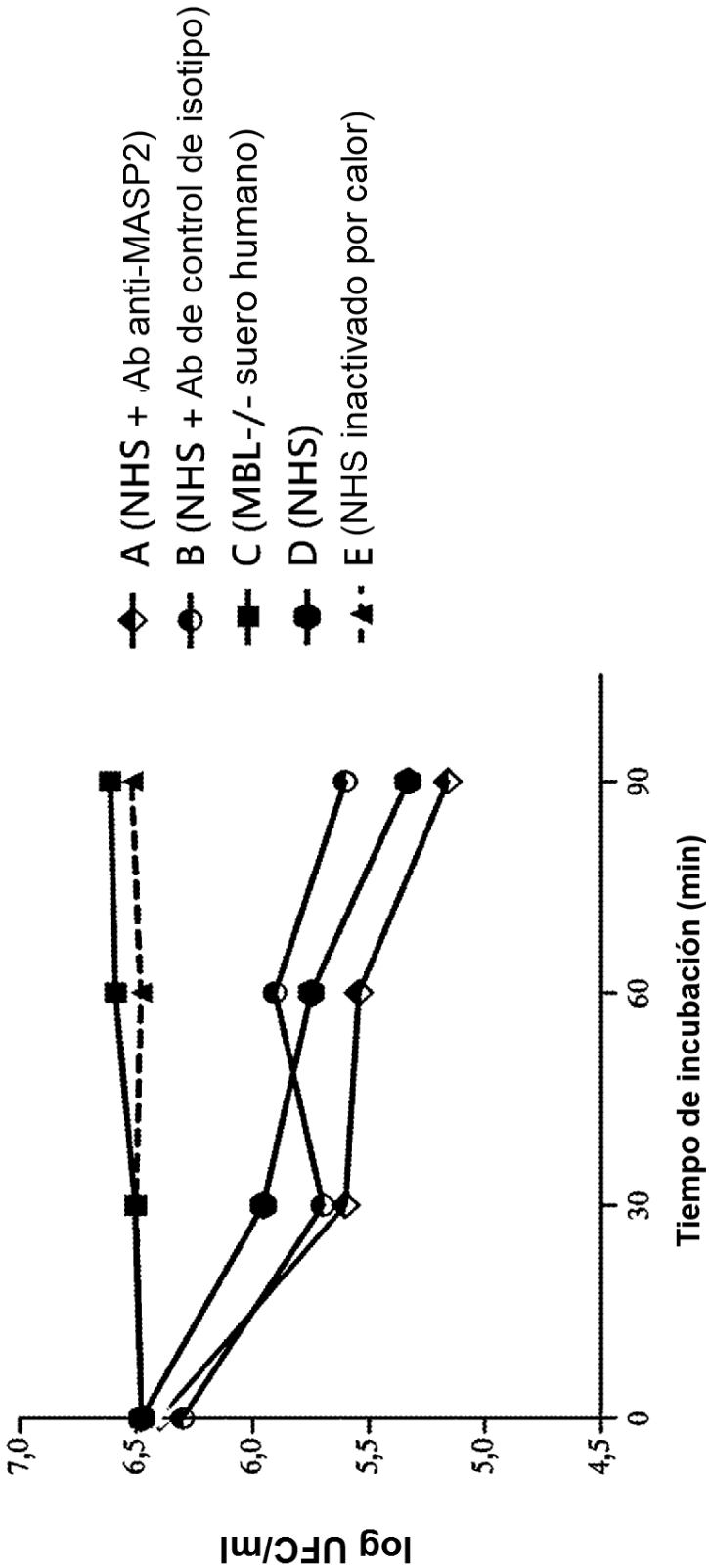
A (NHS + Ab anti-MASP2)
B (NHS + Ab de control de isotipo)
C (MBL-/- suero humano)
D (NHS)
E (NHS inactivado por calor)
log UFC/ml
7,0
6,5
6,0
5,5
5,0
4,5
0
30
60
90
Tiempo de incubación (min)

Fig.38.

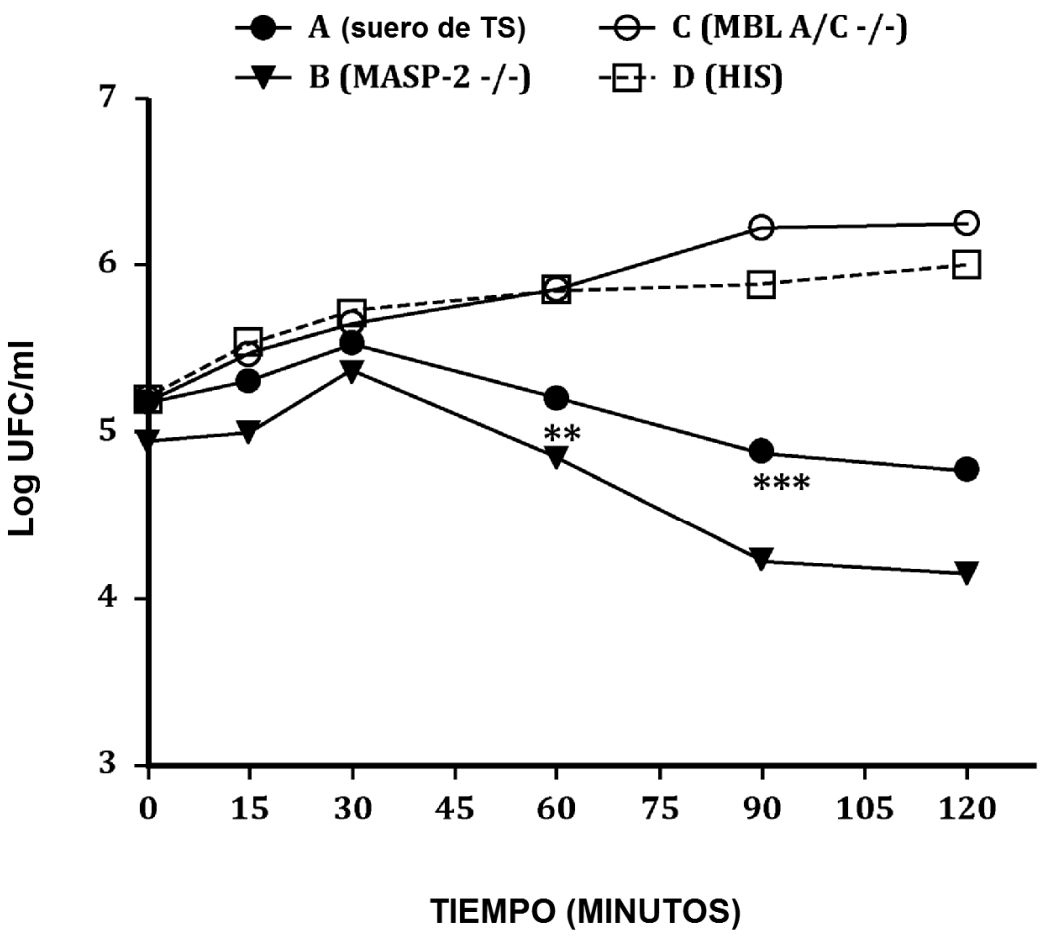
A (suero de TS)
C (MBL A/C -/-)
B (MASP-2 -/-)
D (HIS)
Log UFC/ml
7
6
5
4
3
0
15
30
45
60
75
90
105
120
**
***
TIEMPO (MINUTOS)

Fig.39.

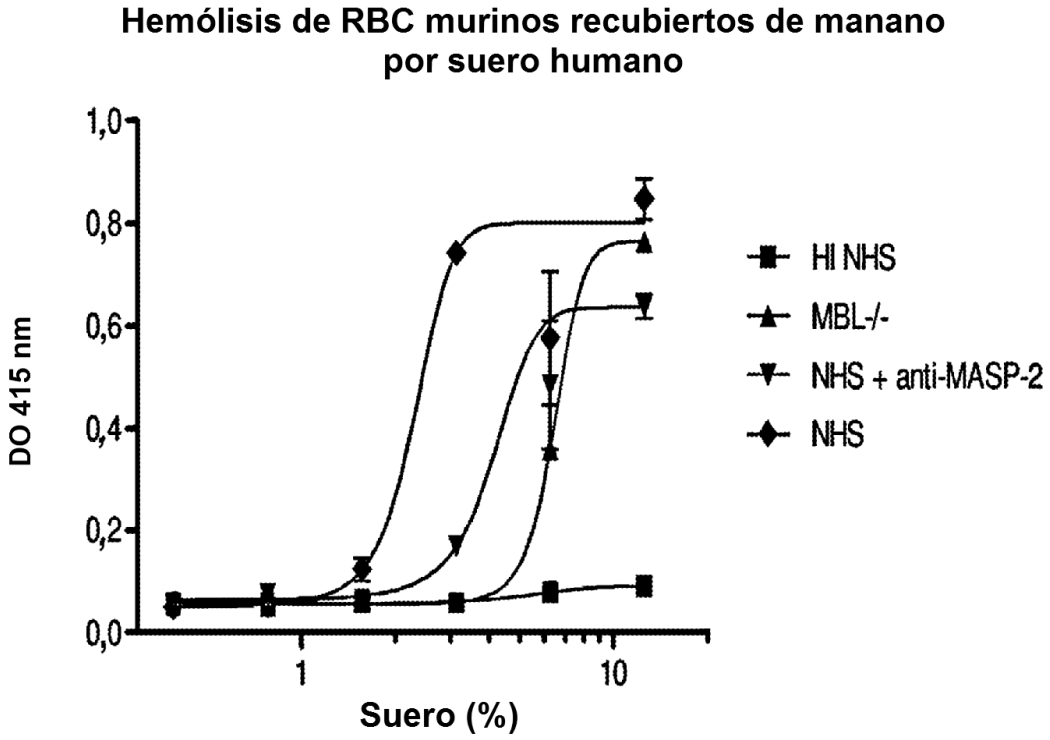
Hemólisis de RBC murinos recubiertos de manano
por suero humano
DO 415 nm
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
1
10
Suero (%)
HI NHS
MBL-/-
NHS + anti-MASP-2
NHS

Fig.40.

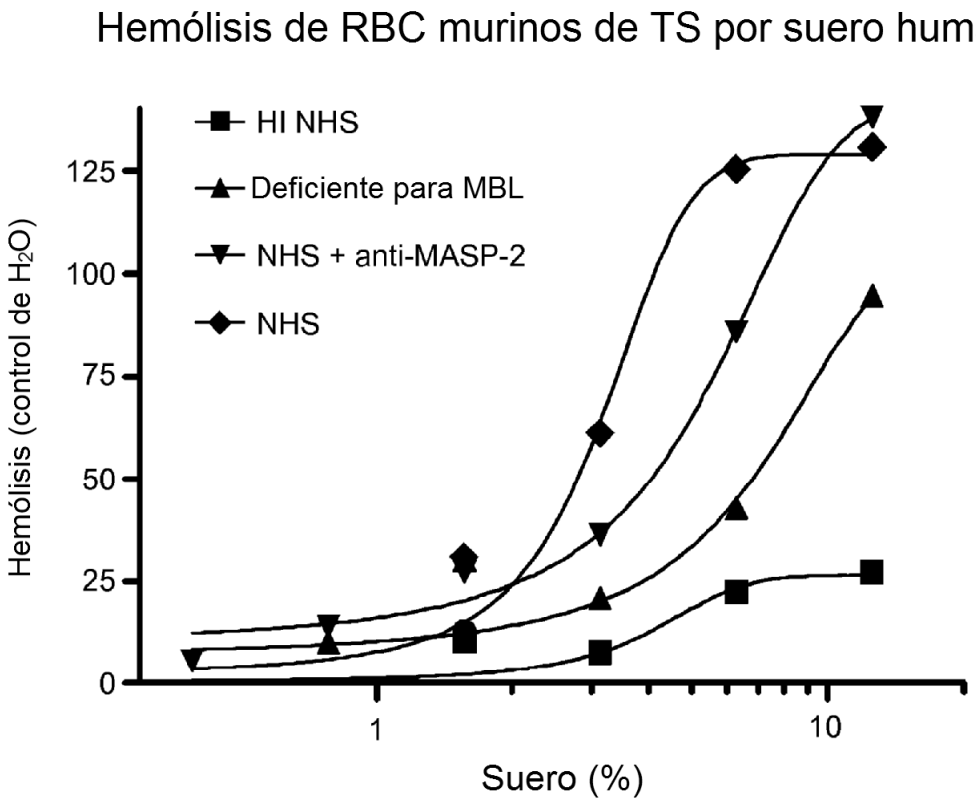
Hemólisis de RBC murinos de TS por suero humano
HI NHS
Deficiente para MBL
NHS + anti-MASP-2
NHS
Hemólisis (control de H2O)
125
100
75
50
25
0
1
10
Suero (%)

Fig.41.

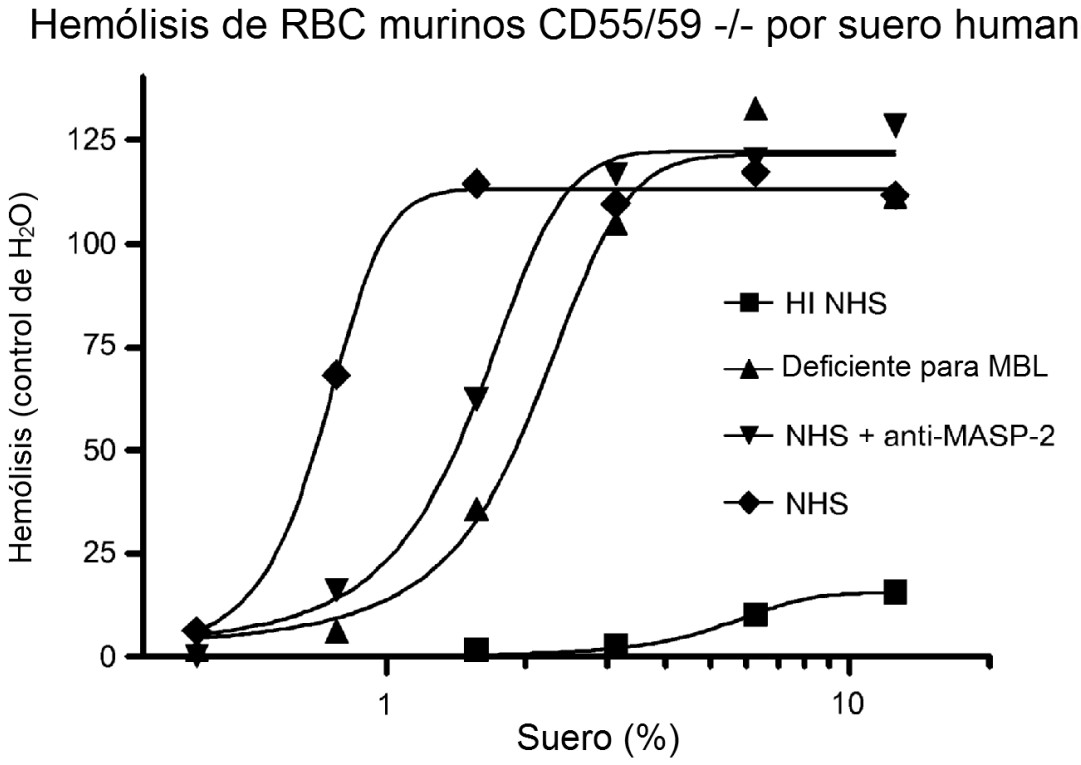
Hemólisis de RBC murinos CD55/59 -/- por suero humano
Hemólisis (control de H2O)
125
100
75
50
25
0
1
10
Suero (%)
HI NHS
Deficiente para MBL
NHS + anti-MASP-2
NHS

Fig.42.

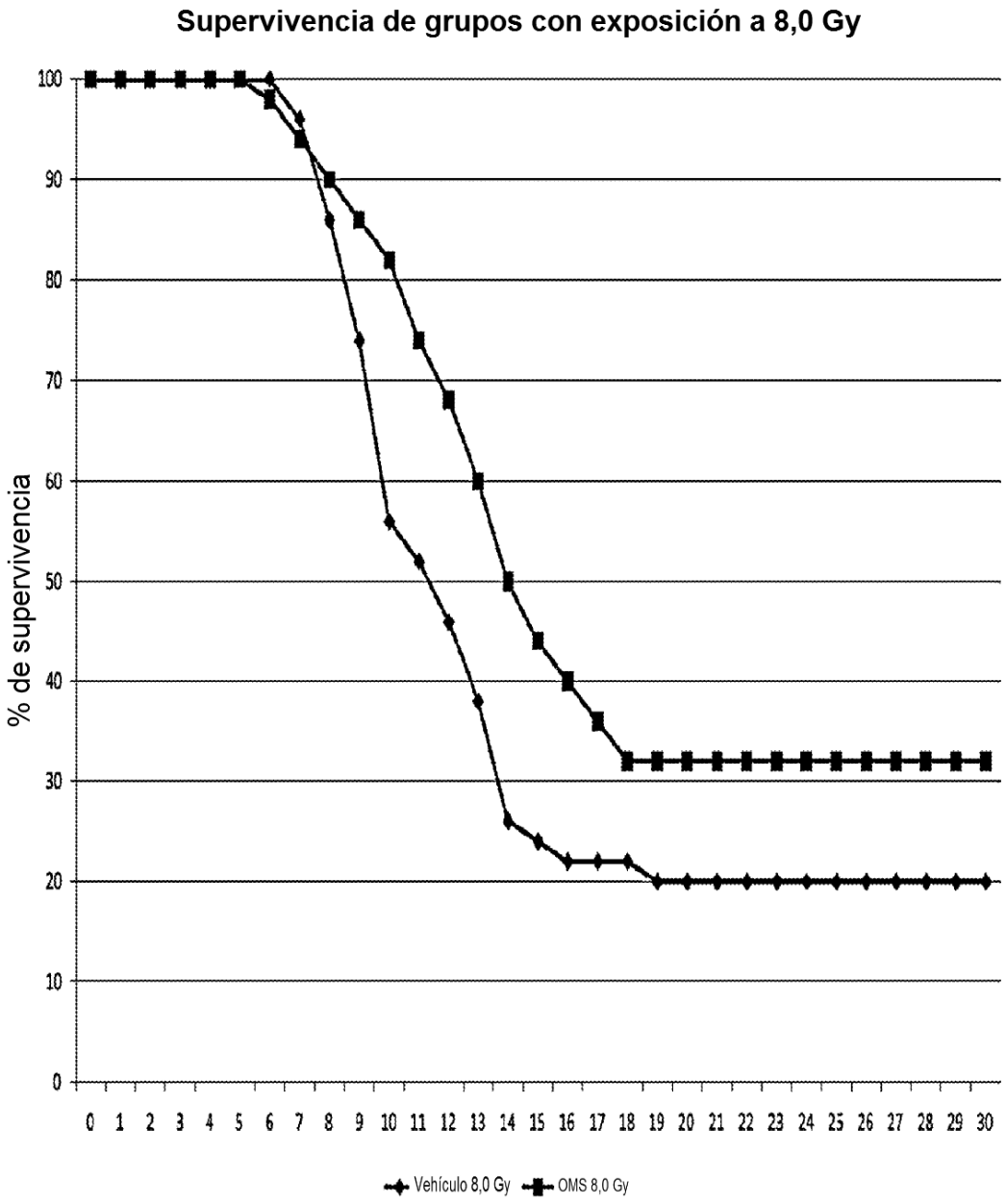
Supervivencia de grupos con exposición a 8,0 Gy
% de supervivencia
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
Vehículo 8,0 Gy
OMS 8,0 Gy

Fig.43.

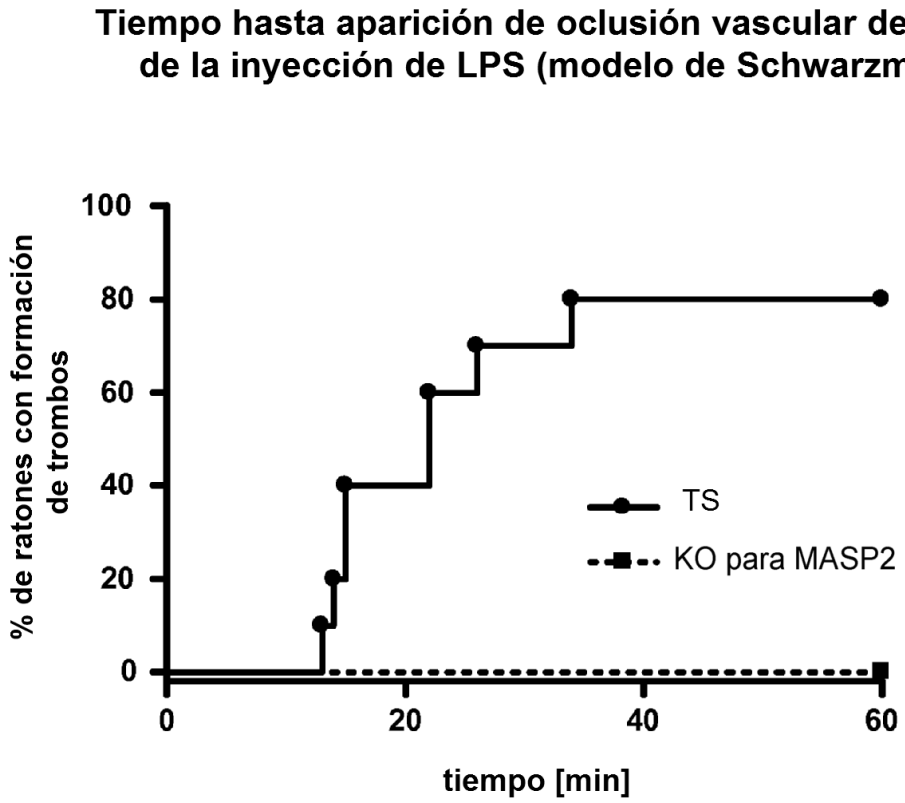
Tiempo hasta aparición de oclusión vascular después de la inyección de LPS (modelo de Schwarzman)
% de ratones con formación de trombos
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
tiempo [min]
TS
KO para MASP2

Fig.44.

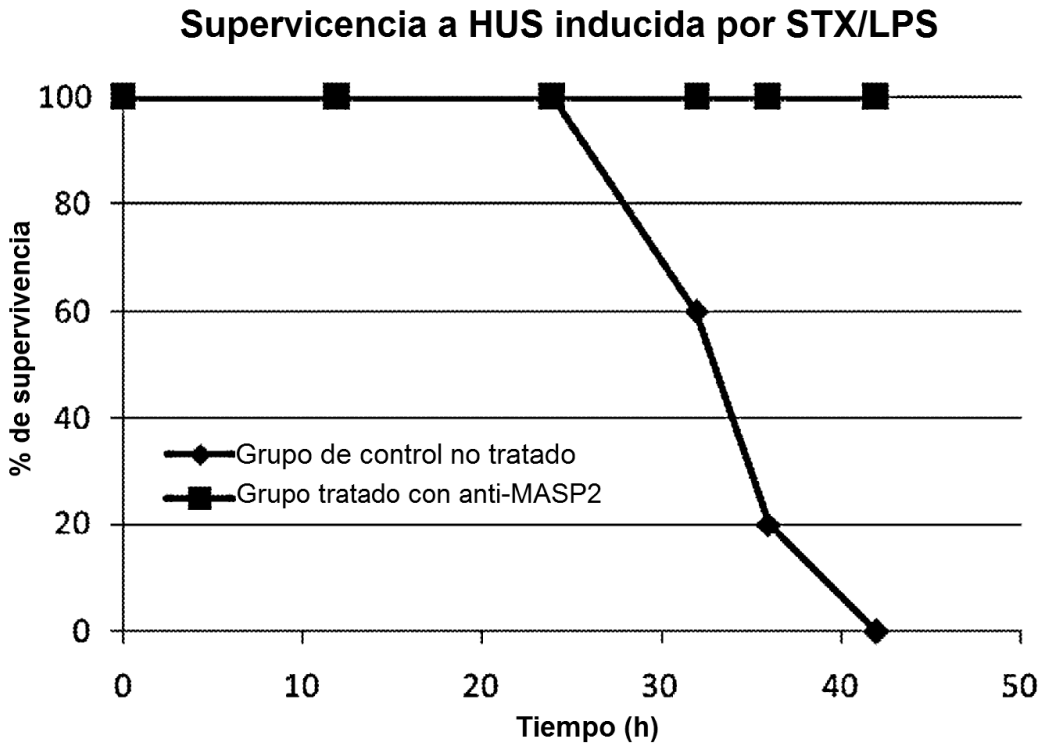
Supervicencia a HUS inducida por STX/LPS
100
80
60
40
20
0
% de supervivencia
Grupo de control no tratado
Grupo tratado con anti-MASP2
0
10
20
30
40
50
Tiempo (h)

Fig.45.