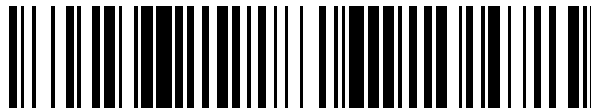


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 748**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2010 PCT/EP2010/060279**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2011 WO11006982**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2010 E 10737833 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2454281**

54 Título: **Isoformas de MASP como inhibidores de la activación del complemento**

30 Prioridad:

**17.07.2009 EP 09165770**  
**01.10.2009 EP 09171941**  
**05.03.2010 US 311049 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.04.2019**

73 Titular/es:

**OMEROS CORPORATION (100.0%)**  
**201 Elliott Avenue West**  
**Seattle, WA 98119, US**

72 Inventor/es:

**GARRED, PETER;**  
**GLUE, TINA HUMMELSHØJ y**  
**SKJØDT, MIKKEL-OLE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 709 748 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Isoformas de MASP como inhibidores de la activación del complemento

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos asociados a ficolina y polipéptidos derivados de estos polipéptidos asociados a ficolina para el uso en el tratamiento de afecciones asociadas con inflamación, apoptosis, autoinmunidad, coagulación, enfermedades tromboticas o coagulopáticas relacionadas. La presente invención se refiere además a anticuerpos que reconocen tales novedosos polipéptidos asociados a ficolina y polipéptidos derivados de los mismos, a moléculas de ácido nucleico que codifican tales polipéptidos, a vectores y a células huésped utilizadas en la producción de los polipéptidos.

**Antecedentes de la invención**

10 La activación del sistema del complemento (C) se realiza a través de tres vías de iniciación diferentes: La ruta alternativa (AP), el clásico (CP), o la de a lectina (LCP). La activación de AP se produce en las superficies extrañas y es causada por una lenta hidrólisis espontánea de C3 y la actividad de los factores properdina, el factor B y el factor D para formar la C3 convertasa C3bBb funcional. La AP también funciona como una ruta de amplificación (el bucle de amplificación) de las otras dos vías. Recientemente se ha demostrado que el ensamblaje de la convertasa alternativa también puede iniciarse mediante la unión no covalente de properdina a algunas superficies objetivo. Por otro lado, la activación de la CP se inicia cuando C1q se une a inmunoglobulinas en complejos con antígenos, que desencadena la activación de las serina proteasas C1r y C1s asociadas a C1q. C1s escinde y activa C4 y C2 para formar la CP C3 convertasa C4b2a. La LCP se activa cuando la lectina de unión a manosa (MBL) o las ficolinas se unen a patrones restringidos de carbohidratos o compuestos acetilados, por ejemplo, en la superficie de los microorganismos o cuando se exponen en células huésped moribundas. Al unirse al ligando, la serina proteasa asociada MASP-2 activa y escinde C4 y C2 para formar la LCP C3 convertasa C4b2a. Se ha sugerido que la función de MASP-1 implica una estabilización de la escisión de MASP-2 de C2 y también la escisión directa de grado bajo de C3. Sin embargo, otros estudios relacionan la función y la actividad de MASP-1 y MASP-2 con una comunicación del sistema de coagulación que involucra a la protombina, al fibrinógeno y al factor XIII. Usando ratones defectivos en *MASP1/3*, recientemente se demostró que MASP-1 de hecho contribuye a la actividad del complemento. La función exacta de la serina proteasa asociada a MBL más recientemente descubierta MASP-3 aún no se ha dilucidado. Estudios que indican que MASP-3 se asocia con un rango limitado de oligómeros de MBL y que MASP-3 y la pequeña proteína asociada a MBL (sMAP) están involucrados en la regulación o inhibición de la activación del complemento de LCP dependiente de MBL.

15 MASP-1 y -3 derivan del mismo gen *MASP1/3* (presente en el cromosoma 3q27-q28) a través de corte y empalme diferencial. Contienen una cadena A idéntica a excepción de 15 residuos C-terminales. La cadena A se compone de dos dominios CUB (C1r/C1s, urquina-EGF, proteína morfogenética ósea) separados por un dominio de EGF (factor de crecimiento epidérmico) y seguidos por dos dominios CCP (proteína de control del complemento). La cadena B que incluye el dominio de serina proteasa es diferente para MASP-1 y MASP-3. MASP-2 y el sMAP también derivan del mismo gen (presente en el cromosoma 1p36-p36.2), donde el sMAP es una forma truncada que carece del dominio de serina proteasa y una parte importante de la cadena A. Se ha demostrado que el gen *MASP1/3* es polimórfico, pero la importancia funcional de esto todavía es poco conocida. Sin embargo, existe cierta evidencia de que los polimorfismos en el gen *MASP2/sMAP* están asociados con un mayor riesgo de infecciones. La expresión de las MASP se localiza en los hepatocitos del hígado, pero un estudio reciente ha descrito que el ARNm de MASP-3 humana (como el único ARNm de MASP) se expresaba en una amplia gama de tejidos.

El documento US2007093443 parece desvelar la provisión de proteasas modificadas que inhiben la activación del complemento. Desvela un procedimiento de modulación de la activación del complemento, que comprende poner en contacto una proteasa no del complemento con uno o más sustratos diana de una ruta del complemento.

45 BASE DE DATOS UniProt [En línea] 7 de julio de 2009 (07/07/2009), obtenido de la EBI con número de acceso UNIPROT:B4DUI7 el número de acceso en la base de datos B4DUI7 desvela la proteína humana 354 AA que es muy similar al componente de activación del complemento del factor reactivo con Ra (EC 3.4.21.-).

"Mannan-binding lectin serine protease 2" recuperado del número de acceso EBI UNIPROT:000187 n.º de acceso en la base de datos 000187 desvela la lectina serina proteasas 2 de unión a manano humana (EC=3.4.21.104) [0010]

50 "Human MBLD4 associated serine protease-2 CUBI-EGF-CUBII domain, SEQ ID 10." XP002600315 recuperado del número de acceso EBI GSP:AGE19338 n.º de acceso en la base de datos AGE19338 desvela la serina proteasa 2 asociada a MBL humana AA 293-dominio CUBI-EGF-CUBII domain BEINROHR LASZLO y col.: TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE DEC 2008 LNKDPUBMED:18977695, vol. 14, n.º 12, Diciembre de 2008 (2008-12), páginas 511-521, desvela C1, MBL-MASP e inhibidor de C1: novedosos enfoques para atacar la inflamación mediada por el complemento. FUJITA TEIZO y col.: IMMUNOLOGICAL REVIEWS APR 2004 LNKDPUBMED:15199963, vol. 198, Abril 2004 (2004-04), página 185-202, desvela el papel en la inmunidad innata y la evolución de la ruta del complemento de lectina. El documento US 2005/032157 desvela la disposición de la preparación recombinante del fragmento C-terminal plegado no glicosilado de serina proteasa multidominio, produciendo un fragmento en el huésped bacteriano utilizando un vector que expresa el fragmento codificante del

inserto de ADN, obteniendo el fragmento en forma plegada del huésped.

Teillet Feta.," Journal of Biological Chemistry, VOL.283, NR.37, PG. 25715 - 25724 desvela la estructura del dominio CUB1 -EGF-CUB2 de MASP-1/3 humana y la identificación de sus sitios de interacción con lectinas y ficolinas de unión a manano.

5 **Objeto de la invención**

Es un objeto de las realizaciones de la invención proporcionar polipéptidos adecuados para el tratamiento de afecciones asociadas con inflamación, apoptosis, autoinmunidad, coagulación, y/o enfermedades tromboticas o coagulopáticas relacionadas.

**Sumario de la invención**

10 El inventor o inventores descubrieron que los nuevos polipéptidos que se asocian con las moléculas de reconocimiento de la ruta del complemento de lectina, así como los polipéptidos, tales como los fragmentos derivados de los mismos se pueden usar en el tratamiento de afecciones médicas específicas asociadas con inflamación, apoptosis, autoinmunidad, coagulación, y/o enfermedades tromboticas o coagulopáticas relacionadas.

15 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido asociado a ficolina aislado que tiene en su extremo C-terminal la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos 20-380 de la SEQ ID NO: 1, o una variante funcional de la misma que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de acuerdo con la invención.

20 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 70 % idéntica a la secuencia de la SEQ NO:2.

25 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un vector que comprende una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una célula huésped que comprende un vector que comprende una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención.

30 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir el polipéptido de acuerdo con la invención, comprendiendo el procedimiento cultivar una célula de acuerdo con la invención en un medio de crecimiento apropiado en condiciones que permitan la expresión de la construcción de polinucleótido y recuperar el polipéptido resultante del medio de cultivo.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido de acuerdo con la invención.

35 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar un polipéptido de acuerdo con la presente invención en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento:

- 40 a) obtener una muestra biológica;  
b) poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo de acuerdo con la invención; y  
c) detectar complejos del anticuerpo y el polipéptido, si hay alguno;

como una indicación de la presencia del polipéptido en la muestra.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento.

**Leyendas de las figuras**

45 Figura 1: Transcripción alternativa del gen de MASP-1. Se detectó una transcripción alternativa del gen *MASP1* en el ADNc de hígado. Los transcritos de *MASP1*, *MASP3* y *FAP* se amplificaron utilizando un cebador directo común ubicado en el exón 6 y los cebadores inversos específicos ubicados en el exón 12 (*MASP1*), el exón 11 (*MASP3*) y el exón 8a (*FAP*). *MASP1* genera un fragmento de 500 pb, *MASP3* genera un fragmento de 506 pb y *FAP* genera un fragmento de 309 pb.

50 Figura 2: Corte y empalme alternativo del gen *MASP1*. *MASP1* se genera mediante corte y empalme de 8a y el

exón 11, conteniendo ambos una secuencia de codón de terminación (marcada con recuadros negros). La secuencia de *MASP1* contiene un codón de terminación en el exón 17. *MASP3* se genera mediante el corte y empalme del exón 8a y *FAP* se genera si no se produce el corte y empalme del exón 8a. La proteína FAP contiene los dos dominios CUB, el dominio EFG y el primer dominio CCP1.

5 Figura 3: Expresión tisular del fragmento FAP. Las distribuciones tisulares de los genes de *MASP-1*, *MASP3* y *FAP* se investigaron en paneles de ADNc de Clontech. Los transcritos de *MASP-1*, *MASP-3* y *FAP* se amplificaron utilizando un cebador directo común y cebadores inversos específicos. Se usó *GADPH* como gen de referencia. Los tres genes estaban altamente expresados en el hígado y, además, el de *FAP* se expresaron fuertemente en tejido cardíaco (marcado con flechas negras). Se detectó una expresión menor del gen de *FAP*  
10 en el cerebro, colon, próstata, músculo esquelético e intestino delgado (marcado con flechas blancas).

Figura 4: Alineación de *MASP-1*, *MASP-3* y *FAP*. Las secuencias proteicas de *MASP-1*, *MASP-3* y *FAP* se alinearon utilizando el software BioEdit. *MASP-1* y *MASP-3* contienen diferentes dominios de serina proteasa en C-terminal, mientras que *FAP* no contiene ningún dominio de serina proteasa. En su lugar, la proteína contiene 17 aminoácidos nuevos en la región C-terminal.

15 Figura 5: Secuencia de ADNc y secuencia proteica correspondiente de *FAP*. La secuencia de ADNc se muestra en la fila superior y la secuencia proteica correspondiente se muestra a continuación. Las regiones de los exones están divididas por líneas verticales negras. Los aminoácidos que se cree que están involucrados en la unión a MBL/ficolinas están marcados con recuadros de color amarillo claro.

20 Figura 6: Activación del complemento *MASP-1*. Los MBL humanos se incubaron con una cantidad mayor de *MASP-1*. *MASP-1* pudo activar las proteínas del complemento C3 y C4.

Figura 7: Activación del complemento *MASP-2*. Los MBL humanos se incubaron con una cantidad mayor de *MASP-2*. *MASP-2* pudo activar fuertemente las proteínas del complemento C3 y C4.

Figura 8: Inhibición de *MASP-3* del complemento. Los MBL humanos se incubaron con una cantidad mayor de *MASP-3*. *MASP-3* pudo inhibir la activación de las proteínas del complemento C3 y C4.

25 Figura 9: Inmunoprecipitación. Inmunoprecipitación de Ficolina/MBL en suero con el mAb anti-MBL 131-11, clon 219 anti-ficolina-2 y clon 334 anti-ficolina-3. Seguido por la separación magnética de esferas Dynal, SDS-PAGE, transferencia de tipo Western y clon 8B3 anti-*MASP-1*/*MASP-3* marcada como anticuerpo de señal.

30 Figura 10: La *FAP* interacciona con la ficolina cuando se une a la seroalbúmina humana acetilada (AcHSA). Unión de ficolina sérica eluida a AcHSA. Transferencia de tipo Western con clon 8B3 anti-*MASP-1*/*MASP-3* marcado como anticuerpo de señal.

Figura 11: Constantes cinéticas y de disociación para la interacción entre *MASP-1* y *MASP-3* y ficolina-2 (Hummelshøj T y col., Mol. Immunol., 2007).

Figura 12: Alineación de *GULF* y los 17 aminoácidos únicos de *FAP*.

35 Figura 13: Activación del complemento de C4 en un ensayo ELISA de manano/MBL. Los pocillos recubiertos con manano se incubaron con o sin MBL humana recombinantes, seguido de incubación con suero deficiente en MBL homocigoto en diluciones en serie. La deposición de C4 se midió utilizando anticuerpos policlonales anti-C4c. Las barras de error indican dos veces las desviaciones estándar en determinaciones dobles de cada punto en las curvas.

40 Figura 14: Activación del complemento de C4 en un ensayo ELISA de BSA acetilada/ficolina-3. Los pocillos recubiertos con AcBSA se incubaron con o sin ficolina-3 humana recombinante, seguido de incubación con suero deficiente en ficolina-3 homocigoto en diluciones en serie. La deposición de C4 se midió utilizando anticuerpos policlonales anti-C4c. Las barras de error indican dos veces las desviaciones estándar en determinaciones dobles de cada punto en las curvas.

45 Figura 15: Activación del complemento de C4 en un ensayo ELISA de manano/MBL. Los pocillos recubiertos con manano se incubaron con MBL humana recombinante seguido de incubación con diluciones en serie de r*MASP-1* como sobrenadantes de cultivo en medio sin suero en una dimensión. El suero deficiente en MBL homocigoto se incubó posteriormente en diluciones en serie en la segunda dimensión. La deposición de C4 se midió utilizando anticuerpos policlonales anti-C4c. Las barras de error indican dos veces las desviaciones estándar en determinaciones dobles de cada punto en las curvas.

50 Figura 16: Activación del complemento de C4 en un ensayo ELISA de BSA Ac/Ficolina-3. Los pocillos recubiertos con AcBSA se incubaron con ficolina-3 humana recombinante seguido de incubación con diluciones en serie de r*MASP-1* como sobrenadantes de cultivo en medio sin suero en una dimensión. El suero deficiente en ficolina-3 homocigoto se incubó posteriormente en diluciones en serie en la segunda dimensión. La deposición de C4 se midió utilizando anticuerpos policlonales anti-C4c. Las barras de error indican dos veces las desviaciones

estándar en determinaciones dobles de cada punto en las curvas.

Figura 17: Activación del complemento de C4 en un ELISA de manano/MBL. Los pocillos recubiertos con manano se incubaron con MBL humana recombinante seguido de incubación con diluciones en serie de rMASP-2 como sobrenadantes de cultivo en medio sin suero en una dimensión. El suero deficiente en MBL homocigoto se incubó posteriormente en diluciones en serie en la segunda dimensión. La deposición de C4 se midió utilizando anticuerpos policlonales anti-C4c. Las barras de error indican dos veces las desviaciones estándar en determinaciones dobles de cada punto en las curvas.

Figura 18: Activación del complemento de C4 en un ensayo ELISA de BSA Ac/Ficolina-3. Los pocillos recubiertos con AcBSA se incubaron con ficolina-3 humana recombinante seguido de incubación con diluciones en serie de rMASP-2 como sobrenadantes de cultivo en medio sin suero en una dimensión. El suero deficiente en ficolina-3 homocigoto se incubó posteriormente en diluciones en serie en la segunda dimensión. La deposición de C4 se midió utilizando anticuerpos policlonales anti-C4c. Las barras de error indican dos veces las desviaciones estándar en determinaciones dobles de cada punto en las curvas.

Figura 19: Activación del complemento de C4 en un ensayo ELISA de manano/MBL. Los pocillos recubiertos con manano se incubaron con MBL humana recombinante seguido de incubación con diluciones en serie de rMASP-3 como sobrenadantes de cultivo en medio sin suero en una dimensión. El suero deficiente en MBL homocigoto se incubó posteriormente en diluciones en serie en la segunda dimensión. La deposición de C4 se midió utilizando anticuerpos policlonales anti-C4c. Las barras de error indican dos veces las desviaciones estándar en determinaciones dobles de cada punto en las curvas.

Figura 20: Activación del complemento de C4 en un ensayo ELISA de BSA Ac/Ficolina-3. Los pocillos recubiertos con AcBSA se incubaron con ficolina-3 humana recombinante seguido de incubación con diluciones en serie de rMASP-3 como sobrenadantes de cultivo en medio sin suero en una dimensión. El suero deficiente en ficolina-3 homocigoto se incubó posteriormente en diluciones en serie en la segunda dimensión. La deposición de C4 se midió utilizando anticuerpos policlonales anti-C4c. Las barras de error indican dos veces las desviaciones estándar en determinaciones dobles de cada punto en las curvas.

Figura 21: Distribución tisular de *FAP*, *MASP1* y *MASP3*. *FAP* se expresó mucho más en el tejido cardíaco en comparación con *MASP1* y *MASP3*. *FAP* se expresó tres veces más en el tejido cardíaco en comparación con la expresión de *FAP* en el hígado. Además, se observó una mayor expresión de *FAP* en el hígado en comparación con la expresión de *MASP1* y *MASP3* en el hígado. También se detectó una considerable expresión de *FAP* en el cerebro, músculo esquelético y tejidos prostáticos. El experimento se realizó tres veces por duplicado. Se indican los errores estándar de la media.

Figura 22: Localización inmunohistoquímica hepática de MAP-1 utilizando antisuero policlonal de ratón generado contra los 17 residuos C-terminales específicos de *FAP* de la proteína. La tinción de control fue negativa. Varios anticuerpos policlonales diferentes producidos contra *FAP* (conejo y ratón) mostraron el mismo patrón de tinción.

Figura 23: Análisis inmunohistoquímico de la localización del tejido MAP-1 (OM X10). El panel izquierdo muestra la tinción con un mAb (12B11) a MAP-1. El panel derecho muestra la tinción de control de isotipo con un mAb IgG1k no relacionado. (A-B): Miocardio, (C-D): músculo esquelético, (E-F): muestra de hígado, (G-H): tejido aórtico. La barra de la esquina inferior derecha indica 50  $\mu$ m en todos los portaobjetos.

Figura 24: Inmunoprecipitación de los complejos séricos MAP-1 y MASP-1/3. (A) MAP-1 y MASP-1/3 se inmunoprecipitaron en suero usando el mAb 20C4 (anti MAP-1) y el mAb 8B3 (anti MASP-1/3, con un epítipo en la cadena pesada común). Las muestras reducidas se sometieron a electrotransferencia y se desarrollaron con pAb frente a MAP-1 o mAb biotinilados frente a ficolina-3 (FCN334) y MBL (Hyb 131-1). (B) Inmunoprecipitación con mAb frente a MBL (Hyb 131-11), ficolina-2 (FCN219) y ficolina-3 (FCN334) de 1 ml, 300  $\mu$ l y 100  $\mu$ l de suero, respectivamente (lado izquierdo). Los controles fueron MAP-1 precipitada en suero (sMAP-1) y rMAP-1 del sobrenadante de cultivo (rMAP-1) usando el mAb anti MAP-1 20C4 (lado derecho). Las muestras se analizaron mediante transferencia Western con sondas de pAb a MAP-1.

Figura 25: Influencia de MASP-2 y MAP-1 en MBL y deposición de C4 del complemento mediada por ficolina-3. Las deposiciones de C4 se midieron utilizando un anticuerpo policlonal contra C4 y se dan como valores de  $DO_{490-650}$  nm. Las barras de error indican dos veces la desviación estándar de determinaciones dobles. Concentraciones aproximadas de rMBL, rficolina-3, rMAP-1 y rMASP-2 se dan en las etiquetas de las figuras. (A) Reconstitución de la deposición de C4 en una superficie recubierta con manano utilizando suero deficiente en MBL con rMBL a 400 ng/ml. El control fue sin adición de rMBL. (B) Efecto dependiente de la dosis de rMASP-2 en la deposición de C4 mediada por rMBL. (C) Efecto dependiente de la dosis de rMAP-1 en la deposición de C4 mediada por rMBL. (D) Reconstitución de la deposición de C4 en una superficie recubierta con AcBSA usando suero deficiente en ficolina-3 con rficolina-3 a 400 ng/ml. El control fue sin adición de rficolina-3. (E) Efecto dependiente de la dosis de rMASP-2 sobre la deposición de C4 mediada por rficolina-3. (F) Efecto dependiente de la dosis de rMAP-1 sobre la deposición de C4 mediada por rficolina-3.

Figura 26: Influencia de MASP-2 y MAP-1 en la deposición del complemento C4 en un sistema puro. Se preincubó rMBL en una superficie de manano con diluciones en serie de rMASP-2 en la primera dimensión. Luego se aplicaron diluciones en serie de rMAP-1 en la segunda dimensión, seguido de la aplicación de C4 purificado a 1 µg/ml. Las deposiciones de C4 se midieron con un pAb frente a C4 y se dan como valores de DO<sub>490-650</sub> nm. Las barras de error indican dos veces la desviación estándar de determinaciones dobles. Las concentraciones aproximadas de rMAP-1 y rMASP-2 se dan en las etiquetas de la figura.

Figura 27: Análisis SDS-PAGE de rMAP-1. El lado izquierdo muestra el análisis de inmunotransferencia +/- tratamiento con N-glicosidasa F (ENDO-F). En el lado derecho se muestra la correspondiente tinción de coomassie.

Figura 28A, B. Curvas de calibración. A) Curva de calibración generada por el ELISA de mAb 20C4/mAb-8B3 de dos vías con diluciones en serie al doble de rMAP-1 aplicada a un grupo de suero humano normal con depleción de MAP-1 (pNHS) o diluciones en serie de rMAP-1 diluida en PBS/0,05 % de Tweem/EDTA 10 mM. Las barras de error indican dos veces la desviación estándar de ocho determinaciones. B) Inmunotransferencia de suero con depleción de MAP-1, suero humano normal y suero con depleción de MAP-1 enriquecido con rMAP-1.

Figura 29A-C. Concentración sérica de MAP-1. A) Concentraciones séricas e intervalo de distribución de MAP-1 en 100 donantes de sangre daneses. Nivel sérico medio: 240 ng/ml. Intervalo: 115-466 ng/ml; B) Correlación entre los niveles séricos de MASP-3 y MAP-1; C) Influencia de la congelación y descongelación del suero. El suero se congeló y descongeló en 8 rondas y se midió el nivel de MAP-1 para cada ronda. Las barras de error indican dos veces la desviación estándar de determinaciones dobles.

Figura 30. A) Niveles de asociación (en unidades relativas de D.O. a 490-650 nm) entre MAP-1 y MBL, ficolina-2 y ficolina-3, respectivamente en 100 donantes de sangre daneses. Los valores de p se obtuvieron mediante una prueba t no paramétrica de dos colas. B) Correlación entre los niveles séricos de MAP-1 y la asociación relativa a MBL, ficolina-2 y ficolina-3 (lado izquierdo). Correlación entre los niveles séricos de MBL, ficolina-2 y ficolina-3 y la asociación relativa con MAP-1 (lado derecho). Se calcularon los valores de correlación p y r utilizando la prueba de correlación de rango de Spearman no paramétrica.

Figura 31A-C. Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. A) Fracciones recolectadas (1-27) del suero sometido a un gradiente de densidad de sacarosa del 10-30 %. Las fracciones se analizaron mediante ELISA específico para: MAP-1, MASP-3, MBL, ficolina-2 y ficolina-3. Los picos de IgM (19S) e IgG (7S) en suero se indicaron en la parte superior del gráfico. B) Las fracciones número 8-23 analizadas por inmunotransferencia para: MAP-1, MASP-1, MASP-3, sMAP, MASP-2, MBL, ficolina-2 y ficolina-3. C) Las fracciones 1-27 analizadas por la capacidad de activar C4 humano aplicado exógenamente sobre BSA acetilada inmovilizada (un ligando de ficolina-3) o manano (un ligando de MBL).

### **Divulgación detallada de la invención**

Los presentes inventores han descubierto una nueva proteína plasmática de 40 kDa asociada con las moléculas de reconocimiento de la ruta del complemento de lectina e identificaron esto como una nueva variante de transcripción alternativa de MASP-1/MASP-3 que, a su vez, corresponde a la proteína plasmática recién descubierta.

Los inventores de la presente invención han demostrado que la nueva proteína (que los inventores han denominado FAP (proteína asociada a Ficolina A) o MAP-1 (MBL/proteína 1 asociada a Ficolina) carece de un dominio enzimático pero que contiene el dominio de unión ficolina/MBL y, por lo tanto, se espera que esté involucrado en la regulación e inhibición de las funciones de complemento y coagulación a través de la competición el desplazamiento de las MASP o, alternativamente, pero no se excluyen mutuamente como una proteína implicada en las funciones de captación o señalización.

La activación incontrolada del sistema del complemento y/o la cascada de coagulación está fuertemente asociada con resultados graves y fatales en diversas enfermedades que van desde la inflamación sistémica y la sepsis, al infarto de miocardio y autoinmunidad.

Se ha demostrado que la inhibición de la coagulación y la activación del complemento es una herramienta terapéutica prometedora.

La presente invención describe tanto un posible nuevo inhibidor de las funciones del complemento como de la coagulación. Sin embargo, los polipéptidos de acuerdo con la presente invención pueden tener otras funciones, tal como una función de captación y/o señalización. Además, puede usarse como un nuevo biomarcador en varios entornos de enfermedades, incluyendo enfermedades malignas, autoinmunes, y afecciones metabólicas y/o inflamatorias.

Los inventores de la presente invención han descubierto una proteína plasmática presente *in vivo* denominada Proteína Asociada a Ficolina (FAP) y demostraron que está asociada principalmente con las ficolinas (figura 9), pero que probablemente también esté asociada con la lectina que se une a la manosa. Al buscar en la base de datos de nucleótidos del NCBI, los inventores de la presente invención descubrieron una posible variante de transcripción que

5 corresponde a un fragmento truncado de MASP-1. Según esta secuencia, los cebadores se diseñaron para amplificar la nueva transcripción del gen putativo. Posteriormente, utilizando ADNc de hígado humano se identificó una nueva variante de transcripción alternativa del gen de MASP-1 (figura 1). Esta cepa de ARNm se secuenció y, en consecuencia, se determinó la secuencia de aminoácidos, que corresponde al peso molecular de la proteína observada en plasma/suero de 40 kDa (figura 5). La nueva proteína es parcialmente idéntica a MASP-1 y MASP-3, pero carece de un dominio de serina proteasa, pero contiene un nuevo exón que codifica 17 aminoácidos seguidos de un codón de terminación. Este exón se corta en el transcrito de MASP1 y MASP3 (figura 2). Al utilizar un panel de bibliotecas de expresión de ARNm, los presentes inventores han descubierto evidencias de que esta proteína se expresa fuertemente en el corazón y en el hígado, seguido de músculo esquelético (figura 3). Se observó expresión débil en el cerebro, el tracto digestivo, la próstata y el bazo (figura 3). El análisis Taqman confirmó la expresión en células de corazón e hígado. *FAP* se expresó mucho más en el tejido cardíaco en comparación con *MASP1* y *MASP3*. *FAP* se expresó tres veces más en el tejido cardíaco en comparación con la expresión de *FAP* en el hígado. Además, se observó una mayor expresión de *FAP* en el hígado en comparación con la expresión de *MASP1* y *MASP3* en el hígado. También se detectó una considerable expresión de *FAP* en el cerebro, músculo esquelético y tejidos prostáticos. El experimento se realizó tres veces por duplicado.

La alta expresión en el corazón es muy prominente y ha hecho que los presentes inventores sugieran un uso de los polipéptidos de acuerdo con la presente invención como protectores muy útiles contra el daño tisular en autoinmunidad, afecciones metabólicas y/o inflamatorias, tales como afecciones médicas asociadas con el corazón.

20 Los presentes inventores han establecido ensayos para evaluar la actividad del complemento iniciada por las ficolinas y la lectina de unión a manosa y, por lo tanto, los presentes inventores han podido mostrar una posible inhibición funcional del complemento de *FAP*.

Los presentes inventores han establecido ensayos cuantitativos en tiempo real para medir el nivel de expresión relativa exacto en diferentes tejidos.

25 Los polipéptidos de acuerdo con la presente invención pueden producirse mediante técnicas recombinantes. Los conejos o ratones pueden inmunizarse con un péptido único de 17 aminoácidos para obtener anticuerpos policlonales y monoclonales específicos de *FAP*, respectivamente.

Se pueden usar anticuerpos específicos contra *FAP* para la medición cuantitativa de *FAP* y la detección inmunohistoquímica en diferentes tejidos.

30 Las constantes de unión entre *FAP* y diferentes parejas de unión como se describe en el presente documento pueden determinarse en ELISA y utilizando la tecnología de resonancia de plasmón superficial (Biacore).

Una proteína aceptora específica de *FAP*, tal como un receptor unido a la superficie celular específico puede identificarse mediante ensayos estándar conocidos por los expertos en la técnica, tales como ensayos en los que la proteína está unida directamente a las células.

35 La nueva proteína asociada a ficolina (*FAP*) es una variante alternativa de corte y empalme de *MASP1*. La proteína carece del dominio serina proteasa pero todavía contiene los dominios que están involucrados en la unión a los iniciadores de la ruta de la lectina del sistema del complemento. Por tanto, los presentes inventores esperan que la proteína esté involucrada en la regulación e inhibición de la función de *MASP-1* y *MASP-3* (complemento, funciones de coagulación y otros sustratos enzimáticos) a través de las competencias y el desplazamiento de las *MASP*. Como alternativa, pero no la *FAP* mutuamente excluyente, puede funcionar como molécula secuestrante que facilita la eliminación de complejos de *FAP*/*MBL*/*ficolina* unidos a material de desecho endógeno o patógenos.

40 La activación incontrolada del sistema del complemento y la cascada de coagulación se asocian con resultados adversos e inhibidores funcionales, tales como los polipéptidos de acuerdo con la presente invención pueden ser muy útiles para el control del sistema del complemento y la cascada de coagulación. Además, los polipéptidos de acuerdo con la presente invención se pueden usar en otros entornos. Otro ángulo podría ser el uso de la proteína como biomarcador en diferentes entornos de enfermedades.

45 La proteína es única y puede proporcionar la base para nuevos medicamentos y/o nuevas herramientas de diagnóstico.

50 Los polipéptidos de acuerdo con la presente invención que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o un fragmento inmunológico o variante de la misma pueden tener una función específica asociada con esta secuencia de aminoácidos. Los presentes inventores sugieren que dichos polipéptidos pueden tener una función o actividad correspondiente a la actividad de una o más proteínas seleccionadas de ADN de DNMT1 (citosina-5-)-metiltransferasa 1 (DNMT1), miembro 1 de la subfamilia B de Golgin (GOLGB1), proteína 9 de anclaje a quinasa (AKAP9), proteína asociada a linfocitos B y T (antígeno CD272), proteína 1 adaptadora de envolvimiento que contiene el dominio PTB (GULP) y proteína 2 que contiene el dominio MACRO.

55 En algunas realizaciones interesantes particulares, los polipéptidos de acuerdo con la presente invención tienen una función o actividad correspondiente a la actividad de la proteína 1 adaptadora del envolvimiento que contiene el

dominio PTB (GULP).

#### Definiciones

La expresión "polipéptido asociado a ficolina", como se usa en el presente documento, significa cualquier proteína o polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos 20-380 de la proteína asociada a ficolina humana nativa (FAP) (SEQ ID NO: 1) o la secuencia de aminoácidos de 16-363 de la SEQ ID NO: 9, variantes funcionales, versiones truncadas funcionales de los mismos, así como derivados o conjugados funcionales, cuyo polipéptido no tiene actividad de complemento, pero posee la habilidad de competir con MASP-1, MASP-2 o MASP-3 por la unión a ficolina-3, MBL, C1q, proteínas surfactantes de pulmón SP-A y/o SP-D y/o CL-L1 (y otros miembros de la familia de la colectina). Esto incluye, pero sin limitaciones, el polipéptido asociado a ficolina humana (FAP) que tiene la SEQ ID NO:1 y variantes de la misma.

La expresión "proteína asociada a ficolina (FAP)" como se usa en el presente documento significa proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos 1-380 (con o sin péptido señal, tal como la secuencia de aminoácidos 20-380) de la FAP humana nativa (SEQ ID NO: 1), variaciones alélicas naturales y homólogas de las mismas. También incluye proteínas con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo, un extremo N o C terminal modificado que incluye deleciones o adiciones de aminoácidos en los extremos N o C terminales siempre que esas proteínas conserven sustancialmente la actividad de FAP. La expresión "proteína asociada a ficolina (FAP)" se usa en el presente documento de manera intercambiable con los términos "MAP-1" o "proteína 1 asociada a MBL/Ficolina". "FAP" dentro de la definición anterior también incluye variaciones alélicas naturales que pueden existir y ocurrir de un individuo a otro. El término también incluye proteínas con secuencia homóloga y función similar derivada de otras especies que no son humanas, tales como bovinas, de cerdo, perro, caballo, rata y ratón. Asimismo, el grado y la ubicación de la glicosilación u otras modificaciones posteriores a la traducción pueden variar según las células huésped elegidas y la naturaleza del entorno celular del huésped.

La expresión "serina proteasa 1 asociada a MBL" o "MASP-1", como se usa en el presente documento, significa proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos 1-699 (con o sin péptido señal, tal como la secuencia de aminoácidos 20-699) de MASP-1 humana nativa (SEC ID NO: 5), variaciones alélicas naturales y homólogas de las mismas. Debe entenderse que la secuencia puede estar en una o más cadenas peptídicas, tal como en dos cadenas, es decir, las cadenas pesadas y ligeras de la proteína humana nativa.

La expresión "serina proteasa 3 asociada a MBL" o "MASP-3", como se usa en el presente documento, significa proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos 1-728 (con o sin péptido señal, tal como la secuencia de aminoácidos 20-728) de MASP-3 humana nativa (SEC ID NO: 7), variaciones alélicas naturales y homólogas de las mismas. Debe entenderse que la secuencia puede estar en una o más cadenas peptídicas, tal como en dos cadenas, es decir, las cadenas pesadas y ligeras de la proteína humana nativa.

La expresión "serina proteasa 2 asociada a MBL" o "MASP-2", como se usa en el presente documento, significa proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos 1-686 (con o sin péptido señal, tal como la secuencia de aminoácidos 16-686) de MASP-2 humana nativa (SEQ ID NO: 9), variaciones alélicas naturales y homólogas de las mismas. Debe entenderse que la secuencia puede estar en una o más cadenas peptídicas, tal como en dos cadenas, es decir, las cadenas pesadas y ligeras de la proteína humana nativa.

Las expresiones "pequeña proteína asociada a MBL", "sMAP", "proteína plasmática asociada a MBL de 19 kD" o, "MAP19" como se usa en el presente documento significa proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos 1-185 (con o sin péptido señal, como la secuencia de aminoácidos 16-185) de la sMAP humana nativa (SEQ ID NO:11), variaciones alélicas naturales y homólogas de las mismas.

Los términos "variante" o "variantes", como se usa en el presente documento, pretenden designar un polipéptido asociado a ficolina que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, el la que uno o más aminoácidos han sido sustituidos por otro aminoácido y/o en la que uno o más aminoácidos se han delecionado y/o en la que uno o más aminoácidos se han insertado en el polipéptido y/o en la que uno o más aminoácidos se han añadido al polipéptido. Dicha adición puede tener lugar en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal o en ambos. La "variante" o "variantes" dentro de esta definición aún tienen actividad funcional. En alguna realización, una variante tiene una identidad de secuencia del 70 % con la secuencia de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una variante tiene una identidad de secuencia del 80 % con la secuencia de la SEQ ID NO:1. En otras realizaciones, una variante tiene una identidad de secuencia del 90 % con la secuencia de SEQ ID NO:1. En una realización adicional, una variante tiene una identidad de secuencia del 95 % con la secuencia de SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, una variante tiene una identidad de secuencia del 70 % con la secuencia de la SEQ ID NO:4. En algunas realizaciones, una variante tiene una identidad de secuencia del 80 % con la secuencia de la SEQ ID NO:4. En otras realizaciones, una variante tiene una identidad de secuencia del 90 % con la secuencia de SEQ ID NO:4. En una realización adicional, una variante tiene una identidad de secuencia del 95 % con la secuencia de SEQ ID NO: 4.

Las frases "variante funcional", "versiones funcionales truncadas" y "derivados funcionales" como se usa en el



- presente documento se refiere a variantes, versiones truncadas, así como derivados de SEQ ID NO: 1, cuyos polipéptidos comprenden partes de secuencia esenciales de la SEQ ID NO:1 y al menos tienen la capacidad de competir con MASP-1 o MASP-3 para unirse a las ficolinas o MBL sin tener la actividad del complemento y/o la actividad de serina proteasa. Debe entenderse que un polipéptido asociado a ficolina puede tener dos o tres características seleccionadas de ser tanto una variante como un truncado y/o un derivado.
- 5 Una variante funcional de un polipéptido asociado a ficolina abarca aquellos que exhiben al menos aproximadamente el 25 %, tal como al menos aproximadamente el 50 %, tal como al menos aproximadamente el 75 %, tal como al menos aproximadamente el 90 % de la actividad específica de FAP de tipo salvaje que se ha producido en el mismo tipo de célula, cuando se prueba en los ensayos como se describe en el presente documento.
- 10 La expresión "fragmento inmunológico" como se usa en el presente documento se refiere a un fragmento de una secuencia de aminoácidos que posee esencialmente las mismas actividades funcionales y la misma orientación espacial reconocida por un anticuerpo. Por consiguiente, un anticuerpo específico se unirá tanto al polipéptido como a sus fragmentos inmunológicos.
- 15 La expresión "otro aminoácido" como se usa en el presente documento significa un aminoácido que es diferente de ese aminoácido presente naturalmente en esa posición. Esto incluye, pero sin limitaciones, aminoácidos que pueden estar codificados por un polinucleótido. En algunas realizaciones, el aminoácido diferente está en la forma L natural y puede estar codificado por un polinucleótido.
- 20 El término "derivado" como se usa en el presente documento, está destinado a designar un polipéptido asociado a ficolina que exhibe sustancialmente la misma o mejor actividad biológica en relación con la FAP humana de tipo salvaje, en la que uno o más de los aminoácidos del péptido original se han modificado químicamente, por ejemplo mediante alquilación, PEGilación, acilación, formación de ésteres o formación de amidas o similares.
- La expresión "actividad del complemento", como se usa en el presente documento, significa la capacidad para activar el sistema del complemento. La actividad del complemento se puede medir con un ensayo como se describe en la sección titulada "Ensayos".
- 25 La expresión "lectina de unión a manosa (MBL)" como se usa en el presente documento también significa lectina de unión a manano, proteína de unión a manosa (MBP1) y proteína de unión a manano, términos que se pueden usar indistintamente.
- 30 La expresión "capaz de asociarse" como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad de las proteínas de acuerdo con la presente invención para unirse específicamente en la solución a uno o más de los iniciadores de la ruta de lectina del sistema del complemento u otras proteínas que pueden estar involucradas en el efecto del polipéptido.
- 35 El término "construcción" pretende indicar un segmento de polinucleótido que puede basarse en una secuencia de nucleótidos natural completa o parcial que codifica el polipéptido de interés. La construcción puede contener, opcionalmente, otros segmentos polinucleotídicos. De una manera similar, la expresión "aminoácidos que pueden estar codificados por construcciones polinucleotídicas" cubre los aminoácidos que pueden estar codificados por las construcciones polinucleotídicas definidas anteriormente, es decir, aminoácidos tales como Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.
- 40 El término "vector", como se usa en el presente documento, significa cualquier entidad de ácido nucleico capaz de amplificarse en una célula huésped. Por tanto, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector, que existe como entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Como alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el cromosoma ^) en el que se ha integrado. La elección del vector dependerá a menudo de la célula huésped en la que se va a introducir. Los vectores incluyen, pero sin limitaciones, vectores plasmídicos, vectores fagos, virus o vectores cósmidos. Los vectores generalmente contienen un origen de replicación y al menos un gen seleccionable, es decir, un gen que codifica un producto que es fácilmente detectable o cuya presencia es esencial para el crecimiento celular.
- 45 En un aspecto adicional, la invención proporciona una célula huésped recombinante que comprende la construcción de polinucleótido o el vector. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante es una célula eucariota. En otras realizaciones, la célula huésped recombinante es de origen mamífero. En una realización adicional, la célula huésped recombinante se selecciona del grupo que consiste en células CHO, células HEK y células BHK.
- 50 El término "una célula huésped", como se usa en el presente documento, representa cualquier célula, incluyendo células híbridas, en la que se puede expresar ADN heterólogo. Las células huésped típicas incluyen, pero sin limitación, células de insectos, células de levadura, células de mamífero, incluidas células humanas, tales como BHK, CHO, HEK y COS. En la práctica de la presente invención, las células huésped que se cultivan son, preferentemente, células de mamífero, más preferentemente una línea celular de mamífero establecida, que incluyen, sin limitación, las líneas celulares CHO (por ejemplo, ATCC CCL 61), COS-1 (por ejemplo, ATCC CRL 1650), de riñón de hámster neonato (BHK) y HEK293 (por ejemplo, ATCC CRL 1573; Graham y col., J. Gen. Virol.
- 55

- 36: 59-72, 1977). Una línea celular BHK preferida es la línea celular tk-ts13 BHK (Waechter y Baserga, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79: 1106-1110, 1982), en lo sucesivo denominadas células BHK 570. La línea celular BHK 570 está disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, con el número de acceso ATCC CRL 10314. También está disponible una línea celular tk-ts13 BHK de la ATCC con el número de acceso CRL 1632. Otras líneas celulares adecuadas incluyen, sin limitación, Hep I de rata (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Hep II de rata (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), de pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1) y células DUKX (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980). También son útiles las células 3T3, células de Namalwa, mielomas y fusiones de mielomas con otras células.
- 5 En un aspecto adicional, la invención proporciona un animal transgénico que contiene y expresa la construcción polinucleotídica.
- En un aspecto adicional, la invención proporciona una planta transgénica que contiene y expresa la construcción polinucleotídica.
- 15 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para producir el polipéptido asociado a ficolina de la invención, comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que comprende la construcción polinucleotídica en un medio de crecimiento apropiado en condiciones que permitan la expresión de la construcción polinucleotídica y recuperar el polipéptido resultante del medio de cultivo.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "medio de crecimiento apropiado" significa un medio que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de células y la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido asociado a la ficolina de la invención.
- 20 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para producir el polipéptido asociado a ficolina, comprendiendo el procedimiento recuperar el polipéptido de la leche producida por el animal transgénico.
- En un aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para producir el polipéptido asociado a ficolina, comprendiendo el procedimiento cultivar una célula de una planta transgénica que comprende la construcción polinucleotídica y recuperar el polipéptido de la planta resultante.
- 25 En el presente contexto, el término "tratamiento" pretende incluir tanto la prevención de una afección esperada que involucra la activación inadecuada del complemento, tal como la inflamación y la lesión por reperfusión y la regulación de una afección ya existente, tal como el infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular con el fin de inhibir o minimizar el daño tisular. La administración profiláctica del polipéptido asociado a ficolina de acuerdo con la invención se incluye, por tanto, en el término "tratamiento".
- 30 El término "sujeto", tal como se usa en el presente documento, pretende significar cualquier animal, en particular mamíferos, tales como seres humanos, y puede, cuando sea apropiado, usarse indistintamente con el término "paciente".
- 35 La expresión "identidad de secuencia" como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas polipeptídicas o dos o más moléculas de ácido nucleico, como se determina al comparar las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de la secuencia entre las moléculas de ácido nucleico o entre polipéptidos, según sea el caso, según lo determinado por el número de coincidencias entre cadenas de dos o más residuos de nucleótidos o dos o más restos de aminoácidos. La "identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la menor de dos o más secuencias con alineaciones de huecos (si las hay) abordadas mediante un modelo matemático o programa informático en particular (es decir, "algoritmos").
- 40 El término "similitud" es un concepto relacionado, pero a diferencia de "identidad", se refiere a una relación de secuencia que incluye coincidencias idénticas y coincidencias de sustitución conservadora. Si dos secuencias polipeptídicas tienen, por ejemplo, (fracción (10/20)) aminoácidos idénticos y el resto son todas sustituciones no conservadoras, los porcentajes de identidad y similitud serían ambos 50 %. Si, en el mismo ejemplo, hay 5 posiciones más en las que hay sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad permanece en el 50 %, pero el porcentaje de similitud sería del 75 % ((fracción (15/20))). Por lo tanto, en los casos en los que hay sustituciones conservadoras, el grado de similitud entre dos polipéptidos será mayor que el porcentaje de identidad entre esos dos polipéptidos.
- 45 Las modificaciones conservadoras de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (y las modificaciones correspondientes de los nucleótidos codificantes) producirán polipéptidos asociados a ficolina que tienen características funcionales y químicas similares a las de la FAP natural. En cambio, se pueden lograr modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o químicas de un polipéptido asociado a ficolina seleccionando sustituciones en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que difieren significativamente en su efecto para mantener (a) la estructura del esqueleto molecular en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral.
- 55

Por ejemplo, una "sustitución de aminoácido conservadora" puede implicar una sustitución de un resto de aminoácido nativo con un residuo no nativo de tal manera que haya poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga del resto de aminoácido en esa posición. Además, cualquier residuo nativo en el polipéptido también puede estar sustituido con alanina, como se ha descrito anteriormente para la "mutagénesis de exploración de alanina" (véase, por ejemplo, MacLennan y col., 1998, Acta Physiol. Scand. Suppl. 643:55-67; Sasaki y col., 1998, Adv. Biophys. 35: 1-24, que tratan la mutagénesis de exploración de alanina).

Los expertos en la técnica pueden determinar sustituciones de aminoácidos deseadas (conservadoras o no conservadoras) en el momento en el que se deseen dichas sustituciones. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos pueden usarse para identificar residuos importantes de un polipéptido asociado a ficolina, o para aumentar o disminuir la afinidad de un polipéptido asociado a ficolina descrito en el presente documento.

Los residuos naturales se pueden dividir en clases según las propiedades comunes de la cadena lateral:

- 1) hidrofóbicos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 3) ácidos: Asp, Glu;
- 15 4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- 6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Por ejemplo, las sustituciones no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases con un miembro de otra clase. Dichos residuos sustituidos pueden introducirse en regiones del polipéptido asociado a ficolina humana que son homólogas con polipéptidos asociados con ficolina no humana, o en las regiones no homólogas de la molécula.

Al hacer tales cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de sus características de hidrofobicidad y carga, estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

La importancia del índice de aminoácidos hidropáticos para conferir una función biológica interactiva a una proteína se entiende en la técnica. Kyte y col., J. Mol. Biol., 157:105-131 (1982). Se sabe que ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y siguen conservando una actividad biológica similar. Al hacer cambios basados en el índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de  $\pm 2$ , aquellos que están dentro de  $\pm 1$  son particularmente preferidos, y aquellos dentro de  $\pm 0,5$  son incluso más particularmente preferidos.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar de manera eficaz sobre la base de la hidrofiliidad, particularmente cuando la proteína o péptido biológicamente funcionalmente equivalente creada de este modo se destina al uso en realizaciones inmunológicas, como en el presente caso. La mayor hidrofiliidad local promedio de una proteína, según lo gobernado por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Los siguientes valores de hidrofiliidad se han asignado a los restos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 $\pm$ 1); glutamato (+3,0 $\pm$ 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5  $\pm$  1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Al hacer cambios basados en valores de hidrofiliidad similares, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de  $\pm 2$ , aquellos que están dentro de  $\pm 1$  son particularmente preferidos, y aquellos dentro de  $\pm 0,5$  son incluso más particularmente preferidos. También se pueden identificar epitopos de secuencias de aminoácidos primarias sobre la base de la hidrofiliidad. Estas regiones también se denominan "regiones centrales epitópicas".

Un experto en la técnica será capaz de determinar variantes adecuadas del polipéptido como se expone en la SEQ ID NO: 1 usando técnicas bien conocidas. Para identificar áreas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir la actividad, un experto en la materia puede apuntar a áreas que no se consideran importantes para la actividad. Por ejemplo, cuando se conocen polipéptidos similares con actividades similares de la misma especie o de otras especies, un experto en la técnica puede comparar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido asociado a ficolina con tales polipéptidos similares. Con tal comparación, se pueden identificar residuos y porciones de las moléculas que están conservadas entre polipéptidos similares. Se apreciará que los cambios en áreas de un polipéptido asociado a ficolina que no están conservados en relación con tales polipéptidos similares tendrían menos

probabilidades de afectar de forma adversa a la actividad biológica y/o a la estructura del polipéptido asociado a ficolina. Un experto en la técnica también sabría que, incluso en regiones relativamente conservadas, se pueden sustituir los aminoácidos químicamente similares por aminoácidos de origen natural al tiempo que conservan la actividad (sustituciones conservadoras de restos de aminoácidos). Por lo tanto, incluso las áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden estar sujetas a sustituciones conservadoras de aminoácidos sin destruir la actividad biológica o sin afectar de forma adversa a la estructura del polipéptido.

De manera adicional, un experto en la técnica puede revisar estudios de estructura-función que identifican residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o estructura. En vista de tal comparación, se puede predecir la importancia de los restos de aminoácidos en un polipéptido asociado a ficolina que corresponde a los restos de aminoácidos que son importantes para la actividad o la estructura en polipéptidos similares. Un experto en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para tales restos de aminoácidos importantes predichos de polipéptidos asociados con ficolina y otros polipéptidos de la invención.

El experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con dicha estructura en polipéptidos similares. En vista de esa información, un experto en la materia puede predecir la alineación de los restos de aminoácidos de un polipéptido asociado a ficolina con respecto a su estructura tridimensional. Un experto en la materia puede optar por no realizar cambios radicales en los restos de aminoácidos que se predice que están en la superficie de la proteína, ya que tales residuos pueden estar involucrados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un experto en la técnica puede generar variantes de prueba que contienen una única sustitución de aminoácido en cada resto de aminoácido deseado. Las variantes pueden seleccionarse después utilizando ensayos de actividad como se describe en el presente documento. Tales variantes podrían usarse para recopilar información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubriera que un cambio en un resto de aminoácido en particular se había destruido, reducido indeseablemente o una actividad inadecuada, se evitarían variantes con tal cambio. En otras palabras, según la información obtenida de tales experimentos rutinarios, un experto en la materia puede determinar fácilmente los aminoácidos en los que deben evitarse otras sustituciones, ya sea solas o en combinación con otras mutaciones.

Se han dedicado numerosas publicaciones científicas a la predicción de la estructura secundaria. Véase Moulton J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7(4):422-427 (1996), Chou y col., *Biochemistry*, 13(2):222-245 (1974); Chou y col., *Biochemistry*, 113(2):211-222 (1974); Chou y col., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47:45-148 (1978); Chou y col., *Ann. Rev. Biochem.*, 47:251-276 y Chou y col., *Biophys. J.*, 26:367-384 (1979). Además, actualmente hay disponibles los programas informáticos para ayudar a predecir la estructura secundaria. Un procedimiento de predicción de la estructura secundaria se basa en la modelación de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas, que tienen una identidad de secuencia superior al 30 % o una similitud superior al 40 % a menudo tienen topologías estructurales similares. El reciente crecimiento de la base de datos estructural de proteínas (PDB) ha proporcionado una mayor capacidad de predicción de la estructura secundaria, incluyendo el número potencial de veces dentro de la estructura de un polipéptido o proteína. Véase Holm y col., *Nucl. Acid. Res.*, 27(1):244-247 (1999). Se ha sugerido (Brenner y col., *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7(3):369-376 (1997)) que hay un número limitado de veces en un polipéptido o proteína dado y que una vez que se ha resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural ganará espectacularmente en precisión.

Los procedimientos adicionales para predecir la estructura secundaria incluyen "subprocedimientos" (Jones, D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7(3):377-87 (1997); Sippl y col., *Structure*, 4(1): 15-9 (1996)), "análisis del perfil" (Bowie y col., *Science*, 253:164-170 (1991); Gribskov y col., *Meth. Enzymol.*, 183:146-159 (1990); Gribskov y col., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84(13):4355-4358 (1987)) y "unión evolutiva" (véase Home, citado anteriormente y Brenner, citado anteriormente).

La identidad y similitud de los polipéptidos relacionados se pueden calcular fácilmente mediante procedimientos conocidos. Dichos procedimientos incluyen, pero sin limitación, los descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo y col., *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073 (1988).

Se diseñan procedimientos preferidos para determinar la identidad y/o similitud para dar la mayor coincidencia entre las secuencias analizadas. Los procedimientos para determinar la identidad y la similitud se describen en programas informáticos disponibles al público. Los procedimientos preferidos del programa informático para determinar la identidad y la similitud entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete del programa GCG, incluyendo GAP (Devereux y col., *Nucl. Acid. Res.*, 12:387 (1984); Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul y col., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990)). El programa BLASTX está públicamente disponible en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information) (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul y col., NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul y col., citado anteriormente). También se puede usar el algoritmo bien conocido de SmithWaterman para determinar la identidad.

Ciertos esquemas de alineación para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado el apareamiento de sólo una región corta de las dos secuencias, y esta región alineada pequeña puede tener una identidad de secuencia muy alta incluso si no existe una relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. En consecuencia, en una realización preferida, el procedimiento de alineación seleccionado (programa GAP) dará como resultado una alineación que abarca al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido objetivo.

Por ejemplo, utilizando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group), Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), dos polipéptidos para los que se determinará el porcentaje de identidad de secuencia están alineados para una coincidencia óptima de sus respectivos aminoácidos (el "tramo emparejado", según lo determinado por el algoritmo). Una penalización por apertura de hueco (que se calcula como 3 veces la diagonal promedio; la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que se utiliza; la "diagonal" es la puntuación o el número asignado a cada coincidencia perfecta de aminoácidos por la matriz de comparación particular) y una penalización por extensión de hueco (que generalmente es  $\frac{1}{10}$  veces la penalización de apertura de hueco), así como una matriz de comparación, tal como PAM 250 o BLOSUM 62 se utilizan junto con el algoritmo. Una matriz de comparación estándar (véase Dayhoff y col., Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp.3 (1978) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:10915-10919 (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62) también es utilizada por el algoritmo.

Los parámetros preferidos para una comparación de secuencias de polipéptidos incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y col., J. Mol. Biol, 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919 (1992); Penalización por hueco: 12, penalización por longitud de hueco: 4, Umbral de similitud: 0.

El programa GAP es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros predeterminados para las comparaciones de polipéptidos (junto con ninguna penalización para los huecos finales) utilizando el algoritmo GAP.

Los parámetros preferidos para las comparaciones de secuencias de moléculas de ácido nucleico incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y col., J. Mol Biol., 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: coincidencias = + 10, apareamiento erróneo = 0, Penalización por hueco: 50, penalización por longitud de hueco: 3.

El programa GAP también es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros predeterminados para las comparaciones de moléculas de ácido nucleico.

Pueden usarse otros algoritmos de ejemplo, penalizaciones por apertura de hueco, penalizaciones por extensión de huecos, matrices de comparación, umbrales de similitud, incluidos los establecidos en el Program Manual, Paquete Wisconsin, Versión 9, septiembre de 1997. Las elecciones particulares que se deben realizar serán evidentes para los expertos en la técnica y dependerán de la comparación específica que se realice, tal como ADN a ADN, proteína a proteína, proteína a ADN; y, adicionalmente, si la comparación es entre pares de secuencias dados (en cuyo caso generalmente se prefiere GAP o BestFit) o entre una secuencia y una gran base de datos de secuencias (en cuyo caso se prefieren FASTA o BLASTA).

#### **Preparación de polipéptidos asociados con ficolina y otros polipéptidos de la invención**

La invención también se refiere a un procedimiento para preparar polipéptidos asociados a ficolina humana y otros polipéptidos de la invención como se ha mencionado anteriormente. Los polipéptidos asociados con ficolina y otros polipéptidos de la invención descritos en el presente documento pueden producirse por medio de técnicas de ácido nucleico recombinante. En general, una secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje clonada se modifica para codificar la proteína deseada. A continuación, esta secuencia modificada se inserta en un vector de expresión, que a su vez se transforma o transfecta en células huésped. Las células eucariotas superiores, en particular células cultivadas de mamífero, se prefieren como células huésped. Las secuencias completas de aminoácidos y nucleótidos para la FAP humana se proporcionan en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO:2.

Las alteraciones de la secuencia de aminoácidos pueden realizarse mediante diversas técnicas. La modificación de la secuencia de ácido nucleico puede realizarse mediante mutagénesis específica del sitio. Las técnicas para la mutagénesis específica del sitio son bien conocidas en la materia y se describen en, por ejemplo, Zoller y Smith (DNA 3:479-488, 1984) o "Splicing by extension overlap", Horton y col., Gen 77, 1989, pp. 61-68. Por tanto, utilizando las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de FAP, se pueden introducir la o las alteraciones de elección. Igualmente, los procedimientos para preparar una construcción de ADN utilizando la reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores específicos son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, EE.UU.).

Los polipéptidos de la presente invención también pueden comprender restos de aminoácidos no naturales. Los aminoácidos no naturales incluyen, sin limitación, beta-alanina, desaminohistidina, trans-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, cis-4-hidroxioprolina, trans-4-hidroxioprolina, N-metilglicina, alo-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido pipercolico, ácido tiazolidin carboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, *terc*-leucina, nor-valina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. En la técnica se conocen varios procedimientos para

incorporar restos de aminoácidos no naturales en proteínas. Por ejemplo, se puede emplear un sistema *in vitro* en el que se suprimen las mutaciones sin sentido usando ARNt supresores químicamente aminoacilados. En la técnica se conocen procedimientos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar ARNt. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido se lleva a cabo en un sistema libre de células que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas disponibles comercialmente y otros reactivos. Los polipéptidos se purifican mediante cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson y col., *J. Am. Chem. Soc.* 113:2722, 1991; Ellman y col., *Methods Enzymol.* 202:301, 1991; Chung y col., *Science* 259: 806-9, 1993; y Chung y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10145-9, 1993). En un segundo procedimiento, la traducción se lleva a cabo en ovocitos de *Xenopus* mediante microinyección de ARNm mutado y ARNt supresores químicamente aminoacilados (Turcatti y col., *J. Biol. Chem.* 271:19991-8, 1996). En un tercer procedimiento, las células de *E. coli* se cultivan en ausencia de un aminoácido natural que se va a reemplazar (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia del o los aminoácidos no naturales deseados (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido no natural se incorpora al polipéptido en lugar de su homólogo natural. Véase, Koide y col., *Biochem.* 33:7470-6, 1994). Los restos de aminoácidos de origen natural se pueden convertir en especies no naturales mediante modificación química *in vitro*. La modificación química se puede combinar con mutagénesis dirigida a sitio para expandir adicionalmente el intervalo de sustituciones (Wynn y Richards, *Protein Sci.* 2:395-403, 1993).

La construcción de ácido nucleico que codifica los polipéptidos asociados a ficolina y otros polipéptidos de la invención puede ser adecuadamente de origen genómico o de ADNc, obtenido, por ejemplo, mediante la preparación de una biblioteca genómica o de ADNc y la detección selectiva de secuencias de ADN que codifican todo o parte del polipéptido mediante hibridación utilizando sondas oligonucleotídicas sintéticas de acuerdo con técnicas estándar (véase Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed. Puerto de primavera fría Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).

La construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido asociado a ficolina también puede prepararse sintéticamente mediante procedimientos estándar establecidos, por ejemplo, el procedimiento de fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22 (1981), 1859-1869, o el procedimiento descrito por Matthes y col., *EMBO Journal* 3 (1984), 801 - 805. Según el procedimiento de la fosfoamidita, se sintetizan los oligonucleótidos, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, se purifican, hibridan, ligan y clonan en vectores adecuados. Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos asociados a ficolina humana y otros polipéptidos de la invención también se pueden preparar mediante reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo, como se describe en el documento US 4.683.202, Saiki y col., *Science* 239 (1988), 487 - 491, o Sambrook y col., citado anteriormente.

Además, la construcción de ácido nucleico puede ser de origen mixto sintético y genómico, mixto sintético y de ADNc o mixto genómico y ADNc preparada mediante unión de fragmentos de origen sintético, genómico o ADNc (según corresponda), correspondiendo los fragmentos a varias partes de la totalidad de la construcción de ácido nucleico, de acuerdo con técnicas estándar.

La construcción de ácido nucleico es, preferentemente, una construcción de ADN. Las secuencias de ADN para su uso en la producción de polipéptidos asociados a ficolina y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención codificarán típicamente un polipéptido pre-pro en el extremo amino de FAP para obtener el procesamiento y la secreción postraduccionales adecuados desde la célula huésped.

Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos asociados a ficolina humana y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención se insertan habitualmente en un vector recombinante que puede ser cualquier vector, que puede ser sometido convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y la elección del vector dependerá a menudo de la célula huésped en la que se va a introducir. Por tanto, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector, que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Como alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el o los cromosomas en el o los que se ha integrado.

El vector es, preferentemente, un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica los polipéptidos asociados a ficolina humana y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención está unida operativamente a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN. En general, el vector de expresión deriva de ADN plasmídico o viral, o puede contener elementos de ambos. La expresión, "unido operativamente" indica que los segmentos están organizados de modo que funcionen en concierto para los fines previstos, por ejemplo, la transcripción se inicia en un promotor y procede a través de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido.

Los vectores de expresión para su uso en la expresión de polipéptidos asociados a ficolina y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención comprenderán un promotor capaz de dirigir la transcripción de un gen clonado o ADNc. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN, que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede derivarse de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula huésped.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica el polipéptido asociado a

ficolina humana en células de mamífero son el promotor SV40 (Subramani y col., Mol. Cell Biol. 1 (1981), 854 -864), el promotor de MT-1 (gen de metalotioneína) (Palmiter y col., Science 222 (1983), 809 - 814), el promotor de CMV (Boshart y col., Cell 41: 521-530, 1985) o el promotor tardío principal del adenovirus 2 (Kaufman y Sharp, Mol. Cell. Biol., 2:1304-1319, 1982).

- 5 Un ejemplo de un promotor adecuado para su uso en células de insecto es el promotor de polihedrina (documento US 4.745.051; Vasuvedan y col., FEBS Lett. 311, (1992) 7 - 11), el promotor de P10 (J.M. Vlak y col., J. Gen. Virology 69, 1988, pág. 765-776), el promotor de la proteína básica del virus de la polihedrosis de *Autographa californica* (documento EP 397 485), el promotor del gen 1 temprano inmediato de baculovirus (documento US 5.155.037; documento US 5.162.222), o el promotor del gen del temprano retardado de baculovirus 39K (documento US 5.155.037; documento US 5.162.222).

10 Los ejemplos de promotores adecuados para su uso en células huésped de levadura incluyen promotores de genes glicolíticos de levadura (Hitzeman y col., J. Biol. Chem. 255 (1980), 12073 - 12080; Alber y Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982), 419 - 434) o genes de la alcohol deshidrogenasa (Young y col., En Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender y col., eds.), Plenum Press, New York, 1982), o los promotores de TPI1 (documento US 4.599.311) o ADH2-4c (Russell y col., Nature 304 (1983), 652 - 654).

15 Los ejemplos de promotores adecuados para su uso en células huésped de hongos filamentosos son, por ejemplo, el promotor de ADH3 (McKnight y col., The EMBO J. 4 (1985), 2093 - 2099) o el promotor de *tpiA*. Los ejemplos de otros promotores útiles son los derivados del gen que codifica la amilasa TAKA de *A. oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *A. niger*, alfa-amilasa estable al ácido de *A. niger*, glucoamilasa de *A. niger* o *A. awamori* (*gluA*), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *A. oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae* o acetamidasa de *A. nidulans*. Se prefieren los promotores de TAKA-amilasa y *gluA*. Los promotores adecuados se mencionan en, por ejemplo, los documentos EP 238 023 y EP 383 779.

20 Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos asociados a ficolina humana y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención también pueden, si es necesario, estar conectado operativamente a un terminador adecuado, tal como el terminador de la hormona del crecimiento humano (Palmiter y col., Science 222, 1983, pág. 809-814) o los terminadores TPI1 (Alber y Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1, 1982, pág. 419-434) o ADH3 (McKnight y col., The EMBO J. 4, 1985, pp. 2093-2099). Los vectores de expresión también pueden contener un conjunto de sitios de corte y empalme de ARN ubicados corriente abajo del promotor y corriente arriba del sitio de inserción para la propia secuencia de FAP. Los sitios de corte y empalme de ARN preferidos se pueden obtener a partir de genes de adenovirus y/o inmunoglobulina. También está contenida en los vectores de expresión una señal de poliadenilación ubicada aguas abajo del sitio de inserción. Las señales de poliadenilación particularmente preferidas incluyen la señal de poliadenilación temprana o tardía de SV40 (Kaufman y Sharp, *ibid.*), la señal de poliadenilación de la región Elb del adenovirus 5, el terminador del gen de la hormona del crecimiento humana (DeNoto y col., Nucl. Acids Res. 9:3719-3730, 1981) o la señal de poliadenilación del gen de FAP humana o el gen de FAP bovina. Los vectores de expresión también pueden incluir una secuencia líder viral no codificante, tal como la secuencia líder tripartita de adenovirus 2, ubicada entre el promotor y los sitios de corte y empalme del ARN; y secuencias potenciadoras, tal como el potenciador de SV40.

25 Para dirigir los polipéptidos asociados a ficolina humana y otros polipéptidos de la presente invención hacia la ruta secretora de las células huésped, en el vector recombinante se puede proporcionar una secuencia señal secretora (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre). La secuencia señal secretora se une a las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos asociados a ficolina humana y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención en el marco de lectura correcto. Normalmente, las secuencias señal secretoras están colocadas en 5' de la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia señal secretora puede ser que, normalmente asociada a la proteína o puede proceder de un gen que codifica otra proteína secretada.

30 Para la secreción de células de levadura, la secuencia señal secretora puede codificar cualquier péptido señal, que asegura la dirección eficiente de los polipéptidos asociados a ficolina humana expresados y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención en la ruta secretora de la célula. El péptido señal puede ser un péptido señal de origen natural, o una parte funcional del mismo, o puede ser un péptido sintético. Se ha descubierto que los péptidos señal adecuados son el péptido señal del factor alfa (véase el documento US 4.870.008), el péptido señal de la amilasa salival de ratón (véase O. Hagenbuchle y col., Nature 289, 1981, pág. 643-646), un péptido señal de carboxipeptidasa modificado (véase, L. A. Valls y col., Cell 48, 1987, pág. 887-897), el péptido señal de levadura BAR1 (véase el documento WO 87/02670), o el péptido señal de proteasa aspártica 3 de levadura (YAP3) (véase M. Egel-Mitani y col., Yeast 6, 1990, págs. 127-137).

35 Para una eficaz secreción en levaduras, una secuencia que codifica un péptido líder también puede insertarse aguas abajo de la secuencia señal y aguas arriba de la secuencia de ADN que codifica los polipéptidos asociados a ficolina humana y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención. La función del péptido líder es permitir que el péptido expresado se dirija desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi y más allá a una vesícula secretora para la secreción al medio de cultivo (es decir, la exportación de los polipéptidos asociados a ficolina humana y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención a través de la pared celular o al menos a través de la membrana celular en el espacio periplásmico de la célula de levadura). El péptido líder puede ser el líder del factor alfa de la

levadura (cuyo uso se describe, por ejemplo, en los documentos US 4.546.082, US 4.870.008, EP 16 201, EP 123 294, EP 123 544 y EP 163 529). Como alternativa, el péptido líder puede ser un péptido líder sintético, es decir, un péptido líder no descubierto en la naturaleza. Los péptidos líder sintéticos pueden, por ejemplo, construirse como se describe en los documentos WO 89/02463 o WO 92/11378.

5 Para su uso en hongos filamentosos, el péptido señal puede derivar, convenientemente, de un gen que codifica una amilasa o glucoamilasa de *Aspergillus* sp, un gen que codifica una lipasa o proteasa de *Rhizomucor miehei* o una lipasa de *Humicola lanuginosa*. El péptido señal deriva, preferentemente, de un gen que codifica amilasa TAKA de *A. oryzae*, alfa-amilasa neutra de *A. niger*, amilasa estable al ácido de *A. niger* o glucoamilasa de *A. niger*. Los péptidos señal adecuados se desvelan en, por ejemplo, los documentos EP 238 023 y EP 215 594.

10 Para su uso en células de insecto, el péptido señal puede derivar convenientemente de un gen de insecto (véase el documento WO 90/05783), tal como el péptido señal precursor de la hormona adipocinética del lepidóptero *Manduca sexta* (véase el documento US 5.023.328).

15 Los procedimientos utilizados para ligar las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos asociados a ficolina humana y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención, el promotor y, opcionalmente, el terminador y/o la secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contengan la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).

20 Los procedimientos para transfectar células de mamífero y expresar secuencias de ADN introducidas en las células se describen en, por ejemplo, Kaufman y Sharp, *J. Mol. Biol.* 159 (1982), 601 - 621; Southern y Berg, *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (1982), 327 - 341; Loyter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982), 422 - 426; (Wigler y col., *Cell* 14(1978), 725; Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7 (1981), 603, Graham y van der Eb, *Virology* 52 (1973), 456; y Neumann y col., *EMBO J.* 1 (1982), 841 - 845.

25 Las secuencias de ADN clonadas se introducen en células de mamíferos cultivadas mediante, por ejemplo, transfección mediada por fosfato cálcico (Wigler y col., *Cell* 14:725-732, 1978; Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7:603-616, 1981; Graham y Van der Eb, *Virology* 52d:456-467, 1973) o electroporación (Neumann y col., *EMBO J.* 1:841-845, 1982). Para identificar y seleccionar las células que expresan el ADN exógeno, un gen que confiere un fenotipo seleccionable (un marcador seleccionable) generalmente se introduce en las células junto con el gen o ADNc de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen genes que confieren resistencia a fármacos como neomicina, higromicina y metotrexato. El marcador seleccionable puede ser un marcador seleccionable amplificable. Un marcador seleccionable amplificable preferido es una secuencia de dihidrofolato reductasa (DHFR). Los marcadores seleccionables son revisados por Thilly (*Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Stoneham, MA, incorporado en el presente documento por referencia). El experto en la materia podrá elegir fácilmente marcadores seleccionables adecuados.

35 Los marcadores seleccionables pueden introducirse en la célula en un plásmido separado al mismo tiempo que el gen de interés, o pueden introducirse en el mismo plásmido. Si en el mismo plásmido, el marcador seleccionable y el gen de interés pueden estar bajo el control de diferentes promotores o del mismo promotor, esta última disposición produce un mensaje dicistrónico. Las construcciones de este tipo son conocidas en la técnica (por ejemplo, Levinson y Simonsen, documento US 4.713.339). También puede ser ventajoso añadir ADN adicional, conocido como "ADN portador" a la mezcla que se introduce en las células.

40 Después de que las células han captado el ADN, se cultivan en un medio de crecimiento apropiado, normalmente 1-2 días, para comenzar a expresar el gen de interés. Como se usa en el presente documento, el término "medio de crecimiento apropiado" significa un medio que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de células y la expresión del polipéptido de interés asociado a ficolina humana. Los medios generalmente incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, azúcares  
45 esenciales, vitaminas, sales, fosfolípidos, proteínas y factores de crecimiento. Después se aplica la selección del fármaco para seleccionar el crecimiento de células que están expresando el marcador seleccionable de un modo estable. Para las células que se han transfectado con un marcador seleccionable amplificable, la concentración del fármaco se puede aumentar para seleccionar un número de copias mayor de las secuencias clonadas, por lo tanto niveles de expresión crecientes. Los clones de células transfectadas de manera estable se seleccionan después  
50 para determinar la expresión del polipéptido de interés asociado a ficolina humana.

La célula huésped en la que se introducen las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos asociados a ficolina humana y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier célula, que es capaz de producir los polipéptidos humanos modificados postraduccionales e incluye células de levadura, hongos y eucariotas superiores.

55 Los ejemplos de líneas celulares de mamíferos para su uso en la presente invención son las líneas celulares COS-1 (ATCC CRL 1650), de riñón de hámster neonato(BHK) y 293 (ATCC CRL 1573; Graham y col., *J. Gen. Virol.* 36: 59-72, 1977). Una línea celular BHK preferida es la línea celular tk- ts13 BHK (Waechter y Baserga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1106-1110, 1982, incorporada en el presente documento por referencia), en lo sucesivo denominadas



células BHK 570. La línea celular BHK 570 se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 12301 Parklawn Dr., Rockville, Md. 20852, con el número de acceso ATCC CRL 10314. También está disponible una línea celular tk- ts13 BHK de la ATCC con el número de acceso CRL 1632. Además, se pueden usar varias otras líneas celulares dentro de la presente invención, incluyendo Hep I de rata (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Hep II de rata (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), de pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1), CHO (ATCC CCL 61) y DUKX (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980).

Los ejemplos de células de levadura adecuadas incluyen células de *Saccharomyces* spp. o *Schizosaccharomyces* spp., en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces kluyveri*. A continuación se describen procedimientos para transformar células de levadura con ADN heterólogo y producir polipéptidos heterólogos, por ejemplo, en los documentos US 4.599.311, US 4.931.373, US 4.870.008, 5.037.743 y US 4.845.075, todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia. Las células transformadas se seleccionan según un fenotipo determinado por un marcador seleccionable, habitualmente la resistencia a fármacos o la capacidad de crecer en ausencia de un nutriente particular, por ejemplo, leucina. Un vector preferido para su uso en levadura es el vector POT1 desvelado en el documento US 4.931.373. Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos asociados a ficolina humana y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención pueden estar precedidas por una secuencia señal y, opcionalmente, una secuencia líder, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Otros ejemplos de células de levadura adecuadas son las cepas de *Kluyveromyces*, tales como *K. lactis*, *Hansenula*, *H. polymorpha* o *Pichia*, por ejemplo, *P. pastoris* (véase Gleeson y col., J. Gen. Microbiol. 132, 1986, páginas. 3459-3465; documento US 4.882.279).

Los ejemplos de otras células fúngicas son células de hongos filamentosos, por ejemplo, *Aspergillus* spp., *Neurospora* spp., *Fusarium* spp. o *Trichoderma* spp., en particular cepas de *A. oryzae*, *A. nidulans* o *A. niger*. El uso de *Aspergillus* spp. para la expresión de proteínas se describe en, por ejemplo, los documentos EP 272 277, EP 238 023, EP 184 438. La transformación de *F. oxysporum* puede, por ejemplo, llevarse a cabo según lo descrito por Malardier y col., 1989, Gene 78: 147-156. La transformación de *Trichoderma* spp. puede realizarse, por ejemplo, como se describe en el documento EP 244 234.

Cuando un hongo filamentoso se utiliza como la célula huésped, se puede transformar con la construcción de ADN de la invención, convenientemente integrando la construcción de ADN en el cromosoma huésped para obtener una célula huésped recombinante. Esta integración generalmente se considera una ventaja, ya que es más probable que la secuencia de ADN se mantenga estable en la célula. La integración de las construcciones de ADN en el cromosoma huésped se puede realizar de acuerdo con procedimientos convencionales, por ejemplo, mediante recombinación homóloga o heteróloga.

La transformación de células de insecto y la producción de polipéptidos heterólogos en las mismas se pueden realizar como se describe en los documentos US 4,745,051; US 4,879,236; US 5,155,037; 5,162,222; EP 397,485), todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia. La línea celular de insecto utilizada como huésped puede ser adecuadamente una línea celular de lepidópteros, tal como células de *Spodoptera frugiperda* o células de *Trichoplusia ni* (véase el documento US 5.077.214). Las condiciones de cultivo pueden ser, adecuadamente, como se describe en, por ejemplo, los documentos WO 89/01029 o WO 89/01028, o cualquiera de las referencias mencionadas anteriormente.

La célula huésped transformada o transfectada descrita anteriormente se cultiva después en un medio nutriente adecuado en condiciones que permiten la expresión del polipéptido asociado a ficolina humana, después de lo cual todo o parte del péptido resultante puede recuperarse del cultivo. El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células huésped, tales como medios mínimos o complejos que contienen suplementos apropiados. Los medios adecuados están disponibles en proveedores comerciales o se pueden preparar de acuerdo con las recetas publicadas (por ejemplo, en los catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo). El polipéptido asociado a ficolina humana producido por las células puede luego recuperarse después del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales, incluyendo la separación de las células huésped del medio por centrifugación o filtración, precipitando los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado por medio de una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, purificación mediante diversos procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similares, dependiendo del tipo de polipéptido en cuestión.

Se puede emplear tecnología de animales transgénicos para producir los polipéptidos asociados a ficolina y otros polipéptidos de la invención. Se prefiere producir las proteínas dentro de las glándulas mamarias de un mamífero hembra huésped. La expresión en la glándula mamaria y la posterior secreción de la proteína de interés en la leche supera muchas dificultades encontradas en el aislamiento de proteínas de otras fuentes. La leche se recoge fácilmente, disponible en grandes cantidades, y bien caracterizado bioquímicamente. Además, las principales proteínas de la leche están presentes en la leche en altas concentraciones (típicamente de aproximadamente 1 a 15 g/l).

Desde un punto de vista comercial, es claramente preferible utilizar como huésped una especie que tenga un alto rendimiento de leche. Si bien se pueden usar animales más pequeños, como ratones y ratas (y se prefieren en la

etapa de prueba de principio), es preferible utilizar mamíferos de ganado incluyendo, pero sin limitación, cerdos, cabras, ovejas y ganado vacuno. Las ovejas son particularmente preferidas debido a factores tales como la historia previa de la transgénesis en esta especie, la producción de leche, el coste y la disponibilidad de equipos para la recolección de leche de oveja (véase, por ejemplo, el documento WO 88/00239 para una comparación de los factores que influyen en la elección de las especies huésped). En general, es deseable seleccionar una raza de animal huésped que haya sido criada para su uso lácteo, tal como oveja East Friesland, o para introducir la reserva de lácteos mediante la cría de la línea transgénica en una fecha posterior. En cualquier caso, deben usarse animales de estado de salud bueno conocido.

Para obtener expresión en la glándula mamaria, se utiliza un promotor de transcripción de un gen de proteína de la leche. Los genes de la proteína de la leche incluyen los genes que codifican caseínas (véase el documento U.S.5.304.489), beta lactoglobulina, una lactoalbúmina y proteína ácida del suero de la leche. Se prefiere el promotor de beta lactoglobulina (BLG). En el caso del gen de la beta lactoglobulina ovina, generalmente se utilizará una región de al menos las 406 pb proximales de la secuencia flanqueante en 5' del gen, aunque se prefieren porciones mayores de la secuencia flanqueante en 5', hasta aproximadamente 5 kpb, tal como un segmento de ADN de -4,25 kpb que abarca el promotor flanqueante en 5' y la porción no codificante del gen de la beta-lactoglobulina (véase Whitelaw y col., *Biochem. J.* 286: 31 39 (1992)). Fragmentos similares de ADN promotor de otras especies también son adecuados.

Otras regiones del gen de la beta lactoglobulina también pueden incorporarse en construcciones, como también las regiones genómicas del gen que se va a expresar. Es generalmente aceptado en la técnica que las construcciones que carecen de intrones, por ejemplo, expresan poco en comparación con las que contienen dichas secuencias de ADN (véase Brinster y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 836 840 (1988); Palmiter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 478 482 (1991); Whitelaw y col., *Transgenic Res.* 1: 3 13 (1991); documento WO 89/01343; y documento WO 91/02318, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia). En este sentido, generalmente es preferente, cuando sea posible, usar secuencias genómicas que contienen todos o algunos de los intrones nativos de un gen que codifica la proteína o polipéptido de interés, por lo tanto, es preferente la inclusión adicional de al menos algunos intrones de, por ejemplo, el gen de la beta lactoglobulina. Una de esas regiones es un segmento de ADN que proporciona el corte y empalme de intrones y la poliadenilación del ARN de la región no codificante en 3' del gen de beta lactoglobulina. Cuando se sustituye por las secuencias no codificantes naturales en 3' de un gen, este segmento de beta lactoglobulina ovina puede mejorar y estabilizar los niveles de expresión de la proteína o polipéptido de interés. En otras realizaciones, la región que rodea el ATG de iniciación de la secuencia FAP se reemplaza con las secuencias correspondientes de un gen de proteína específica de la leche. Dicha sustitución proporciona un entorno de iniciación específico del tejido putativo para mejorar la expresión. Es conveniente reemplazar la totalidad de las secuencias no codificantes de FPA pre pro y 5' con las de, por ejemplo, el gen de BLG, aunque se pueden reemplazar las regiones más pequeñas.

Para la expresión de polipéptidos asociados a ficolina y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención en animales transgénicos, un segmento de ADN que codifica FAP está unido operativamente a segmentos de ADN adicionales requeridos para que su expresión produzca unidades de expresión. Tales segmentos adicionales incluyen el promotor mencionado anteriormente, así como las secuencias que proporcionan la terminación de la transcripción y la poliadenilación del ARNm. Las unidades de expresión incluirán además un segmento de ADN que codifica una secuencia señal secretora unida operativamente al segmento que codifica la FAP modificada. La secuencia señal secretora puede ser una secuencia señal secretora de FAP nativa o puede ser la de otra proteína, tal como una proteína de la leche (véase, por ejemplo, von Heijne, *Nucl. Acids Res.* 14: 4683 4690 (1986); y Meade y col., documento U.S. 4.873.316, que se incorporan en el presente documento como referencia).

La construcción de unidades de expresión para su uso en animales transgénicos se lleva a cabo convenientemente insertando una secuencia de FAP en un plásmido o vector fago que contiene los segmentos de ADN adicionales, aunque la unidad de expresión puede construirse esencialmente con cualquier secuencia de ligaduras. Es particularmente conveniente proporcionar un vector que contiene un segmento de ADN que codifique una proteína de la leche y reemplazar la secuencia de codificación de la proteína de la leche con la de una variante de FAP; creando de este modo una fusión de genes que incluye las secuencias de control de la expresión del gen de la proteína de la leche. En cualquier caso, la clonación de las unidades de expresión en plásmidos u otros vectores facilita la amplificación de la secuencia de FAP. La amplificación se lleva a cabo convenientemente en células huésped bacterianas (por ejemplo, *E. coli*), por lo tanto, los vectores incluirán típicamente un origen de replicación y un marcador seleccionable funcional en células huésped bacterianas. La unidad de expresión se introduce luego en los huevos fertilizados (incluidos los embriones en etapa temprana) de la especie huésped elegida. La introducción de ADN heterólogo se puede lograr mediante una de varias rutas, incluyendo microinyección (por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 4.873.191), infección por retrovirus (Jaenisch, *Science* 240: 1468 1474 (1988)) o integración dirigido al sitio usando células madre (ES) embrionarias (revisado por Bradley y col., *Bio/Technology* 10: 534 539 (1992)). A continuación, los huevos se implantan en los oviductos o úteros de hembras seudopreñadas y se dejan desarrollar hasta el final. Los descendientes que llevan el ADN introducido en su línea germinal pueden pasar el ADN a su progenie del modo mendeliano normal, lo que permite el desarrollo de rebaños transgénicos. Los procedimientos generales para producir animales transgénicos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Hogan y col., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; Simons y col., *Bio/Technology* 6: 179 183 (1988); Wall y col., *Biol. Reprod.* 32: 645 651 (1985); Buhler y col., *Bio/Technology* 8:

140 143 (1990); Ebert y col., *Bio/Technology* 9: 835 838 (1991); Krimpenfort y col., *Bio/Technology* 9: 844 847 (1991); Wall y col., *J. Cell. Biochem.* 49: 113 120 (1992); documento U.S. 4.873.191; documento U.S. 4.873.316; documento WO 88/00239, documento WO 90/05188, documento WO 92/11757; y documento GB 87/00458). Las técnicas para introducir secuencias de ADN extraño en los mamíferos y sus células germinales se desarrollaron originalmente en ratón (véase, por ejemplo, Gordon y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7380 7384 (1980); Gordon y Ruddle, *Science* 214, 12441246 (1981); Palmiter y Brinster, *Cell* 41:343345 (1985); Brinster y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4438 4442 (1985); y Hogan y col., (*ibid.*)). Estas técnicas se adaptaron posteriormente para su uso con animales más grandes, incluyendo especies de ganado (véase, por ejemplo, los documentos WO 88/00239, WO 90/05188 y WO 92/11757; y Simons y col., *Bio/Technology* 6: 179 183 (1988)). Para resumir, en la ruta más eficiente utilizada hasta la fecha en la generación de ratones transgénicos o ganado, se inyectan varios cientos de moléculas lineales del ADN de interés en uno de los pronúcleos de un huevo fertilizado de acuerdo con técnicas establecidas. También se puede emplear la inyección de ADN en el citoplasma de un cigoto.

También se puede emplear la producción en plantas transgénicas. La expresión puede ser generalizada o dirigida a un órgano particular, tal como un tubérculo (véase, Hiatt, *Nature* 344:469 479 (1990); Edelbaum y col., *J. Interferon Res.* 12:449 453 (1992); Sijmons y col., *Bio/Technology* 8:217 221 (1990); y documento EP 0 255 378).

#### *Purificación de FAP*

Los polipéptidos asociados a ficolina y otros polipéptidos de la invención se pueden recuperar del medio de cultivo celular o de la leche. Los polipéptidos asociados a ficolina y otros polipéptidos de la presente invención pueden purificarse mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero sin limitación, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrófoba, cromatoenfoco y de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoelectrico preparativo (IEF), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio), o extracción (véase, por ejemplo, *Protein Purification*, J.-C. Janson y Lars Ryden, editors, VCH Publishers, Nueva York, 1989). Preferentemente, pueden purificarse mediante cromatografía de afinidad en una columna de anticuerpo anti-FAP. La purificación adicional se puede lograr por medios convencionales de purificación química, tal como la cromatografía líquida de alto rendimiento. Otros procedimientos de purificación, incluyendo precipitación con citrato de bario, son conocidos en la técnica y se pueden aplicar a la purificación de los nuevos polipéptidos asociados a ficolina y otros polipéptidos descritos en el presente documento (véase, por ejemplo, Scopes, R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y., 1982).

Para fines terapéuticos, se prefiere que los polipéptidos asociados a ficolina y otros polipéptidos de la invención sean sustancialmente puros. Por tanto, en una realización preferida de la invención, el y otros polipéptidos de la invención se purifican hasta una homogeneidad de al menos aproximadamente 90 a 95 %, preferentemente a al menos aproximadamente una homogeneidad del 98 %. La pureza se puede evaluar, por ejemplo, mediante electroforesis en gel y secuenciación de aminoácidos amino-terminal.

El término "polipéptido aislado" se refiere a un polipéptido de la presente invención que (1) se ha separado de al menos aproximadamente el 50 por ciento de los polinucleótidos, lípidos, carbohidratos u otros materiales (es decir, contaminantes) con los que está naturalmente asociado. Preferentemente, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de otros polipéptidos contaminantes u otros contaminantes que se encuentran en su ambiente natural, que interferiría con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico o de investigación.

El término "microorganismo" como se usa en el presente documento se refiere a bacterias, hongos, arqueas, protistas; plantas y animales microscópicos (como algas verdes o plancton), planaria y ameba. Incluidos dentro de esta definición están los microorganismos patógenos.

#### **Ensayos**

Un procedimiento general para SDS-PAGE y transferencia Western:

la electroforesis se realizó en geles de poli(acrilamida Bis-Tris al 10 % o al 4-12 % (p/v) con tampones discontinuas utilizando el sistema NuPAGE® (Invitrogen) según lo recomendado por el fabricante. La transferencia de tipo Western se realizó utilizando membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF-HyBond, GE-healthcare, Hilleroed, Dinamarca, n.º cat. RPN303F), 2 µg/ml de anticuerpo monoclonal primario marcado con biotina y visualización secundaria por estreptavidina conjugada con HRP (P0397, Dako, Glostrup, Dinamarca) diluido a 1:1500 en PBS, Tween20 al 0,05 %. Las membranas se desarrollaron con 0,04 % de 3-amino-9-etilcarbazol (Sigma-aldrich, Broenby, Dinamarca, n.º cat. A5754-100G) en acetona y 0,015 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tampón de acetato sódico 50 mM a pH 5.

Coinmunoprecipitación:

Inmunoprecipitación de complejos séricos de lectina de unión a manosa (MBL): se diluyó 1 ml de suero humano normal en una proporción 1:1 en TBS (Tris 10 mM, NaCl 140 mM, a pH 7,5) y se incubó de extremo a extremo durante 1 hora a 4 °C con 5 µg del anticuerpo monoclonal de ratón específico de MBL Hyb 131-11 (Bioporto, Gentofte, Dinamarca).

Inmunoprecipitación de complejos séricos de ficolina-2: se diluyó 0,5 ml de suero humano normal en una proporción

## ES 2 709 748 T3

1:1 en TBS (Tris 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,5) y se incubó de extremo a extremo durante 1 hora a 4 °C con 5 µg del anticuerpo monoclonal de ratón específico de ficolina 2 Hyb 219 (Munthe-Fog L, y col.,.)

5 Inmunoprecipitación de complejos séricos de ficolina-3: se diluyó 0,2 ml de suero humano normal en una proporción 1:1 en TBS (Tris 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,5) y se incubó de extremo a extremo durante 1 hora a 4 °C con 5 µg del anticuerpo monoclonal de ratón específico de ficolina 3 Hyb 334 (Munthe-Fog L, y col.,.)

10 La precipitación del complejo inmune se llevó a cabo con perlas dynal magnéticas conjugadas con IgG anti-ratón de oveja (Dynal-Invitrogen, n.º de cat. 112.02D): Después de la incubación con anticuerpos séricos y primarios (como anteriormente), se añadieron  $5 \times 10^7$  de perlas dynal magnéticas conjugadas anti-ratón de oveja y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Las perlas se separaron magnéticamente y se lavaron tres veces con TBS-tween- $\text{Ca}^{2+}$  (Tris 10 mM, NaCl 140 mM, Tween al 0,05 %,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, pH 7,5) y finalmente se llevó a ebullición en tampón de carga de SDS y se analizó mediante SDS-PAGE y transferencia de tipo Western con el anticuerpo monoclonal marcado con biotina mAb-8B3 (que reacciona con un epítipo en la cadena pesada/cadena A compartida por MASP-1 y -3).

15 Purificación por inmutofinidad de FAP: 10 mg de mAb-8B3 (que reacciona con un epítipo en la cadena pesada/cadena A compartida por FAP, MASP-1 y -3) o 10 mg de anticuerpos policlonales de conejo anti-FAP se conjugaron con sefarosa activada con CNBr según lo recomendado por el fabricante (GE-healthcare, Hilleroed, Dinamarca, n.º de cat. 17-0430-01) y empaquetado en una columna.

20 Purificación en suero: se diluyeron 150 ml de un conjunto de suero humano normal en una proporción de 1:1 con TBS + NaCl 0,5 M + EDTA 10 mM (Tris 10 mM, NaCl 640 mM, EDTA 10 mM, pH 7,5) y se cargaron en las columnas descritas anteriormente. Las columnas se lavaron con 1 l de TBS + NaCl 0,5 M + EDTA 10 mM y las fracciones de 1 ml se eluyeron con glicina-HCl 1M, pH 2,5 y se analizó mediante SDS-PAGE y transferencia de tipo Western con anticuerpo monoclonal marcado con biotina mAb-8B3.

25 Purificación de FAP recombinante: 2-3 l de sobrenadante de cultivo (de medio libre de suero CHO/Gibco-Invitrogen, n.º cat. 12651-014) de células de ovario de hámster chino (células CHO) que expresan FAP recombinante (rFAP) se cargaron en las columnas de anticuerpos descritas anteriormente. Las columnas se lavaron con 1,5 l de TBS + NaCl 0,5 M + EDTA 10 mM y se eluyeron fracciones de 1 ml con glicina-HCl 1 M, a pH 2,5. Las fracciones eluidas se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con coomassie.

30 Se solicitó la expresión recombinante de ADNc de FAP de longitud completa insertado en el vector pcDNA5/FRT (Invitrogen, n.º de cat. V6010-20) a Genscript (Genscript, New Jersey, EE. UU.) y se cotransfectó con el vector pOG44 (Invitrogen, n.º de cat. V6005-20) en la línea celular CHO Flp-In (Invitrogen, n.º de cat R758-07) y se seleccionó y se clonó según lo recomendado por el fabricante (Invitrogen). Las células se cultivaron en medio libre de suero Freestyle CHO (Invitrogen, n.º de cat. 12651-014) y los sobrenadantes de cultivo se recogieron y analizaron.

35 La producción de anticuerpos monoclonales y policlonales: una construcción peptídica (solicitada en Genscript, New Jersey, EE. UU.) de los 17 residuos en C-terminal específicos de FAP se acoplaron a la forma de toxoide del tétanos y la diferia utilizando el procedimiento de acoplamiento de cisteína con éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida como recomienda el fabricante (Thermo Fisher Scientific/Pierce, Illinois, EE.UU.).

40 Se inmunizaron seis ratones y dos conejos tres veces (con intervalos de 14 días) con 25 µg de antígeno adsorbido en  $\text{Al}(\text{OH})_3$  y adyuvante incompleto de Freund. Los títulos de anticuerpos policlonales se evaluaron mediante ELISA con los diferentes péptidos FAP acoplados a un portador de proteínas. El antisuero policlonal de conejo (10 ml) se recogió 14 días después de la primera, segunda y tercera inmunización.

45 Se utilizaron dos ratones para la producción de anticuerpos monoclonales. Cuatro días antes de la fusión, los ratones recibieron una inyección intravenosa de 25 µg de antígeno. La fusión se realizó como se describe en otro lugar (Kohler, G. y C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256:495-497).

Los clones se seleccionaron mediante detección selectiva ELISA diferencial contra péptidos acoplados a diferentes portadores de proteínas.

Ensayos de complemento funcional: se utilizaron los sueros homocigotos defectivos en ficolina-3 y MBL para investigar la función de la FAP.

50 Ensayo de ficolina-3: se recubrieron placas Maxisorp (NUNC, Roskilde, Dinamarca, n.º de cat. 439454) con seroalbúmina bovina acetilada a 5 µg/ml durante 12 horas a 4 °C en tampón de recubrimiento ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15 mM,  $\text{NaHCO}_3$  35 mM, a pH 9,5). Después de bloquear/lavar cuatro veces en tampón de barbitol/tween (barbitol 4 mM, NaCl 145 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, pH 7,4 + Tween al 0,05 %), se añadió ficolina-3 humana recombinante a 500 ng/ml de tampón barbitol/tween y se incubó durante 1,5 horas a 20 °C con agitación. Después de lavar las placas dos veces en tampón de barbitol/tween, se añadieron FAP recombinante, MASP-1, -2 o -3 humana como sobrenadantes de cultivo en medio sin suero en diluciones en serie en la primera dimensión en placas separadas y

se incubaron durante 1 hora a 20 °C con agitación. Después de lavar las placas dos veces en tampón de barbital/tween, se añadió suero deficiente en ficolina-3 o MASP-2 en diluciones en serie en la segunda dimensión en las placas y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Después de lavar las placas cuatro veces en tampón barbital/tween, se midió la deposición del factor de complemento C4 mediante incubación durante 1 hora a 20 °C con anticuerpos policlonales de conejo contra C4c humano (Dako, Glostrup, Dinamarca, n.º de cat Q0369) diluido a 1:2000, seguido de cuatro etapas de lavado e incubación con anticuerpos anti conejo de cerdo conjugados con peroxidasa de rábano picante (Dako, Glostrup, Dinamarca n.º de cat. P0399) durante 45 minutos a 20 °C. La señal que se obtuvo mediante las placas se desarrolló con 100 µl/pocillo de orto-fenilendiamina (OPD) (0,4 mg/ml) disuelto en tampón citrato (ácido cítrico 35 mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 65 mM, pH 5) con 0,12 % (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción enzimática se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y los niveles de densidad óptica (DO) se midieron a 490 nm-650 nm utilizando un lector cinético de V-max (Molecular Devices).

Ensayo de lectina de unión a manosa: placas Maxisorp (NUNC, Roskilde, Dinamarca, 439454) se recubrieron con manano (Sigma-Aldrich, Broenby, Dinamarca, n.º de cat. M7504-1G) a 10 µg/ml durante 12 horas a 4 °C en tampón de recubrimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, a pH 9,5). Después de bloquear/lavar cuatro veces en tampón de barbital/tween (barbital 4 mM, NaCl 145 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,4 + Tween al 0,05 %) se añadió lectina de unión a manosa humana recombinante a 0,5 µg/ml de tampón barbital/tween y se incubó durante 1,5 horas a 20 °C con agitación. Después de lavar las placas dos veces en tampón de barbital/tween, se añadieron FAP recombinante, MASP-1, -2 o -3 humana como sobrenadantes de cultivo en medio sin suero en diluciones en serie en la primera dimensión en placas separadas y se incubaron durante 1 hora a 20 °C con agitación. Después de lavar las placas dos veces en tampón de barbital/tween, se añadió suero deficiente en MBL o MASP-2 en diluciones en serie en la segunda dimensión en las placas y se incubó durante 45 minutos a 37 °C. Después de lavar las placas cuatro veces en tampón barbital/tween, se midió la deposición del factor de complemento C4 mediante incubación durante 1 hora a 20 °C con anticuerpos policlonales de conejo contra C4c humano (Dako, Glostrup, Dinamarca, n.º de cat Q0369) diluido a 1:2000, seguido de cuatro etapas de lavado e incubación con anticuerpos anti conejo de cerdo conjugados con peroxidasa de rábano picante (Dako, Glostrup, Dinamarca n.º de cat. P0399) durante 45 minutos a 20 °C. La señal que se obtuvo mediante las placas se desarrolló con 100 µl/pocillo de orto-fenilendiamina (OPD) (0,4 mg/ml) disuelto en tampón citrato (ácido cítrico 35 mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 65 mM, pH 5) con 0,12 % (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción enzimática se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y los niveles de densidad óptica (DO) se midieron a 490 nm-650 nm utilizando un lector cinético de V-max (Molecular Devices).

Ensayo de genotipado: Se pueden realizar diferentes ensayos de genotipado cuando el genotipo se determina en individuos que usan ensayos biológicos. Se podrían utilizar diferentes tipos de ensayos, tales como:

- procedimientos basados en hibridación
  - Hibridación dinámica específica de alelo
  - Balizas moleculares
  - Micromatrices de SNP
- procedimientos basados en enzimas
  - Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción
  - procedimientos basados en PCR
  - Flap endonucleasa
  - Extensión del cebador
  - 5'-nucleasa
  - Ensayo de oligonucleótido ligasa
- Otros procedimientos de postamplificación basados en las propiedades físicas del ADN
  - Polimorfismo de conformación monocatenaria
  - Electroforesis en gel con gradiente de temperatura
  - Desnaturalización de cromatografía líquida de alto rendimiento
  - Fusión de alta resolución de todo el amplicón
  - SNPlex
- Secuenciación

## 50 Administración y composiciones farmacéuticas

### *Tratamientos combinados*

El polipéptido asociado a ficolina como se define en la presente memoria descriptiva puede administrarse simultánea o secuencialmente con una o más proteínas seleccionadas de ficolina-1,2, 3 y lectina de unión a manosa (MBL). Los factores pueden suministrarse en forma de dosificación única en la que la forma de dosificación única contiene ambos compuestos, o en forma de un kit de partes que comprende una preparación de un polipéptido asociado a ficolina como una primera forma de dosificación unitaria y una preparación de el uno o más otros compuestos como

una segunda forma de dosificación unitaria. Cada vez que una primera o segunda o tercera, etc., dosis unitaria se menciona en esta memoria descriptiva, esto no indica el orden de administración preferido, pero se hace simplemente con fines de conveniencia.

5 Por dosificación "simultánea" de una preparación de un polipéptido asociado a ficolina y una preparación de uno o más compuestos distintos se entiende la administración de los compuestos en una forma de dosificación única o la administración de un primer agente seguido de la administración de un segundo agente con una separación de tiempo de no más de 15 minutos, preferentemente 10, más preferente 5, más preferente 2 minutos. Cualquiera de los dos factores puede administrarse primero.

10 Por dosificación "secuencial" se entiende la administración de un primer agente seguido de la administración de un segundo agente con un tiempo de separación de más de 15 minutos. Cualquiera de las dos formas de dosificación unitaria puede administrarse primero. Preferentemente, ambos productos se inyectan a través del mismo acceso intravenoso.

15 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido asociado a ficolina que está presente en una concentración de suero/plasma de 0 mg/ml a 1 mg/ml, y en la que la formulación tiene un pH de 2,0 a 10,0. La formulación puede comprender además un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, agente(s) quelante(s), estabilizantes y tensioactivos. En algunas realizaciones de la invención, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. Normalmente, dicha formulación es una solución o una suspensión. En una realización adicional de la invención, la formulación farmacéutica es una solución acuosa. La expresión "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende al menos 50 % p/p de agua. Igualmente, la expresión "solución acuosa" se define como una solución que comprende al menos el 50 % p/p de agua, y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos el 50 % p/p de agua.

20

En otras realizaciones, la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, a la cual el médico o el paciente añaden disolventes y/o diluyentes antes de su uso.

25 En otras realizaciones, la formulación farmacéutica es una formulación desecada (por ejemplo, liofilizada o secada por pulverización) lista para su uso sin ninguna disolución previa.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende una solución acuosa de un polipéptido asociado a ficolina, y un tampón, en la que el polipéptido asociado a ficolina está presente en una concentración de suero/plasma de 0-1 mg/ml o superior, y en la que la formulación tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0.

30

En otras realizaciones de la invención, el pH de la formulación se selecciona de la lista que consiste en 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 y 10,0.

35 En una realización adicional de la invención, el tampón se selecciona del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrogenofosfato disódico, fosfato de sodio y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de la invención.

40 En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional de la invención, el conservante se selecciona del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y tiomerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorohexidina, deshidroacetato sódico, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1,2-diol) o mezclas de los mismos. En una realización adicional de la invención, el conservante a una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el conservante a una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el conservante a una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el conservante a una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

45

50

En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un agente isotónico. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico se selecciona del grupo que consiste en una sal (por ejemplo, cloruro de sodio), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (por ejemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ejemplo, glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenglicol (por ejemplo, PEG400) o mezclas de los mismos. Se puede usar cualquier azúcar, tal como monosacáridos, disacáridos o polisacáridos, o glucanos solubles

55

en agua, incluyendo, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietilalmidón y carboximetilcelulosa-Na. En algunas realizaciones, el aditivo de azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitól. En algunas realizaciones, el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcar mencionados anteriormente se pueden usar de forma individual o en combinación. No hay límite fijo a la cantidad utilizada, Siempre que el azúcar o el alcohol de azúcar sea soluble en la preparación líquida y no afecte de forma adversa a los efectos estabilizadores logrados usando los procedimientos de la invención. En algunas realizaciones, la concentración de azúcar o alcohol de azúcar está entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico está presente a una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico está presente a una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico está presente a una concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico está presente a una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un agente quelante. En una realización adicional de la invención, el agente quelante se selecciona de sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, y mezclas de los mismos. En una realización adicional de la invención, el agente quelante está presente a una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente quelante está presente a una concentración de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente quelante está presente a una concentración de 2 mg/ml a 5 mg/ml. Cada uno de estos agentes quelantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un estabilizante. El uso de un estabilizante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

Más particularmente, las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen un polipéptido que posiblemente muestra formación de agregados durante el almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas. Por "formación de agregados" se entiende una interacción física entre las moléculas polipeptídicas que produce la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles o grandes agregados visibles que precipitan de la solución. Por "durante el almacenamiento" se entiende una composición o formulación farmacéutica líquida una vez preparada, que no se administra inmediatamente a un sujeto. En su lugar, tras la preparación, se envasa para su almacenamiento, ya sea en forma líquida, en estado congelado, o en forma seca para su posterior reconstitución en una forma líquida u otra forma adecuada para la administración a un sujeto. Por "forma seca" se entiende la composición farmacéutica líquida o la formulación se seca mediante liofilización (es decir, liofilización; véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38: 48-59), secado por pulverización (véase Masters (1991) en Spray-Drying Handbook (5ª ed; Longman Scientific and Technical, Essex, Reino Unido), pág. 491-676; Broadhead y col., (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; y Mumenthaler y col., (1994) Pharm. Res. 11: 12-20), o secado al aire (Carpenter y Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; y Roser (1991) Biopharm. 4:47-53). La formación de agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar de forma adversa a la actividad biológica de ese polipéptido, dando como resultado la pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede causar otros problemas, como el bloqueo de tubos, membranas, o bombas cuando la composición farmacéutica que contiene el polipéptido se administra utilizando un sistema de infusión.

La composiciones farmacéuticas de la invención pueden además comprender una cantidad de una base de aminoácidos suficiente para disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de la composición. Por "base de aminoácidos" se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido dado está presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Cuando se usa una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en sus formas de base libre, todos pueden estar presentes en sus formas de sal, o algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre, mientras que otros están presentes en sus formas de sal. En algunas realizaciones, los aminoácidos para usar en la preparación de las composiciones de la invención son aquellos que llevan una cadena lateral cargada, tales como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, isómero L, D, o una mezcla de los mismos) de un aminoácido concreto (por ejemplo, metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y mezclas de los mismos) o combinaciones de estos estereoisómeros, puede estar presente en las composiciones farmacéuticas de la invención siempre que el aminoácido concreto esté presente en su forma de base libre o en su forma de sal. En algunas realizaciones, se usa el estereoisómero L. Las composiciones de la invención también se pueden formular con análogos de estos aminoácidos. Por "análogo de aminoácido" se pretende decir un derivado del aminoácido natural que conlleva el efecto deseado de disminuir la

formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil L-arginina, los análogos de metionina adecuados incluyen etionina y butionina y los análogos de cisteína adecuados incluyen S-metil-L cisteína. Al igual que con los otros aminoácidos, los análogos de aminoácidos se incorporan a las composiciones en su forma de base libre o en su forma de sal. En una realización adicional de la invención, los aminoácidos o análogos de aminoácidos se usan en una concentración, que es suficiente para prevenir o retrasar la agregación de la proteína.

En una realización adicional de la invención se puede añadir metionina (u otro aminoácido sulfúrico o análogo de aminoácido) para inhibir la oxidación de los residuos de metionina en sulfóxido de metionina cuando el polipéptido que actúa como agente terapéutico es un polipéptido que comprende al menos un residuo de metionina susceptible a dicha oxidación. Por "inhibe" se quiere decir la acumulación mínima de especies de metionina oxidada con el tiempo. La inhibición de la oxidación de metionina tiene como resultado una mayor conservación del polipéptido en su forma molecular adecuada. Se puede usar cualquier estereoisómero de metionina (isómero L, D o DL) o combinaciones de los mismos. La cantidad a añadir deberá ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de metionina de modo que la cantidad de sulfóxido de metionina es aceptable para las agencias reguladoras. Normalmente, esto significa que la composición no contiene más de aproximadamente 10 % a aproximadamente 30 % de sulfóxido de metionina. En general, esto se puede lograr añadiendo metionina de manera tal que la proporción de metionina añadida a los residuos de metionina varíe de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1, tal como de 10:1 a aproximadamente 100:1.

En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un estabilizante seleccionado del grupo de polímeros de peso molecular alto o compuestos de peso molecular bajo. En una realización adicional de la invención, el estabilizador se selecciona de polietilenglicol (por ejemplo, PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi/hidroxi celulosa o derivados de la misma (por ejemplo, HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltioetanol, y diferentes sales (por ejemplo, cloruro de sodio). Cada uno de estos estabilizantes específicos constituye una realización alternativa de la invención.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes estabilizantes adicionales, que potencian adicionalmente la estabilidad de un polipéptido terapéuticamente activo en su interior. Agentes estabilizantes de particular interés para la presente invención incluyen, pero sin limitación, metionina y EDTA, que protegen el polipéptido contra la oxidación de metionina, y un tensioactivo no iónico, que protege el polipéptido contra la agregación asociada con la congelación-descongelación o el cizallamiento mecánico.

En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un tensioactivo. En una realización adicional de la invención, el tensioactivo se selecciona de un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, polímeros de bloques de polioxipropileno-polioxietileno (por ejemplo, poloxámeros como Pluronic® F68, poloxámero 188 y 407, Triton X-100), ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitán, derivados de polioxietileno y polietileno, tales como derivados alquilados y alcoxilados (tweens, por ejemplo, Tween-20, Tween-40, Tween-80 y Brij-35), monoglicéridos o derivados etoxilados de los mismos, diglicéridos o derivados de polioxietileno de los mismos, alcoholes, glicerol, lectinas y fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (por ejemplo, ácido dipalmitoil fosfatídico) y lisofosfolípidos (por ejemplo, palmitoil lisofosfatidil-L-serina y 1-acil-sn-glicero-3-fosfato-ésteres de etanolamina, colina, serina o treonina) y derivados alquilo, alcoxilo (éster alquílico), alcoxi (éter alquílico) de lisofosfatidilo y fosfatidilcolinas, por ejemplo, derivados de lauroilo y miristoilo de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de la cabeza polar, es decir, colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y el DODAC cargado positivamente, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, y glicerofosfolípidos (por ejemplo, cefalinas), gliceroglicolípidos (por ejemplo, galactopiranosido), esfingoglicolípidos (por ejemplo, ceramidas, gangliósidos), dodecilsulfocolina, lisolecitina de huevo de gallina, derivados de ácido fusídico (por ejemplo, tauro-dihidrofusidato de sodio, etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales de los mismos C6-C12 (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados N<sup>o</sup>-acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados de cadena lateral de lisina o arginina, derivados N<sup>o</sup>-acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivado acilado en N<sup>o</sup> de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato sódico, n.º de registro CAS [577-11-7]), docusato cálcico, n.º de registro CAS [128-49-4]), docusato de potasio, n.º de registro CAS [7491-09-0]), SDS (dodecil sulfato de sodio o laurilsulfato de sodio), caprilato de sodio, ácido cólico o sus derivados, ácidos biliares y sales de los mismos y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, desoxicolato de sodio, taurocolato sódico, glicocolato de sodio, N-hexadecil-N, N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos monovalentes aniónicos (alquil-aril-sulfonatos), tensioactivos zwitteriónicos (por ejemplo, N-alquil-N, N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-cholamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternario) (por ejemplo, bromuro de cetil-trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos no iónicos (por ejemplo, Dodecyl β-D-glucopiranosido), poloxaminas (por ejemplo, Tetronic's), que son copolímeros de bloques tetrafuncionales derivados de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a etilendiamina, o el tensioactivo puede seleccionarse del grupo de derivados de imidazolina, o mezclas de los mismos. Cada uno de



estos tensioactivos específicos constituye una realización alternativa de la invención.

El uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

5 Es posible que otros ingredientes puedan estar presentes en la formulación farmacéutica peptídica de la presente invención. Tales ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de carga, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, seroalbúmina humana, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido, tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tales ingredientes adicionales, por supuesto, no deberían afectar de forma adversa a la estabilidad general de la formulación farmacéutica de la presente invención.

10 Las composiciones farmacéuticas que contienen un polipéptido asociado a ficolina de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un paciente que necesite tal tratamiento en varios sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, sitios de la piel y la mucosa, en sitios que evitan la absorción, por ejemplo, administración en una arteria, en una vena, en el corazón, y en sitios que implican absorción, por ejemplo, administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.

15 La administración tópica puede ser una ventaja particular en el tratamiento de afecciones asociadas con inflamación local, tal como en el tratamiento de la inflamación asociada con quemaduras u otras afecciones asociadas con la piel. En consecuencia, en algunas realizaciones la administración es por administración tópica.

En algunas realizaciones particulares, se pueden gotas oculares en afecciones asociadas con el ojo, tal como queratitis, tal como queratitis lamelar difusa (DLK).

20 La administración de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención puede ser a través de varias vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago y el intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alvéolos o una combinación de los mismos, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo a través de la conjuntiva, uretral, y parenteral para pacientes que necesitan tal tratamiento.

25 Las composiciones de la presente invención pueden administrarse en varias formas de dosificación, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, pomadas, pastas, yesos, ungüentos, comprimidos, tabletas recubiertas, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, pastillas, geles, pulverizadores, polvo, aerosoles, inhaladores, gotas oculares, ungüentos oftálmicos, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, ungüentos vaginales, solución inyectable, soluciones de transformación *in situ*, por ejemplo, gelificación *in situ*, ajuste *in situ*, precipitación *in situ*, cristalización *in situ*, solución de infusión, e implantes.

35 Las composiciones de la invención pueden además ser compuestas en, o unirse a, por ejemplo, a través de interacciones covalentes, hidrofóbicas y electrostáticas, un vehículo farmacológico, sistema de administración de medicamentos y sistema avanzado de administración de medicamentos para mejorar aún más la estabilidad del polipéptido asociado a la ficolina, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, lograr cronoterapia bien conocido por los expertos en la técnica, y aumentar el cumplimiento del paciente o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de vehículos, los sistemas de administración de medicamentos y los sistemas avanzados de administración de medicamentos incluyen, pero sin limitación, polímeros, por ejemplo celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo dextrano y derivados, almidón y derivados, alcohol de polivinilo), polímeros de acrilato y metacrilato, ácidos polilácticos y poliglicólicos y sus copolímeros de bloques, polietilenglicoles, proteínas transportadoras, por ejemplo, albúmina, geles, por ejemplo, sistemas de termogelificación, por ejemplo, sistemas de copolímeros de bloques bien conocidos por los expertos en la técnica, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y sus dispersiones, fase L2 y sus dispersiones, bien conocidos por los expertos en la técnica del comportamiento de fases en sistemas de lípidos en agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, autoemulsionante, auto-microemulsificante, ciclodextrinas y derivados de las mismas, y dendrímeros.

45 Las composiciones de la presente invención son útiles en la formulación de sólidos, semisólidos, polvo y soluciones para la administración pulmonar del polipéptido asociado a ficolina, usando, por ejemplo, un inhalador de dosis medida, inhalador de polvo seco y un nebulizador, siendo todos ellos dispositivos bien conocidos por los expertos en la técnica.

55 Las composiciones de la presente invención son específicamente útiles en la formulación de sistemas de administración de fármacos de liberación controlada, sostenida, prolongada, retardada y lenta. Más específicamente, pero sin limitación, las composiciones son útiles en la formulación de sistemas de liberación controlada parenteral y liberación sostenida (ambos sistemas conducen a una reducción múltiple en el número de administraciones), bien conocidos por los expertos en la técnica. Incluso más preferentemente, los sistemas de liberación controlada y de liberación sostenida se administran por vía subcutánea. Sin limitar el alcance de la invención, los ejemplos de sistemas y composiciones de liberación controlada útiles son hidrogeles, geles oleaginosos, cristales líquidos, micelas poliméricas, microesferas, nanopartículas.

Los procedimientos para producir sistemas de liberación controlada útiles para las composiciones de la presente invención incluyen, pero sin limitación, cristalización, condensación, cocrystalización, precipitación, coprecipitación, emulsificación, dispersión, homogeneización a alta presión, encapsulación, secado por pulverización, microencapsulación, coacervación, separación de fases, evaporación del disolvente para producir microesferas, procedimientos de extrusión y fluidos supercríticos. Se hace referencia general al Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000) y Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000).

La administración parenteral se puede realizar por vía subcutánea, intramuscular, inyección intraperitoneal o intravenosa mediante jeringa, opcionalmente una jeringa similar a una pluma. Como alternativa, la administración parenteral se puede realizar mediante una bomba de infusión. Una opción adicional es una composición que puede ser una solución o suspensión para la administración del polipéptido asociado a ficolina en forma de un aerosol nasal o pulmonar. Como todavía una opción adicional, las composiciones farmacéuticas que contienen el polipéptido asociado a ficolina de la invención también pueden adaptarse a la administración transdérmica, por ejemplo, por inyección sin aguja o por un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o administración transmucosa, por ejemplo, bucal.

La expresión "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con mayor estabilidad física, mayor estabilidad química o mayor estabilidad física y química.

La expresión "estabilidad física" de la formulación de proteínas como se usa en el presente documento se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles de la proteína como resultado de la exposición de la proteína a esfuerzos termomecánicos y/o interacción con interfaces y superficies desestabilizadoras, tales como superficies e interfaces hidrófobas. La estabilidad física de las formulaciones de proteína acuosa se evalúa por medio de inspección visual y/o mediciones de la turbidez después de exponer la formulación cargada en recipientes adecuados (por ejemplo, cartuchos o viales) a tensión mecánica/física (por ejemplo, agitación) a diferentes temperaturas durante varios periodos de tiempo. La inspección visual de las formulaciones se realiza en una luz focalizada nítida con un fondo oscuro. La turbidez de la formulación se caracteriza por una puntuación visual que clasifica el grado de turbidez en, por ejemplo, una escala de 0 a 3 (una formulación que muestra ausencia de turbidez corresponde a una puntuación visual de 0 y una formulación que muestra turbidez visual con luz diurna corresponde a una puntuación visual de 3). Una formulación se clasifica como físicamente inestable con respecto a la agregación de proteínas, cuando muestra turbidez visual a la luz del día. Como alternativa, la turbidez de la formulación puede evaluarse mediante simples mediciones de turbidez bien conocidas por los expertos. La estabilidad física de las formulaciones de proteína acuosas también se puede evaluar usando un agente o sonda espectroscópico del estado conformacional de la proteína. Preferentemente, la sonda es una molécula pequeña que preferentemente se une a un conformador no nativo de la proteína. Un ejemplo de una sonda espectroscópica molecular pequeña de la estructura proteica es tioflavina T. La tioflavina T es un pigmento fluorescente que se ha usado ampliamente para la detección de fibrillas de amiloide. En presencia de fibrillas, y quizás también de otras configuraciones de proteínas, la tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y una emisión mejorada a aproximadamente 482 nm cuando se une a una forma de proteína de fibrilla. La tioflavina T no unida es esencialmente no fluorescente en las longitudes de onda.

Se pueden usar moléculas pequeñas como sondas de los cambios de la estructura proteica desde estados nativos a no nativos. Por ejemplo, las sondas de "parche hidrófobo" se unen, preferentemente, a parches hidrófobos expuestos de una proteína. Los parches hidrófobos generalmente están enterrados dentro de la estructura terciaria de una proteína en su estado nativo, pero se exponen a medida que una proteína comienza a desplegarse o desnaturalizarse. Los ejemplos de estas pequeñas sondas moleculares espectroscópicas son colorantes aromáticos, hidrófobos, tales como antraceno, acridina, fenantrolina o similares. Otras sondas espectroscópicas son complejos de metal-aminoácidos, tales como complejos metálicos de cobalto de aminoácidos hidrófobos, tales como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina y valina, o similares.

La expresión "estabilidad química" de la formulación proteica, como se usa en el presente documento, se refiere a cambios covalentes químicos en la estructura de la proteína que conducen a la formación de productos de degradación química con una potencial disminución de la potencia biológica y/o un potencial incremento de las propiedades inmunogénicas en comparación con la estructura nativa de la proteína. Se pueden formar varios productos de la degradación química según el tipo y la naturaleza de la proteína nativa y el entorno al que se expone la proteína. Lo más probable es que la eliminación de la degradación química no se pueda evitar por completo y, a menudo, se observan cantidades cada vez mayores de productos de degradación química durante el almacenamiento y el uso de la formulación de proteínas, bien conocida por los expertos en la materia. La mayoría de las proteínas son propensas a la desamidación, un procedimiento en el que el grupo amida de la cadena lateral en los residuos glutaminilo o asparaginilo se hidroliza para formar un ácido carboxílico libre. Otras vías de degradación implican la formación de productos de transformación de alto peso molecular donde dos o más moléculas de proteínas se unen covalentemente entre sí a través de la transamidación y/o las interacciones de disulfuro que conducen a la formación de un dímero unido covalentemente, productos de degradación de oligómeros y polímeros (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern, T.J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992). La oxidación (de, por ejemplo, residuos metionina) se puede mencionar como otra variante de la degradación química. La estabilidad química de la formulación de proteínas puede evaluarse midiendo la cantidad de productos de degradación química

5 en diversos puntos temporales después de la exposición a diferentes condiciones ambientales (la formación de productos de degradación a menudo puede acelerarse, por ejemplo, aumentando la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual a menudo se determina mediante la separación de los productos de degradación, dependiendo del tamaño molecular y/o de la carga usando varias técnicas cromatográficas (por ejemplo, SEC-HPLC y/o RP-HPLC).

Por lo tanto, como se ha indicado anteriormente, una "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con mayor estabilidad física, mayor estabilidad química o mayor estabilidad física y química. En general, una formulación debe ser estable durante el uso y almacenamiento (en cumplimiento de las condiciones de uso y almacenamiento recomendadas) hasta que llegue la fecha de caducidad.

10 En algunas realizaciones de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el polipéptido asociado a ficolina es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento. En otras realizaciones de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el polipéptido asociado a ficolina es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento. En una realización adicional de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el polipéptido asociado a ficolina es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento. En una realización aún más de 15 de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el polipéptido asociado a ficolina es estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

*Realizaciones específicas de la invención*

20 Como se ha descrito anteriormente, la presente invención se refiere a polipéptidos asociados a ficolina aislados que tiene en su extremo C-terminal la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos 20-380 de la SEQ ID NO: 1, o una variante funcional de la misma que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención es sustancialmente puro.

25 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención es capaz de asociarse con lectina de unión a manosa (MBL).

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención es capaz de asociarse con cualquiera de ficolina-1, ficolina-2 o ficolina-3.

30 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención es capaz de asociarse con uno cualquiera de C1q, proteínas surfactantes de pulmón SP-A y/o SP-D, y moléculas de defensa de tipo colágeno intracelular, tal como CLL-11.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención es capaz de asociarse con una proteína aceptora específica, tal como un receptor específico.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos 20-297 de la SEQ ID NO: 3, o una variante funcional de la misma.

35 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos 20-380 de la SEQ ID NO:1 o una variante funcional de la misma.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos 16-296 de la SEQ ID NO: 9 o una variante funcional de la misma.

40 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención tiene una masa molecular de aproximadamente 40 kDa en condiciones no reductoras en una SDS-PAGE.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención está glicosilado en N en uno o dos aminoácidos correspondientes a una posición seleccionada entre 49 y 178 de la SEQ ID NO:1.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención es una proteína recombinante.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención está en forma de homodímero.

45 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención consiste en la secuencia de aminoácidos 20-380 de la SEQ ID NO1.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o variantes o fragmentos inmunológicos de la misma.

50 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención consiste en la SEQ ID NO:4, o variantes o fragmentos inmunológicos de la misma.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención participa en la fagocitosis de las células moribundas o muertas, tales como células apoptóticas y/o residuos celulares.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención participa en la fagocitosis de un microorganismo.

- 5 En algunas realizaciones, los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo monoclonal.

En algunas realizaciones, los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de acuerdo con la presente invención son anticuerpos policlonales.

- 10 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la presente invención tiene una actividad similar a otras proteínas con homología de secuencia, tales como la proteína adaptadora de envolvimiento (GULP). En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 70 % idéntica a la secuencia de SEQ NO: 2.

En algunas realizaciones, la célula huésped de acuerdo con la presente invención es una célula eucariota.

En algunas realizaciones, la célula huésped de acuerdo con la presente invención es de origen mamífero.

- 15 En algunas realizaciones, la célula huésped de acuerdo con la presente invención se selecciona del grupo que consiste en células CHO, células HEK y células BHK.

Las realizaciones descritas en el presente documento se refieren al tratamiento de cualquier indicación asociada con inflamación, apoptosis y/o autoinmunidad.

- 20 Las realizaciones descritas en el presente documento se refieren al tratamiento de cualquier afección autoinmune, tal como la enfermedad de Addison, anemia hemolítica autoinmunitaria, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Crohn, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica, esclerosis múltiple, miastenia gravis, psoriasis, cirrosis biliar primaria, artritis reumatoide y uveítis, asma, aterosclerosis, diabetes de tipo I, psoriasis, varias alergias.

- 25 Las realizaciones descritas en el presente documento se refieren al tratamiento de cualquier trastorno inflamatorio seleccionado del grupo que consiste en apendicitis, úlcera péptica, úlcera gástrica, úlcera duodenal, peritonitis, pancreatitis, colitis ulcerosa, colitis pseudomembranosa, colitis aguda, colitis isquémica, diverticulitis, epiglotitis, acalasia, colangitis, colecistitis, hepatitis, enfermedad de Crohn, enteritis, enfermedad de Whipple, alergia, enfermedad del complejo inmune, isquemia de órganos, lesión por reperfusión, necrosis de órganos, fiebre del heno, sepsis, septicemia, choque endotóxico, caquexia, hiperpirexia, granuloma eosinofílico, granulomatosis, sarcoidosis,

- 30 aborto séptico, epididimitis, vaginitis, prostatitis, uretritis, bronquitis, enfisema, rinitis, neumonitis, neumotransmicroscopicsilicovolcanoconiosis, alveolitis, bronquiolitis, faringitis, pleuresía, sinusitis, gripe, infección por virus sincitial respiratorio, infección por VIH, infección por el virus de la hepatitis B, infección por el virus de la hepatitis C, bacteriemia diseminada, dengue, candidiasis, malaria, filariasis, amebiasis, quistes hidatídicos, quemaduras, dermatitis, dermatomiositis, quemaduras solares, urticaria, verrugas, habones, vasulitis, angiitis,

- 35 endocarditis, arteritis, aterosclerosis, tromboflebitis, pericarditis, miocarditis, isquemia miocárdica, periarteritis nodosa, fiebre reumática, enfermedad del Alzheimer, enfermedad celíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, meningitis, encefalitis, esclerosis múltiple, infarto cerebral, embolia cerebral, síndrome de Guillain-Barre, neuritis, neuralgia, lesión de la médula espinal, parálisis, uveítis, artritis, artralgias, osteomielitis, fascitis, enfermedad de Paget, gota, enfermedad periodontal, artritis reumatoide, sinovitis,

- 40 miastenia gravis, tiroiditis, lupus sistémico eritematoso, síndrome de Goodpasture, síndrome de Behcet, rechazo de aloinjertos, enfermedad del injerto contra el huésped, diabetes de tipo I, espondilitis anquilosante, enfermedad de Berger, síndrome de Reiter y enfermedad de Hodgkin, queratitis, diabetes de tipo 2, fibrosis quística, infarto de miocardio, lesión por reperfusión, apoplejía, dermatomiositis, síndrome metabólico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, sepsis, insuficiencia de múltiples órganos, coagulación intravascular diseminada, choque anafiláctico. Complicación vascular y nefropatía asociada con diabetes de tipo 1 y/o diabetes de tipo 2, meningitis,

- 45 septicemia bacteriana, paludismo complicado, síndrome urémico hemolítico atípico, síndrome urémico hemolítico, degeneración macular relacionada con la edad, hemoglobinuria paroxística nocturna, mordedura del veneno de serpiente, lesiones por quemaduras y complicaciones en trasplantes de órganos.

- 50 Las realizaciones descritas en el presente documento se refieren al tratamiento de cualquier trastorno inflamatorio seleccionado del grupo que consiste en isquemia de órganos, lesión por reperfusión, necrosis de órganos, vasulitis, endocarditis, aterosclerosis, tromboflebitis, pericarditis, miocarditis, isquemia miocárdica, periarteritis nodosa, fiebre reumática, insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, infarto cerebral, embolia cerebral. Complicaciones vasculares y nefropatía asociada con diabetes de tipo 1 y/o de tipo 2.

- 55 Las realizaciones descritas en el presente documento se refieren al tratamiento de cualquier indicación asociada con la coagulación, enfermedades trombóticas o coagulopáticas relacionadas.

- 60 Las realizaciones descritas en el presente documento se refieren al tratamiento de una indicación asociada con la coagulación, enfermedades o trastornos trombóticos o coagulopáticos, incluida la respuesta inflamatoria y enfermedades o trastornos tromboembólicos crónicos asociados con la formación de fibrina, incluidos trastornos vasculares, tales como trombosis, tales como trombosis venosa profunda, trombosis arterial, trombosis posquirúrgica, injerto de derivación de la arteria coronaria (CABG), angioplastia coronaria transdérmica percutánea

(ACTP), ictus por deposición de plaquetas, crecimiento tumoral, metástasis tumoral, angiogénesis, trombolisis, aterosclerosis, reestenosis, tales como arteriosclerosis y/o reestenosis después de angioplastia, indicaciones agudas y crónicas, tales como inflamación, sepsis, choque séptico, septicemia, hipotensión, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), coagulación intravascular diseminada (CID), embolia pulmonar, deposición patológica de plaquetas, infarto de miocardio, o el tratamiento profiláctico de mamíferos con vasos ateroscleróticos con riesgo de trombosis, enfermedad venooclusiva después del trasplante de células progenitoras de sangre periférica (PBPC), síndrome urémico hemolítico (SHU) y púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) y fiebre reumática. Las realizaciones descritas en el presente documento se refieren al tratamiento de una indicación asociada con la coagulación, enfermedades o trastornos tromboticos o coagulopáticos, incluida la respuesta inflamatoria y enfermedades o trastornos tromboembólicos crónicos asociados con la formación de fibrina, incluidos trastornos vasculares, tales como trombosis, tales como trombosis venosa profunda, trombosis arterial, trombosis posquirúrgica, injerto de derivación de la arteria coronaria (CABG), angioplastia coronaria transdérmica percutánea (ACTP), ictus por deposición de plaquetas, crecimiento tumoral, metástasis tumoral, angiogénesis, trombolisis, aterosclerosis, reestenosis, tales como arteriosclerosis y/o reestenosis después de angioplastia, indicaciones agudas y crónicas, tales como inflamación, deposición patológica de plaquetas, infarto de miocardio, o el tratamiento profiláctico de mamíferos con vasos ateroscleróticos con riesgo de trombosis, enfermedad venooclusiva después del trasplante de células progenitoras de sangre periférica (PBPC), síndrome urémico hemolítico (SHU) y púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) y fiebre reumática. Las realizaciones descritas en el presente documento se refieren a prevenir la aparición de complicaciones tromboembólicas en pacientes identificados de alto riesgo, tales como los que se someten a cirugía o aquellos con insuficiencia cardíaca congestiva. Las realizaciones descritas en el presente documento se refieren al tratamiento de una afección médica asociada con el corazón. Las realizaciones descritas en el presente documento se refieren al tratamiento de una afección médica asociada con una deficiencia en un polipéptido asociado a ficolina.

### Ejemplo 1

#### Detección de transcripción alternativa del gen *MASP1*

Procedimientos: Para detectar las tres variantes de transcripción de *MASP1*: *MASP1*, *MASP3* y *FAP*, se diseñaron cebadores específicos para cada variante. Se configuró la PCR con un cebador directo común en el exón 6 (5'-gcacccagagccacagtg-3') y cebadores inversos específicos: *MASP1* en el exón 12 (5'-gccttcagtggtggc-3'), *MASP3* en el exón 11 (5'-gccttcagagtgtgtca-3') y *FAP* en el exón 8a (5'-cgatctggagagcgaactc-3') (figura 1). Las amplificaciones en PCR se llevaron a cabo en volúmenes de 20 µl que contenían: 50 ng de ADNc de hígado (Clontech), 0,25 µM de cada cebador, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTP 0,2 mM, KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM, pH 8,4 y 0,4 unidades de platino Taq ADN polimerasa (Invitrogen). Las reacciones de PCR se realizaron a los siguientes parámetros de ciclado: 10 min a 94 °C, 30 o 40 ciclos (30 s a 94 °C, 50 s a 58 °C, 90 s a 72 °C), 10 min a 72 °C. Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 2 %.

Resultados: Se detectó una transcripción alternativa del gen *MASP1* en el ADNc de hígado. Los transcritos de *MASP1*, *MASP3* y *FAP* se amplificaron utilizando un cebador directo común ubicado en el exón 6 y los cebadores inversos específicos ubicados en el exón 12 (*MASP1*), el exón 11 (*MASP3*) y el exón 8a (*FAP*). *MASP1* genera un fragmento de 500 pb, *MASP3* genera un fragmento de 506 pb y *FAP* genera un fragmento de 309 pb.

#### Expresión tisular del fragmento *FAP*

Procedimientos: Se investigaron paneles de ADNc de tejido humano disponible comercialmente (Clontech) para la expresión de *MASP1*, *MASP3*, y *FAP* con los mismos ensayos de PCR como se ha descrito anteriormente. Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 2 %.

Resultados: Las distribuciones tisulares de los genes *MASP1*, *MASP3* y *FAP* se investigaron en paneles de ADNc de Clontech (figura 2). Los transcritos de *MASP1*, *MASP3* y *FAP* se amplificaron utilizando un cebador directo común y cebadores inversos específicos. Se usó GADPH como gen de referencia. Los tres genes estaban altamente expresados en el hígado y, además, el de *FAP* se expresaron fuertemente en tejido cardíaco (marcado con flechas negras). Se detectó una expresión menor del gen de *FAP* en el cerebro, colon, próstata, músculo esquelético e intestino delgado (marcado con flechas blancas).

#### Secuenciación de ADN del *FAP* exon 8a de 100 individuos.

Procedimientos: La secuenciación directa del exón 8a que incluye el límite intrón-exón del gen *MASP1/MASP3/FAP* que se extiende desde la posición +44,083 a +44,431 en relación con el sitio de inicio de la traducción ATG, se realizó en moldes de ADN genómico de 100 individuos caucásicos sanos. El fragmento se amplificó utilizando un solo conjunto de cebadores (directo: 5'-ctgttctcactacaggctg-3', inverso: 5'-ctgctgagatcatgtgttc-3'), donde los cebadores directos contenían una secuencia 5'-T7 (5'-ttatacgaactc-3'). Las amplificaciones en PCR se llevaron a cabo en volúmenes de 20 µl que contenían: 50 ng de ADN genómico, 0,25 µM de cada cebador, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTP 0,2 mM, KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM, pH 8,4 y 0,4 unidades de platino Taq ADN polimerasa (Invitrogen). Las

reacciones de PCR se realizaron a los siguientes parámetros de ciclado: 2 min a 94 °C, 15 ciclos (30 s a 94 °C, 60 s a 64 °C, 60 s a 72 °C), 15 ciclos (30 s a 94 °C, 60 s a 58 °C, 60 s a 72 °C), 5 min a 72 °C y se secuenciaron hacia adelante utilizando el kit de terminación de secuenciación de ciclo ABI BigDye (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con el protocolo que utiliza cebadores de secuencia biotinilados en 5'. Las reacciones de secuencia se purificaron en la estación de trabajo de preparación al vacío PyroMark (Biotage) usando cuentas de estreptavidina (GenoVision). El análisis de secuencia se realizó en un analizador genético ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Las secuencias de ADN resultantes se alinearon utilizando el software BioEdit, y los polimorfismos de ADN se confirmaron visualmente a partir de electroferogramas de secuencia.

Resultados: Todas las secuencias se alinearon utilizando el software BioEdit. No se observaron variaciones genéticas en los 100 individuos sanos en el exón 8a o las regiones exón-intrón.

## Ejemplo 2

### Inmunoprecipitación.

La inmunoprecipitación específica de MAP-1 del suero se realizó con el mAb 20C4 específico de MAP-1 (generado contra el péptido C-terminal específico de MAP-1 17) o el mAb 8B3, un anticuerpo monoclonal que reacciona contra la cadena pesada común de MASP-1/3 utilizado como anticuerpo de precipitación de control. Se permitió que un total de 10 µg de anticuerpo anti MAP-1 o MASP-1/3 se unieran a Dynabeads de IgG de ratón o conejo de oveja (M-280, n.º de cat. 112.02D/112.04D, Dynal/Invitrogen). Después de una etapa de lavado, las perlas se aplicaron a un conjunto de suero humano normal (diluido a 1:1 en TBS) y se incubaron de extremo a extremo durante 1 hora a 4 °C. Después de las etapas de lavado finales y la separación magnética, las perlas se hirvieron en tampón de carga de SDS y se sometieron a SDS-PAGE y se analizó la transferencia de tipo Western con anticuerpos contra MAP-1, MBL y ficolina-3.

El mismo procedimiento de precipitación que se ha descrito anteriormente se realizó con mAb frente a MBL (Hyb 131-11, Bioporto, Dinamarca), ficolina-2 (FCN219) y ficolina-3 (FCN334). Para compensar las diferencias en las concentraciones séricas de MBL, ficolina-2 y -3 se precipitaron a partir de 1 ml, 300 µl y 100 µl de suero, respectivamente. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y la transferencia de tipo Western se sondó con pAb contra MAP-1.

### Inmunohistoquímica.

Las células CHO que expresan rMAP-1 se cultivaron en matraces de cultivo en RPMI + 10 %. Las células se recolectaron a una confluencia del 80-90 %, las células se recolectaron y se fijaron durante 24 horas en formaldehído-PBS al 4 % y posteriormente se incluyeron en parafina. Seis tejidos hepáticos humanos diferentes y muestras de dos tejidos miocárdicos diferentes, dos tejidos de músculo esquelético y dos muestras obtenidas de aorta humana también se fijaron y se incluyeron en parafina como se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron secciones de rebanadas de 5 µm con un microtomo Leitz Wetzlar y se colocaron en portaobjetos de vidrio y se almacenaron a 4 °C hasta que se analizaron. Los pretratamientos y análisis se realizaron como se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos primarios fueron anticuerpos monoclonales específicos de MAP-1 mAb 12B11 o purificados por afinidad, anti-MAP-1 de conejo mono-específico diluido a 5 µg/ml. Se aplicaron controles de anticuerpos de isotipo a los tejidos a la misma concentración. El anticuerpo secundario fue el anticuerpo EnVision™ (HRP-anti ratón o HRP-anti conejo, Dako, Glostrup, Dinamarca). El análisis de los patrones de tinción se realizó bajo un microscopio Leica DMLB2.

### SDS-PAGE y transferencia de tipo Western.

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida Bis-Tris al 10 % o al 4-12 % (p/v) con soluciones tampón discontinuas utilizando el sistema NuPAGE® (Invitrogen) esencialmente como lo describe el fabricante. La transferencia de tipo Western se realizó utilizando membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF-HyBond, Amersham Bioscience), visualización de 2 µg/ml de mAb primarios y secundarios por HRP conjugada con estreptavidina (P0397, Dako) diluida a 1:1500 o IgG anti-ratón HRP-conejo (PO260, Dako) diluida a 1:1000 en PSB, Tween20 al 0,05 %. Las membranas se desarrollaron con 3-amino-9-etilcarbazol (Sigma) (0,04 % en acetona) y 0,015 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5.

### Ensayo de activación del complemento.

La influencia de MAP-1 en la deposición de factor de complemento C4 mediada por MBL y ficolina-3 se evaluó esencialmente como se ha descrito anteriormente. En resumen, el manano (ligando MBL) (Sigma-Aldrich M7504) o la seroalbúmina bovina acetilada (ligando de ficolina-3) se inmovilizó en placas ELISA de Maxisorp (Nunc, Dinamarca) a 10 µg/ml. Después de lavar con se añadió rMBL o r ficolina-3 (0,4 µg/ml) y se incubó durante 1,5 horas. Se aplicó rMAP-1 o rMASP-2 durante 1 hora en dos diluciones en serie en la primera dimensión, seguido de incubación durante 45 min a 37 °C con diluciones en serie del suero deficiente de MBL o ficolina-3 en la segunda dimensión. La deposición de C4 se midió utilizando un pAb a C4c (Q0369, Dako, Glostrup/Dinamarca).

Además, se evaluó el desplazamiento de MASP-2 con MAP-1 utilizando un sistema puro. La rMASP-2 se preincubó

durante 45 minutos a 20 ° C en diluciones seriadas en la primera dimensión en una matriz rMBL/manano como se ha descrito anteriormente, seguido de incubación con diluciones de rMAP-1 en la segunda dimensión durante 45 minutos a 20 ° C. El C4 purificado (de Quidel, CA, EE.UU.) se añadió a una concentración de 1 µg/ml y se incubó durante 45 minutos a 37 ° C. La detección se realizó como anteriormente.

5 Resultados.

MAP-1 co-precipita con ficolina-2, ficolina-3 y MBL

Para investigar una posible asociación de MAP-1 con MBL y ficolina-3, precipitamos complejos de suero usando tanto mAb20C4 anti MAP-1 como un mAb contra la cadena pesada común de MASP-1 y MASP-3 (mAb8B3). Los precipitados se analizaron posteriormente mediante transferencia de tipo Western sondada con anticuerpos contra MAP-1, MBL, y ficolina-3, respectivamente. Se observaron bandas pronunciadas de co-precipitación con ficolina-3, pero también se observaron bandas más débiles con MBL (figura 24A). Las muestras no se sondaron con anticuerpos contra ficolina-2 ya que no funcionaron en transferencia de tipo Western. A continuación, se invirtió la inmunoprecipitación usando mAb contra MBL, ficolina-2 y ficolina-3 para precipitar 1 ml, 300 µl y 100 µl de suero, respectivamente, que se realizó para ajustar las diferencias en la concentración sérica de MBL (2 µg/ml), ficolina-2 (5 µg/ml) y ficolina-3 (20 µg/ml), respectivamente. Las muestras se analizaron posteriormente mediante transferencia de tipo Western sondada con anticuerpos contra MAP-1. Se observaron bandas de MAP-1 distintas en los precipitados de ficolina-2 y -3 y se observó una banda mucho más débil en el precipitado de MBL, donde inmunoprecipitado rMAP-1 y suero MAP-1 sirvieron como controles (figura 24B).

MAP-1 inhibe la actividad del complemento de la vía de la lectina.

20 El suero deficiente de MBL y ficolina-3 en combinación con rMBL y r ficolina-3 se usó para reconstituir la actividad de activación de C4 del complemento de MBL y ficolina-3. Mannan y BSA acetilada sirvieron como ligandos para MBL y ficolina-3, respectivamente. Tanto rMBL como r ficolina-3 pudieron iniciar la deposición de C4 en los sueros deficientes en MBL y ficolina-3, respectivamente (figura 25A y 25D). La aplicación de rMASP-2 dio como resultado un fuerte aumento de la dosis positiva de la deposición de C4 a través de las vías de activación de ficolina-3 y MBL (figura 25B y 25E), mientras que la aplicación de rMAP-1 dio como resultado una inhibición pronunciada dependiente de la dosis del C4. deposición a través de ambas vías (figura 25C y 25F).

Además, abordamos un posible desplazamiento de MASP-2 con MAP-1 utilizando un sistema de componentes puros que comprende solo rMBL, rMASP-2, rMAP-1 y C4 purificado. rMASP-2 se preincubó con complejos manano/rMBL en diluciones en serie. Posteriormente, Se añadió rMAP-1 en concentraciones variables, seguido de la adición de C4 purificado. La aplicación de rMAP-1 al sistema resultó claramente en una inhibición dependiente de la dosis de la deposición de C4 (figura 26).

30 **Ejemplo 3**

Determinación de la concentración sérica y las propiedades de asociación de la nueva proteína asociada a MBL/Ficolina 1 (MAP-1).

35 Se generaron construcciones recombinantes no etiquetadas de longitud completa de MAP-1 y se expresaron de forma estable en células CHO-DG44. Se generaron anticuerpos monoclonales específicos contra MAP-1. También se estableció un ELISA cuantitativo para las mediciones séricas de MAP-1 y las asociaciones entre el suero MAP-1 y la ficolina-2, -3 y MBL se examinó por ELISA y fraccionamiento de gradiente de densidad.

Proteínas recombinantes

40 Las construcciones completas de MAP-1 humano no marcado se expresaron en células CHO-DG44 como se describe en otro lugar (Hummelshoj y col., Mol Immunol 44, 401-11,2007; Larsen y col., J Biol Chem 279:21302-11,2004; Ma y col., 2009 J Biol Chem, 9 de octubre; 284 (41)) con las modificaciones que el medio sin suero PowerCHO1 (Lonza, Vallensbaek/Dinamarca, www.lonza.com) se utilizó como medio de expresión. Se usó purificación por afinidad de anticuerpos para purificar rMAP-1 como se describió anteriormente (Skjoedt y col., 2009; Immunobiology, 23 de noviembre). En resumen, 15 mg del anticuerpo anti-MAP-1 (mAb 20C4) se acoplaron covalentemente a la sefarosa activada con CNBr esencialmente como se describe por Pfeiffer y col., (Pfeiffer y col., J Immunol Methods 97, 1-9, 1987) y se utilizó como matriz de purificación. La columna anti-MAP-1 también se usó para agotar MAP-1 del suero.

50 La generación de anticuerpos monoclonales se realizó como se ha descrito anteriormente (Skjoedt y col., J Biol Chem 285, 8234-43, 2010).

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida Bis-Tris al 10 % o al 4-12 % (p/v) con tampones discontinuos utilizando el sistema NuPAGE® (Invitrogen) como se recomienda. La transferencia de tipo Western se realizó utilizando membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF-HyBond, GE Healthcare). Las membranas se desarrollaron utilizando 2 µg/ml de mAb primarios y visualización secundaria por estreptavidina conjugada con HRP diluida a 1: 1500 o IgG anti-ratón con HRP de conejo (P0397/PO260, Dako, Glostrup/Dinamarca, www.dako.com)

con 0,04 % de 3-amino-9-etilcarbazol (Sigma-Aldrich, Broendby/Dinamarca, [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)) + 0,015 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un tampón de acetato de sodio 50 mM pH 5 como sustrato.

rMAP-1 se trató con N-glicosidasa-F/ENDO-F (kit de desglicosilación N-glicosidasa-F, Roche, Mannheim/Alemania, [www.roche.com](http://www.roche.com)) como se recomienda y ha descrito anteriormente (Skjoedt y col., 2009). Los productos se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras seguidas de tinción con Coomassie o transferencia de Western.

La especificidad del mAb 20C4 anti-MAP-1 se ha demostrado previamente (Skjoedt y col., 2010). El mAb 20C4 se usó como el anticuerpo de captura en un ELISA cuantitativo MAP-1 inmovilizado a 6 µg/ml en placas ELISA de Maxisorb (NUNC™, Roskilde/Dinamarca, [www.nuncbrand.com](http://www.nuncbrand.com)). Se aplicaron diluciones en serie del calibrador (rMAP-1 o rMAP-1 enriquecido en suero empobrecido en MAP-1) o muestras de suero de donante en PBS + Tween20 al 0,05 % + suero bovino al 0,5 % y EDTA 10 mM. El anticuerpo de detección fue un mAb 8B3 marcado con biotina que reaccionó con la cadena común de MASP-1, -3 y MAP-1 descritos anteriormente (Skjoedt y col., 2010; Skjoedt y col., 2009) aplicaron a 3 µg/ml.

Las concentraciones séricas de ficolina-2 y -3 se determinaron según lo descrito por Munthe-Fog y col., y Hummelshoj y col., (Hummelshoj y col., *Hum Mol Genet* 14, 1651-8, 2005; Munthe-Fog y col., *Scand J Immunol* 65, 383-92, 2007; Munthe-Fog y col., *Mol Immunol* 45, 2660-6, 2008) y las concentraciones séricas de MBL y MASP-3 se determinaron como se describió anteriormente (Skjoedt y col., 2009).

El desarrollo se obtuvo con orto-fenilendiamina (Dako, Glostrup/Dinamarca) y la reacción de la enzima se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M según lo recomendado. Los niveles de densidad óptica (OD<sub>490nm-650nm</sub>) se midieron utilizando un lector cinético V-max (Molecular Devices, Sunnyvale/CA/U.S).

La asociación relativa entre MAP-1 y MBL, ficolina-2 y -3 se evaluaron esencialmente como se describió anteriormente (Skjoedt y col., 2009) con la modificación de que el mAb 20C4 específico de MAP-1 se usó como anticuerpo de captura (recubierto a 6 µg/ml). Los mAb de detección fueron FCN-219 marcados con biotina (específicos de ficolina-2) o FCN-334 (específicos de ficolina-3) (24-25), o Hyb 131-11, todos aplicados a 2 µg/ml. Se analizaron las muestras de suero de los mismos 100 donantes de sangre daneses anteriores.

El suero humano normal se sometió a separación en gradiente de sacarosa. Se cargaron 0,75 ml de suero en columnas de centrifugación de 40 ml que consistían en 10-30 % de gradientes de sacarosa tamponados en Tris 10 mM, NaCl 145 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM y seroalbúmina humana 30 µg/ml. Las columnas cargadas se centrifugaron a 150.000 x g al vacío durante 24 horas a 4 ° C en una ultracentrífuga L70 Beckmann con una cabeza de rotor SW28. Se recogieron fracciones de 1,5 ml del fondo y se analizaron mediante ELISA específico o inmunotransferencia para los siguientes antígenos: MAP-1, MASP-1, MASP-2, MASP-3, sMAP, MBL, ficolina-2 y ficolina-3. Los picos del suero IgM (19S) e IgG (7S) también se evaluaron indicando la relación de superficie molecular a masa. Además, las fracciones se analizaron para determinar la capacidad de activación del C4 aplicado de forma exógena. En resumen, las fracciones se aplicaron en diluciones seriadas a placas ELISA recubiertas con BSA acetilado (un ligando ficolina-3) o manano (un ligando MBL) como se ha descrito anteriormente (Skjoedt y col., 2010) seguido de incubación durante 1 hora a 4 ° C con agitación. Las placas se lavaron y se incubaron con C4 purificado a 1 µg/ml durante 1 hora a 37 ° C. La deposición de C4 se midió posteriormente con anticuerpos policlonales contra C4c (Q 0369, Dako, Glostrup, Dinamarca).

#### Análisis estadístico

Estadísticas (correlación no paramétrica de Spearman, prueba t de dos colas no paramétrica) y los niveles séricos de MAP-1, MBL, ficolina-2 y -3 se calcularon utilizando el software Prism4 (software GraphPad, Inc., La Jolla/CA/US, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com))

#### Resultados

##### Purificación y caracterización de rMAP-1

La expresión de rMAP-1 en células CHO DG44 dio como resultado un alto rendimiento en presencia de metotrexato 150 nM (rendimiento: 10-20 µg/ml en medio sin suero). Después de la purificación, se analizó el rMAP-1 en SDS-PAGE seguido de tinción con azul brillante de Coomassie o inmunotransferencia. El análisis de tinción de SDS-PAGE/coomassie reveló una banda con una masa molecular reducida estimada de ~ 45 kDa (figura 27). La desglicosilación de rMAP-1 con N-glicosidasa F dio lugar a un cambio en la masa molecular a ~ 40 kDa correspondiente a la masa teórica sin péptido señal. Este patrón también se observó con inmunotransferencia utilizando anticuerpos específicos contra MAP-1.

##### Niveles séricos de MAP-1

Desarrollamos un ELISA cuantitativo para determinar el nivel sérico de MAP-1. El ensayo se basó en el mAb 20C4 específico de MAP-1 como anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección (mAb 8B3) que reconoce la cadena pesada común de MASP-1, -3 y MAP-1. Se observó un paralelismo perfecto entre el calibrador rMAP-1 purificado y



el MAP-1 purificado enriquecido con suero cargado de MAP-1 a una concentración conocida con curva estándar (figura 28A). Se analizó el nivel sérico de MAP-1 en 100 donantes de sangre daneses y encontramos una media de 240 ng/ml con un rango de 115-466 ng/ml (figura 29A). Se midió el nivel sérico de MASP-3 en el mismo grupo descrito anteriormente (Skjoedt y col., 2009) y representamos gráficamente la concentración de MAP-1 y MASP-3 (figura 29B). No se observó correlación entre la concentración sérica de MAP-1 y MASP-3, aunque representan transcripciones alternativas del mismo gen.

Se evaluó la estabilidad del antígeno y del ensayo en suero y durante los ciclos de congelación y descongelación (figura 29C). Se observó que la evaluación de MAP-1 fue muy robusta independientemente de los ciclos de congelación y descongelación.

#### 10 Asociación entre MAP-1 y ficolina-2, -3 y MBL

Para medir las interacciones entre MAP-1 y MBL, ficolina-2 y -3, se desarrollaron tres ELISA diferentes utilizando mAb 20C4 como anticuerpo de captura y sondeo con mAb marcados con biotina: FCN-219 (específico de ficolina-2), FCN-334 (específico de ficolina-3) o Hyb 131-11 (específico de MBL). Se analizaron las mismas muestras de suero de 100 donantes que se usaron para las determinaciones de MAP-1 y evaluamos los niveles de asociación de suero entre MAP-1 y ficolina-2, -3 y MBL como la D.O. relativa a 490-650 nm (figura 30A). Además se midió la concentración sérica de MBL, ficolina-2 y -3 como anteriormente (Skjoedt y col., 2009).

Se observó que MAP-1 existe en complejo con MBL, ficolina-2 y ficolina-3. Aparece, sin embargo, que la mayor parte de MAP-1 está asociada a las ficolinas y especialmente a ficolina-3 ( $p < 0,0001$ ), un patrón que también se ha observado anteriormente para MASP-3 (Skjoedt y col., 2009).

20 Se representaron las concentraciones séricas de MAP-1, MBL, ficolina-2 y -3 a los niveles de asociación relativos y encontraron que la asociación entre MAP-1 y MBL está altamente correlacionada con el nivel de MBL ( $r$  de Spearman: 0,92,  $p < 0,0001$ ) (figura 30B, lado superior derecho). En contraste con esto, la asociación relativa de MAP-1 a ficolina-2 y -3 se correlaciona con el nivel sérico de MAP-1 ( $r$  de Spearman: 0,45 y 0,61, respectivamente,  $p < 0,0001$ , Figura 30B lado izquierdo). Aunque se observó una cierta correlación entre la concentración de MAP-1 y la asociación relativa a MBL y la concentración de ficolina-3 a, las tendencias fueron menos pronunciadas.

#### 25 Fraccionamiento por gradiente de densidad

Con el fin de investigar la distribución de MAP-1 en relación con las moléculas asociadas y examinar cuánto parece no asociado, sometimos el suero humano normal a un fraccionamiento de densidad utilizando un gradiente de sacarosa del 10-30 % y una ultracentrifugación. Posteriormente se analizaron las fracciones recogidas para MAP-1, MASP-3, MBL, ficolina-2 y -3 por ELISA (figura 31A) y MAP-1, MASP-1, -2 y -3, sMAP, MBL, ficolina-2 y -3 por transferencia western (figura 31B). Los resultados mostraron que el suero MAP-1 solo estaba presente en las fracciones con las ficolinas y MBL, lo que sugiere que MAP-1 no existe como una molécula no asociada. El mismo patrón se observó para sMAP, MASP-1, -2 y -3. Adicionalmente los datos indican que la mayoría de MAP-1, sMAP y MASP-1, -2 y -3 co-localizan en las fracciones pico de ficolina-3. Esta distribución también se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna sephadex-200. Se observó un patrón de distribución equivalente de las moléculas (datos no mostrados).

Finalmente, evaluamos la capacidad de las fracciones de gradiente de sacarosa para activar el C4 aplicado exógenamente. Se usaron manano de fase sólida y BSA acetilada como ligandos para MBL y ficolina-3, respectivamente. Se observaron dos curvas de deposición de C4 diferentes que reflejan los picos de los complejos de ficolina-3 y MBL separados por el gradiente de sacarosa (figura 31C).

#### 40 Discusión

Para investigar los aspectos estructurales y establecer el nivel sérico de la nueva proteína asociada a MBL/Ficolina 1 (MAP-1), se expresó MAP-1 recombinante no marcada y se generaron anticuerpos específicos contra la misma. El tratamiento con N-glicosidasa F y el análisis SDS-PAGE indicaron que MAP-1 está glicosilada, lo que da como resultado una masa molecular de ~ 45 kDa con N-glicanos y ~ 40 kDa después de la desglucosilación equivalente a la masa molecular calculada a partir de la secuencia de aminoácidos deducida sin la péptido señal.

Se utilizó un anticuerpo monoclonal generado contra el extremo C-terminal específico de MAP-1 para establecer un ELISA de MAP-1 cuantitativo y para determinar el intervalo de concentración en suero en 100 donantes de sangre daneses sanos. Se encontró una concentración sérica relativamente baja (media: 240 ng/ml, intervalo 115-466 ng/ml) en el grupo donante en comparación con la concentración de MASP-3 (media: 6500 ng/ml). Además, no hubo correlación entre las concentraciones séricas de las dos proteínas, lo que sugiere que, aunque las dos moléculas son variantes diferenciadas del mismo gen, la regulación de la expresión es diferente. Recientemente, una diferencia significativa en la distribución tisular de MASP-1, -3 y se describió MAP-1 (Degn y col., 2009; Skjoedt y col., 2010). El descubrimiento de una diferencia importante en la concentración sérica entre MASP-3 y MAP-1 apoya aún más la noción de un mecanismo regulador diferencial de las variantes de transcripción derivadas del gen MASP1.

Se desarrollaron ensayos basados en ELISA para evaluar la asociación relativa entre el suero MAP-1 y MBL,

ficolina-2 y -3, respectivamente. Adicionalmente, se determinó la concentración sérica de ficolina-2, -3 y MBL para relacionarlos con los niveles de asociación relativos. Los resultados muestran que MAP-1 se asocia principalmente a ficolina-3 y ficolina-2 y que la asociación relativa a MBL parece menos pronunciada. Se podría argumentar que esta distribución refleja la diferencia en la concentración sérica media de MBL, ficolina-2 y ficolina-3. Sin embargo, aunque la asociación de MBL-MAP-1 se correlaciona con la concentración de MBL, la misma no es evidente para ficolina-2, donde la concentración de suero de MAP-1 se correlaciona con el nivel de asociación con ficolina-2. La asociación relativa entre ficolina-3 y MAP-1 estuvo altamente correlacionada con la concentración sérica de MAP-1, mientras que una correlación positiva con el nivel sérico de ficolina-3 fue muy débil. Los hallazgos anteriores indican que la asociación principal entre MAP-1 y ficolina-2 y -3 no se debe simplemente a la mayor concentración general de ficolina-2 y -3. Este patrón de distribución se confirmó aún más mediante el análisis del suero sometido a separación de gradiente de densidad. Encontramos una clara tendencia a que no solo MAP-1, sino también sMAP, MASP-1, -2 y -3 colocalizadas con las fracciones pico de ficolina-3. Este es un fenómeno que hemos observado anteriormente para MASP-3 (Skjoedt y col., 2009). La separación de las fracciones pico de ficolina-3 y MBL también se evaluó por la capacidad de activar el C4 agregado exógenamente en BSA acetilada (un ligando de ficolina-3) y manano (un ligando de MBL). La deposición de C4 en las dos superficies de activación diferentes ilustró claramente las diferentes fracciones pico que contienen complejos MBL o ficolina-3.

Los datos del análisis de densidad de gradiente de sacarosa también indicaron que la relación de superficie a masa es más alta para MBL que para ficolina-2 y ficolina-3, lo que respalda las observaciones de un estudio reciente que sugiere que MBL tiene una conformación muy abierta y abierta en la estructura cuaternaria (Jensenius y col., 2009). Sin embargo, la menor relación de superficie a masa de las ficolinas también podría reflejar la distribución molecular con moléculas asociadas como MAP-1, sMAP y los MASP. En este sentido, estar más asociado a MAP-1/sMAP/MASP daría como resultado una mayor masa y una mayor migración a través del gradiente de densidad.

En conclusión, se demostró que MAP-1 estaba presente en concentraciones séricas bajas en comparación con MASP-3 y que MAP-1 y circula en complejos predominantemente con las ficolinas pero también en cierta medida con MBL. Además, se pudo demostrar que ficolina-3 parece ser la principal molécula asociada a MAP-1 entre las moléculas de reconocimiento de LCP.

SEQ ID NO: 1. Las 380 secuencias de aminoácidos completas para FAP humana. (Se resaltan dos posibles sitios de glicosilación identificados en la posición de los aminoácidos 49 y 178).

MRWLLLYALCFSLSKASAHTVELNNMFGQIQSPGYPDSPDSEVTWNIITVDPGFRIKLYFMHFNLESSYLCEYDYVKV 80  
 ETEDQVLATFCGRETTDTEQTPGQEVVLSPGSFMSITFRSDFSNEERFTGFDAHYMAVDVDECKEREDEELSCDHYCHNY 160  
 IGGYICSCRFYILHTDNRNTRCRVECSNLFRTQRTGVITSPDFPNPYPKSSECLYTIIEEGFMVNLQFEDIFDIEDHPEV 240  
 PCPYDYIKIKVGPVKVLGPFCEKAPPEPISTQSHSVLILFHSNDSNGENRWRLSYRAAGNECPQLPPVHGKIEPSQAKYF 320  
 FKDQVLVSCDTGYKVLKDNVEMDTFQIECLKDGTWSNKIPTCKKNEIDLESELKSEQVTE

SEQ ID NO: 2. Las secuencias de nucleótidos de ADNc completas para FAP humana.

atgaggtggctgcttctctattatgctctgtgcttctccctgtcaaaggcttcagcccacaccgtggagctaaacaata  
 tgtttggccagatccagtcgcctggttatccagactcctatcccagtgattcagaggtgacttggaatatcactgtccc  
 agatgggtttcggatcaagctttacttcatgcacttcaacttggaatcctcctacctttgtgaatatgactatgtgaag  
 gtagaaactgaggaccaggtgctggcaaccttctgtggcaggagaccacagacacagagcagactcccggccaggagg  
 tggctcctctcccctggctccttcatgtccatcactttccggtcagatttctccaatgaggagcgtttcacaggcttga  
 tgcccactacatggctgtggatgtggacgagtgcaaggagaggagagcagaggagctgtcctgtgaccactactgccac  
 aactacattggcggctactactgctcctgcccgttccggtacatcctccacacagacaacaggacctgccgagtgagg  
 gcagtgacaacctcttcaactcaaaggactgggggtgatcaccagccctgacttccaaaccttaccceaaagagctctga  
 atgcctgtataccatcgagctggaggagggtttcatggtcaacctgcagtttgaggacatatattgacattgaggaccat  
 cctgaggtgcctgcccctatgactacatcaagatcaaagttgggtccaaaagttttggggcctttctgtggagagaaag  
 cccagaacctatcagcaccagagccacagtgctcctgatcctgttccatagtgacaactcgggagagaaccggggctg  
 gaggctctcatcagggctgcaggaatgagtgcccagagctacagcctcctgtccatgggaaaatcgagccctcccaa  
 gccaaagtatttcttcaaagaccaagtgtcgtcagctgtgacacaggctacaaagtgtgaaaggataatgtggagatgg  
 acacattccagattgagtgctgaaggatgggacgtggagtaacaagattcccacctgtaaaaaaatgaaatcgatct  
 ggagagcgaactcaagtcagagcaagtgacagagtga

SEQ NO: 3. Secuencia mínima de un polipéptido asociado a ficolina que comprende los dominios CUB1-EGF-

## ES 2 709 748 T3

CUB2 que incluye un péptido señal de los aminoácidos 1-19. La secuencia corresponde al exón 2 al exón 6.

MRWLLLYALCFSLKASAHTVELNNMFGQIQSPGYPDSYPSDSEVTWNITVPDGFRIKLYFMHFNLESSYLCEYDYVKV 80  
ETEDQVLATFCGRETTDTEQTPGQEVVLSPGSFMSITFRSDFSNEERFTGFDAHYMAVDVDECKEREDEELSCDHYCHNY 160  
IGGYCSCRFGYILHTDNRTCRCVECSNLFQRTGVITSPDFPNPYPKSSECLYTI EEEGFMVNLQFEDIFDIEDHPEV 240  
PCPYDYIKIKVGPVKVLPFCGKAPPEPISTQSHSVLILFHSDNSGENRGWRLSYRAA

SEQ ID NO: 4. 17 aminoácidos terminales únicos de FAP KNEIDLESELKSEQVTE  
SEQ ID NO: 5 Secuencia proteica de MASP-1 humana.

MRWLLLYALCFSLKASAHTVELNNMFGQIQSPGYPDSYPSDSEVTWNITVPDGFRIKLYFMHFNLESSYL  
CEYDYVKVETEDQVLATFCGRETTDTEQTPGQEVVLSPGSFMSITFRSDFSNEERFTGFDAHYMAVDVDEC  
KEREDEELSCDHYCHNYIGGYCSCRFGYILHTDNRTCRCVECSNLFQRTGVITSPDFPNPYPKSSECLYTI  
EEEGFMVNLQFEDIFDIEDHPEVPCPYDYIKIKVGPVKVLPFCGKAPPEPISTQSHSVLILFHSDNSGENRG  
WRLSYRAAGNECPQLQPPVHGKIEPSQAKYFFKDQVLVSCDTGYKVLKDNVEMDTFQIECLKDGTWSNKIP  
TCKIVDCRAPGELEHGLITFSTRNNTTYKSEIKYSCQEPYKMLNNNTGIYTCSAQGVWMNKVLRSLPTC  
LPVCGLPKFSRKL MARIFNGRPAQKGTTPWIAMLSHLNGQPFCCGSSLLGSSWIVTAAHCLHQSLDPEDPTLR  
DSDLLSPDFKII LGKHWRLRSDENEHLGVKHTTLHPQYDPNTFENDVALVELLESPVLNAFVMPICLPEGP  
QQEGAMVIVSGWGKQFLQRFPELMEIEIPIVDHSTCQKAYAPLKKKVTDRMICAGEKEGGKDACAGDSGG  
PMVTLNRERGGQWYLVGTVSWGDDCGKKDRYGVYSYIHHNKDWIQRVTGVRN

5

SEQ ID NO:6 Secuencia de ADNc de MASP-1 humana

GAAGTCAGCCACACAGGATAAAAGGAGGGAAGGGAAGGAGCAGATCTTTTCGGTAGGAAGACAGATTTTGT  
TGTCAGGTTTCTGGGAGTGAAGAGCAAGTCAAAGGAGAGAGAGAGGAGAGAGGAAAAGCCAGAGGGAGA  
GAGGGGGAGAGGGGATCTGTTGCAGGCAGGGGAAGGCGTGACCTGAATGGAGAATGCCAGCCAATCCAG  
AGACACACAGGGACCTCAGAACAAGATAAAGGCATCACGGACACCACACCGGGCAGGAGCTCACAGGCAA  
GTCAAGCTGGGAGGACCAAGGCCGGGCAGCCGGGAGCACCCAAGGCAGGAAAATGAGGTGGCTGCTTCTC  
TATTATGGCTCTGTGCTTCTCCCTGTCAAAGGCTTCAGCCACACCCGTGGAGCTAAACAATATGTTTGGCC  
AGATCCAGTCCCTGGTTATCCAGACTCCTATCCCAGTGATTTCAGAGGTGACTTGGAAATATCACTGTCCC  
AGATGGTTTTCGGATCAAGCTTTACTTCATGCACTTCAACTTGGAAATCCTCCTACCTTTGTGAATATGAC  
TATGTGAAGGTAGAACTGAGGACCAGGTGCTGGCAACCTTCTGTGGCAGGGAGACCACAGACACAGAGC  
AGACTCCCGGCCAGGAGGTGCTTCTCCCTGGCTCCTTCATGTCCATCACTTTCCGGTCAGATTTCTC  
CAATGAGGAGCGTTTCACAGGCTTTGATGCCACTACATGGCTGTGGATGTGGACGAGTGAAGGAGAGG  
GAGGACGAGGAGCTGTCTGTGACCACTACTGCCACAACATCATTTGGCGGCTACTACTGCTCCTGCCGCT  
TCGGCTACATCCTCCACACAGACAACAGGACCTGCCGAGTGGAGTGCAGTGACAACCTTTCACCTCAAAG  
GACTGGGGTGATCACCAGCCCTGACTTCCCAAACCTTACCCCAAGAGCTCTGAATGCCTGTATAACCATC  
GAGCTGGAGGAGGGTTTCATGGTCAACCTGCAGTTTGAGGACATAATTTGACATTTGAGGACCATCCTGGAG  
TGCCCTGGCCCTATGACTACATCAAGATCAAAGTTGGTCCAAAAGTTTTGGGGCTTTCTGTGGAGAGAA  
AGCCCCAGAACCATCAGCACCCAGAGCCACAGTGTCTGATCCTGTTCCATAGTGACAACCTCGGGAGAG  
AACCAGGGCTGGAGGCTCTCATACAGGGCTGCAGGAAATGAGTGCCAGAGCTACAGCCTCCTGTCCATG  
GGAAAATCGAGCCCTCCCAAGCCAAGTATTTCTTCAAAGACCAAGTGTCTCGTCAGCTGTGACACAGGCTA  
CAAAGTGTGAAGGATAAATGTGGAGATGGACACATTCAGATTGAGTGTCTGAAGGATGGGACGTGGAGT  
AACAAAGATTCCCACCTGTAAAATTGTAGACTGTAGAGCCCCAGGAGAGCTGGAAACAGGGGCTGATCACCT  
TCTCTACAAGGAACAACCTCACACATACAAGTCTGAGATCAAATACTCCTGTGAGGAGCCCTATTACAA  
GATGCTCAACAATAACACAGGTATATATACCTGTTCTGCCCAAGGAGTCTGGATGAATAAAGTATTGGGG  
AGAAGCCTACCACCTGCCCTCCAGTGTGTGGGCTCCCCAAGTTCCTCCCGAAGCTGATGGCCAGGATCT  
TCAATGGACGCCAGCCAGCCAGAAAAGGCACCCTCCCTGGATTGCCATGCTGTACACCTGAATGGGCAGCC  
CTTCTGCGGAGGCTCCCTTCTAGGCTCCAGCTGGATCGTGACCGCCGCACACTGCCTCCACCAGTCACTC  
GATCCGGAAGATCCGACCTACGTGATTTCAGACTTGCTCAGCCCTTCTGACTTCAAATCATCCTGGGCA  
AGCATTTGGAGGCTCCGGTTCAGATGAAAATGAACAGCATCTCGGCGTCAAACACACCCTCTCCACCCCA  
GTATGATCCCAACACATTCGAGAATGACGTGGCTCTGGTGGAGCTGTTGGAGAGCCAGTGTGAATGCC  
TTCTGTATGCCCATCTGTCTGCCTGAGGGACCCAGCAGGAAGGAGCCATGGTCATCGTCAGCCGCTGGG  
GGAAGCAGTTCTTGCAAAGGTTCCAGAGACCCTGATGGAGATTGAAAATCCCGATTGTTGACCACAGCAC  
CTGCCAGAAGGCTTATGCCCCGCTGAAGAAGAAAGTGACCAGGGACATGATCTGTGCTGGGGAGAAAGGAA  
GGGGAAAAGGACGCTGTGCGGGTGAATCTGGAGGCCCATGGTGACCCTGAATAGAGAAAAGAGGCCAGT  
GGTACCTGGTGGGCACTGTGCTGGGGTGTGACTGTGGGAAGAAGGACCCTACGGAGTATATACTCTTA  
CACTCCACACAACAAGGACTGGATCCAGAGGGTCAACCGGAGTGGGAAGTGAATTTGGCTCCTCAGCCCC  
AGCACCACAGCTGTGGGCAGTCAAGTACAGAGGACGATCCTCCGATGAAAGCAGCCATTTCTCCTTTCC  
TTCTCCCATCCCCCTCCTTCGGCTATCCATTAAGTGGCAATAGAGCAGGTATCTTCAACCCCTTTTC

ACTCTCTTTAAAGAGATGGAGCAAGAGAGTGGTCCAGAACACAGGCCGAATCCAGGCTCTATCACTTACTA  
GTTTGCAGTGTGGCAGGTGACTTCATCTCTTGAACCTTCAGTTTCTTTCATAAGATGGAAATGCTATAC  
CTTACCTACCTCGTAAAAGTCTGATGAGGAAAAGATTAACATAAGATGCATAGCACTTAACAGAGTGCA  
TAGCATACTACTGTTTTCAATAAATGCACCTTAGCAGAAGGTGATGTGTCTACCAGGCAGACGAAGCTCT  
CTTACAAAACCCCTGCCTGGGTCTTAGCATTGATCAGTGACACACCTTCCCTCAACCTTGACCATCTCC  
ATCTGCCCTTAAATGCTGTATGCTTTTTTGCCACCGTGCAACTTGCCCAACATCAATCTTACCCCTCATC  
CCTAAAAGTAAAACAGACAAGGTTCTGAGTCTGTGGTATGTCCCCTAGCAAATGTAAC TAGGAACAT  
GCATAGATGACAGATTGCGGGAGGGCTTGAGAGAAGCAGGGACAGGAGGGAGCCTGGGGATTGTGGTTT  
GGGAAGGCAGACACCTGGTCTAGAAGTAGCTCTGCCCTTAGCCCTGTATGACCCTATGCAAGTCTCTC  
CTCCCTCATCTCAAAGGGTCTCAAAGCTCTGACGATCTAAGATACAATGAAGCCATTTTCCCTGATA  
AGATGAGGTTAAAGCCAATGTAAACAAAAGGCAAAAATTACAATCGGTTCAAAGGAACTTTGATGCAGACA  
AAATGCTGCTGCTGCTCCTGAAATACCCACCCCTTTCCACTACGGGTGGGTTCCCAAGGACATGGGA  
CAGGCAAAGTGTGAGCCAAAGGATCCTTCTTATTCTTAAGCAGAGCATCTGCTCTGGGCCCTGGCCTCC  
TTCCCTTTTGGGAAACTGGGCTGCATGAGGTGGGCCCTGGTAGTTTGTACCCAGGCCCTTATACTCTT  
CCTTCTATGTCCACAGCTGACCCCAAGCAGCCGTTCCCGACTCCTCACCCCTGAGCCTCACCTGAAAC  
TCCCTCATCTGCAAGGCCATAAGTGTTTTCCAAGCAAAAATGCCTCTCCATCCTCTCTCAGGAAGCTTC  
TAGAGACTTTATGCCCTCCAGAGCTCCAAGATATAAGCCCTCCAAGGGATCAGAAGCTCCAAGTCTCTGT  
CTTCTGTTTTATAGAAATTGATCTTCCCTGGGGACTTTAACTCTTGACCTGTATGCAGCTGTGGAGTA  
ATTCCAGGTCTCTTGAATAAAGAGGAAGATAATGGAGAATGAGAACATATATATATATATATATTAAGCC  
CCAGGCTGAATACTCAGGGACAGCAATTCACAGCTGCCCTGTGTTCTATAAACAAGTCACTTCTACCTCT  
TTGTGCCCTGCTGTTTTATTCTGTAAGGGGAAGGTGGCAATGGGACCCAGCTCCATCAGACACTTGTCAAG  
CTAGCAGAACTCCATTTTCAATGCCAAAGAAGAACTGTAATGCTGTTTTGGAAATCATCCCAAGGCATCC  
CAAGACACCATATCTTCCATTTCAAGCACTGCCTGGGCACACCCCAACATCCAGGCTGTGGTGGCTCC  
TGTGGGAACCTAGATGAAGAGAGTATCATTTATACCTTCTAGGAGCTCCTATTGGGAGACATGAAAC  
ATATGTAATTGACTACCATGTAATAGAACAACCCCTGCCAAGTGTCTGTTTTGAAAAGTCAATGGAGGTA  
AGAAAGACCATTTC

## ES 2 709 748 T3

### SEQ ID NO:7 Secuencia proteica de MASP-3 humana.

MRWLLLYALCFSLSKASAHTVELNNMFGQIQSPGYPDSYPSDSEVTWNITVPDGFRIKLYFMHFNLESSYLCEYDYVKVETEDQ  
VLATFCGRETDTTEQTPGQEVVLSPGSEFMSITFRSDFSNEERFTGFDHAHYMAVDVDECKEREDEELSCDHYCHNYIGGYCSCRF  
GYILHTDNRTCRVECSDNLFTQRTGVITSPDFPNPYPKSSECLYTIIELEEGFMVNLQFEDIFDIEDHPEVPCPYDIKIKVGPVKV  
LGFPCGEKAPEPISTQSHSVLILFHSDNSGENRWRLSYRAAGNECPELQPPVHGKIEPSQAKYFFKDQVLVSCDTGYKVLKDNV  
EMDTFQIECLKDGTSNKIPTCKIIVDCRAPGELEHGLITFSTRNNLTYYKSEIKYSCQEPYKMLNNNTGIYTCSAQGVMNKNVL  
GRSLPTCLPECGQPSRSLPSLVKRIIGGRNAEPLFPWQALIVVEDTSRVPNDKWFSGGALLSASWILTAHVLRQRDRTTVIP  
VSKEHVTVYVGLHVDVRDKSGAVNSSAARVVLHPDFNIQNYNHDIALVQLQEPVPLGPHVMPVCLPRLEPEGPAPHMLGLVAGWGI  
SNPNVTVDEIISGTRTSLSDVLQYVKLPVVPHAECTSYESRSGNYSVTENMFCAGYIEGGKDTCLGDSGGAFVIFDDLQRWVV  
QGLVSWGGEPEGCKSQVYGVYTKVSNYVDWVWEQMGLPQSVVEPQVER

### SEQ ID NO:8 Secuencia de ADNc de MASP-3 humana

GAAGTCAGCCACACAGGATAAAAGGAGGGAAGGGAAGGAGCAGATCTTTTCGGTAGGAAGACAGATTTTGT  
TGTCAGGTTCTGGGAGTGCAAGAGCAAGTCAAAGGAGAGAGAGAGAGAGAGGAAAAGCCAGAGGGAGA  
GAGGGGGAGAGGGGATCTGTTGCAGGCAGGGGAAGGCGTGACCTGAATGGAGAATGCCAGCCAATTCCAG  
AGACACACAGGGACCTCAGAACAAGATAAGGCATCACGGACACCACACCGGGCACGAGCTCACAGGCAA  
GTCAAGCTGGGAGGACCAAGGCCGGGCAGCCGGGAGCACCCAAGGCAGGAAAATGAGGTGGCTGCTTCTC  
TATTATGCTCTGTGCTTCTCCCTGTCAAAGGCTTCAGCCACACCGTGGAGCTAAACAATATGTTTGGCC  
AGATCCAGTCGCCTGGTTATCCAGACTCCTATCCAGTGATTCAGAGGTGACTTGGAATATCACTGTCCC  
AGATGGGTTTCGGATCAAGCTTTACTTCACTTCAACTTGGAATCCTCCTACCTTTGTGAATATGAC  
TATGTGAAGGTAGAACTGAGGACCAGGTGCTGGCAACCTTCTGTGGCAGGGAGACCACAGACACAGAGC  
AGACTCCCGCCAGGAGGTGGTCCTCTCCCTGGCTCCTTCATGTCCATCACTTTCCGGTCAGATTTCTC  
CAATGAGGAGCGTTTACAGGCTTTGATGCCCACTACATGGCTGTGGATGTGGACGAGTGCAAGGAGAGG

GAGGACGAGGAGCTGTCTGTGACCACTACTGCCACAACACTACATTGGCGGCTACTACTGCTCCTGCCGCT  
 TCGGCTACATCCTCCACACAGACAACAGGACCTGCCGAGTGGAGTGCAGTGACAACCTCTTACTCAAAG  
 GACTGGGGTGATCACCAGCCCTGACTTCCCAAACCTTACCCCAAGAGCTCTGAATGCCTGTATACCATC  
 GAGCTGGAGGAGGGTTTCATGGTCAACCTGCAGTTTGGAGACATATTTGACATTGAGGACCATCCTGAGG  
 TGCCCTGCCCTATGACTACATCAAGATCAAAGTTGGTCCAAAAGTTTTGGGGCCTTTCTGTGGAGAGAA  
 AGCCCCAGAACCATCAGCACCCAGAGCCACAGTGTCTGATCCTGTTCCATAGTGACAACCTCGGGGAGAG  
 AACCGGGGCTGGAGGCTCTCATAACAGGGCTGCAGGAAATGAGTGCAGGAGCTACAGCCTCCTGTCCATG  
 GAAAAATCGAGCCCTCCCAAGCCAAGTATTTCTTCAAAGACCAAGTGCCTCGTCAGCTGTGACACAGGCTA  
 CAAAGTGTGAAGGATAATGTGGAGATGGACACATTCAGATTGAGTGTCTGAAGGATGGGACGTGGAGT  
 AACAGATTCCACCTGTAAAATTGTAGACTGTAGAGCCCCAGGAGAGCTGGAAACACGGGCTGATCACCT  
 TCTCTACAAGGAACAACCTCACACATAACAAGTCTGAGATCAAATACTCCTGTGAGGAGCCCTATTACAA  
 GATGCTCAACAATAACACAGGTATATATACCTGTTCTGCCAAGGAGTCTGGATGAATAAAGTATTGGGG  
 AGAAGCCTACCCACCTGCCCTCCAGAGTGTGGTACAGCCCTCCCGCTCCCTGCCAAGCCTGGTCAAGAGGA  
 TCATTGGGGGCCGAAATGCTGAGCCTGGCCTCTTCCCGTGGCAGGCCCCGATAGTGGTGGAGGACACTTC  
 GAGATGCCAAATGACAAGTGGTTTGGGAGTGGGGCCCTGCTCTCTGCGTCTGGATCCTCACAGCAGCTA  
 CATGTGCTGCGCTCCAGCGTAGAGACACCACGGTGATACAGTCTCCAAGGAGCATGTCCCGTCTACC  
 TGGGCTTGCATGATGTGCGAGACAAATCGGGGCGAGTCAACAGCTCAGCTGCCCGAGTGGTGTCCACCC  
 AGACTTCAACATCCAAAACATAACACGATATAGCTCTGGTGCAGCTGCAGGAGCCTGTGCCCTGGGA  
 CCCCACGTATGCCTGTCTGCCTGCCAAGGCTTGAGCCTGAAGGCCCGGCCCCACATGTGGGCCTGG  
 TGGCCGGCTGGGGCATCTCCAATCCCAATGTGACAGTGGATGAGATCATCAGCAGTGGCACACGGACCTT  
 GTCAGATGCTCTGCAGTATGTCAAGTTACCCGTGGTGCCTCACGCTGAGTGCAAAACTAGCTATGAGTCC  
 CGCTCGGGCAATTACAGCGTACAGGAGAACATGTTCTGTGCTGGCTACTACGAGGGCGGCAAGACACGT  
 GCCTTGGAGATAGCGGTGGGGCCTTTGTCTCTTTGATGACTTGAGCCAGCGCTGGGTGGTCAAGGCCCT  
 GGTGTCTGGGGGGACCTGAAGAATGCGGCAGCAAGCAGGTCTATGGAGTCTACACAAAGGTCTCCAAT  
 TACGTGGACTGGGTGTGGGAGCAGATGGCCTTACCACAAAGTGTGTGGAGCCCCAGGTGGAACGGTGTG  
 CTGACTTACTTCCCTCGGGGCTGCCTCCCTGAGCGAAGCTACACCGCACTTCCGACAGCACACTCCACA  
 TTACTTATCAGACCATATGGAATGGAACACACTGACCTAGCCGTGGCTTCTCCTACCGAGACAGCCCCCA  
 GGACCTGAGAGGCAGAGTGTGGTATAGGAAAAGGCTCCAGGCAGGAGACCTGTGTTCTGAGCTTGTCT  
 CAAGTCTCTTCCCTGTCTGGGCCTCACTCTACCGAGTAATACAATGCAGGAGCTCAACCAAGGCCTCTG  
 TGCCAATCCCAGCACTCCTTTCCAGGCCATGCTTCTTACCCAGTGGCCTTTATTCACTCCTGACCACTT  
 ATCAAACCCATCGGTCTACTGTTGGTATAACTGAGCTTGGACCTGACTATTAGAAAATGGTTTCTAACA  
 TTGAACGAATGCCGCATCTGTATATTTTCTGCTCTGCCTTCTGGGACTAGCCTTGGCCTAATCCTTCC  
 TCTAGGAGAAGAGCATTTCAGGTTTTGGGAGATGGCTCATAGCCAAGCCCCCTCTCTTGTGTGATCCCT  
 TGGAGCACCTTCAATGCCCTGGGGTTTCTCTCCAAAAGCTTCTTGCAGTCTAAGCCTTATCCCTATGTTT  
 CGCATTAAAGTAATTTCAAAGACATGGAGAAAAGTTGGGAAAGTTTGTGCTGACTGTGGAGCAGTAATA  
 GCCGTGGGAGGCCACCAAGCCCTTAAATTTCCATTGTCAACTCAGAACACATTTGGGCCCATATGCCAC  
 CCTGGAACACCAGCTGACACCATGGGCGTCCACACCTGTGCTCCAGACAAGCACAAAGCAATCTTTTTCAG  
 CCTTGAATGTATTATCTGAAAGGCTACCTGAAGCCAGGCCGAATATGGGGACTTAGTCGATTACCTG  
 GAAAAAGAAAAGACCCACACTGTGTCTGCTGTGCTTTTGGGCAGGAAAATGGAAGAAAAGTGGGGTGG  
 GCACATTAGAAGTCACCCAAATCCTGCCAGGCTGCCTGGCATCCCTGGGGCATGAGCTGGGCGGAGAATC  
 CACCCCGCAGGATGTTTCAAGGGACCACTCCTTCAATTTTTCAGAGTCAAAGGAATCAGAGGCTCACCCA  
 TGGCAGGCAGTGAAAAGAGCCAGGAGTCTGGGTTCTAGTCCCTGCTCTGCCCAACTGGCTGTATAAC  
 CTTTGAATAATCATTCTTTTGTCTGAGTCTCTGGTTCTCCGTGAGCAACAGGCTGGCATAAGGTCCCTT  
 GCAGGTTCTTCTAGCTGGAGCACTCAGAGCTTCCCTGACTGCTAGCAGCCTCTCTGGCCCTCACAGGGC  
 TGATTGTTCTCCTTCTCCCTGGAGCTCTCTCTGAAAATCTCCATCAGAGCAAGGCAGCCAGAGAAGC  
 CCCTGAGAGGGAATGATTGGGAAGTGTCCACTTTCTCAACCGGCTCATCAACACACTCCTTTGTCTATG  
 AATGGCACATGTAATGATGTTATATTTTGTATCTTTTATATCATATGCTTACCATTCTGTAAGGGCC  
 TCTGCATTGTTGCTCCCATCAGGGGTCTCAAGTGGAAATAAACCCCTCGTGGATAACCAAAAAAAAAAAAA  
 AAAAAA

SEQ ID NO:9 Secuencia proteica de MASP-2 humana

MRLTLGLLLCGSVATPLGPKWPEPVFGRSLASPGFPGEYANDQERRWLTAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCE  
 YDFVKLSSGAKVLATLCGQESTDTERAPGKDTFYSLSGLDITFRSDYSNEKPFTEAFYAAEDIDECQVAP  
 GEAPTCDDHHCHNHLGGFYCSCRAGYVLRNKRKCSALCSGQVFTQRSGELSSPEYPRYPKLSSTYSISLE  
 EGFVILDFVESFDVETHPETLCPYDFLKIQTDRRHGPFCKLPHRIETKSNVTITFVTDESGDHTGWKI  
 HYTSTAQPCPYMAPPNGHVSVPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQGHLPKLSFTAVCQKDGSDWRPMPACSI  
 VDCGPPDDLPSGRVEYITGPGVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNNDGKYVCEADGFWTSSKGEKSLPVCPEVC

GLSARTTGGRIYGGQKAKPGDFPWQVLILGGTTAAGALLYDNWVLTAAHAVYEQKHDAASALDIRMGTLLKRL  
 SPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNKVVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTAGSWGTLTQ  
 RGFLARNLMYVDIPIVDHQKCTAAYEKPPYPRGSVTANMLCAGLESGBKDSCRGDSSGALVFLDSETERWF  
 VGGIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINIYIPWIENIISDF

5 SEQ ID NO:10 Secuencia de ADNc de MASP-2 humana

GGCCAGCTGGACGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGCCTTCTGTGTGGCTCGGTGGCCACCC
CCTTGGGCCCGAAGTGGCCTGAACCTGTGTTTCGGGGCGCCTGGCATCCCCCGGCTTTCAGGGGAGTATGC
CAATGACCAGGAGCGGGCTGGACCCCTGACTGCACCCCCCGGCTACCGCCTGCGCCTCTACTTCACCCAC
TTCGACCTGGAGCTCTCCACCTCTGCGAGTACGACTTCGTCAAGCTGAGCTCGGGGGCCAAGGTGCTGG
CCACGCTGTGCGGGCAGGAGAGCACAGACACGGAGCGGGCCCCCTGGCAAGGACACTTCTACTCGCTGGG
CTCCAGCCTGGACATTACCTTCCGCTCCGACTACTCCAACGAGAAGCCGTTACGGGGTTCGAGGCCTTC
TATGCAGCCGAGGACATTGACGAGTGCCAGGTGGCCCCGGGAGAGGGCGCCACCTGCGACCACCACTGCC
ACAACCACCTGGGGCGGTTTCTACTGCTCCTGCCGCGCAGGCTACGTCTGCACCGTAAACAAGCGCACCTG
CTCAGCCCTGTGCTCCGGCCAGGTCTTACCCAGAGGCTGTTGGGGAGCTCAGCAGCCCTGAATACCCACGG
CCGTATCCCAAACCTCTCCAGTTGCACCTTACAGCATCAGCCTGGAGGAGGGGTTTCAGTGTCAATTCGGACT
TTGTGGAGTCCCTTCGATGTGGAGACACACCTGAAAACCTGTGTCCCTACGACTTCTCAAGATTCAAAC
AGACAGAGAAGAACATGGCCCATTTCTGTGGGAAGACATTGCCCCACAGGATTGAAAACAAAAAGCAACAG
GTGACCATCACCTTTGTACAGATGAATCAGGAGACCACACAGGCTGGAAGATCCACTACACGAGCACAG
CGCAGCCTTGCCTTATCCGATGGCGCCACCTAATGGCCACGTTTACCTGTGCAAGCCAAATACATCCT
GAAAGACAGCTTCTCCATCTTTTTCGAGACTGGCTATGAGCTTCTGCAAGGTCATTCGCCCTGAAATCC
TTTACTGCAGTTTGTTCAGAAAGATGGATCTTGGGACCGCCAATGCCCGCGTGCAGCATTGTTGACTGTG
GCCCTCCTGATGATCTACCCAGTGGCCGAGTGGAGTACATCACAGGTCCTGGAGTGACCACCTACAAAGC
TGTGATTTCAGTACAGCTGTGAAGAGACCTTCTACACAATGAAAGTGAATGATGGTAAATATGTGTGTGAG
CCTGATGGATTCTGGACGAGCTCCAAAGGAGAAAAATCACTCCCAGTCTGTGAGCCTGTTTGTGGACTAT
GAGCCCGCACAAACAGGAGGGCGTATATATGGAGGGCAAAAAGGCCAAAACCTGGTGAATTTTCTTGGCAAGT
CCTGATATTAGGTGGAACCACAGCAGCAGGTGCACCTTTTATATGACAACGGGTCCTAACAGCTGCTCAT
GCCGTCTATGAGCAAAAAACATGATGCATCCGCCCTGGACATTCGAATGGGCACCCCTGAAAAGACTATCAC
CTCATTATACACAAGCCTGGTCTGAAGCTGTTTTTATACATGAAGGTTATACTCATGATGCTGGCTTTGA
CAATGACATAGCACTGATTAATTAATGAATAACAAAGTTGTAATCAATAGCAACATCACGCCTATTTGTCTG
CCAAGAAAAGAAGCTGAATCCTTTATGAGGACAGATGACATTGGAAGTGCATCTGGATGGGGATTAACCC
AAAGGGGTTTTCTTGGCTAGAAATCTAATGTATGTGACATACCGATTGTTGACCATCAAAAAATGTACTGC
TGCATATGAAAAGCCACCCTATCCAAGGGGAAGTGTAACTGCTAACATGCTTTGTGCTGGCTTAGAAAAGT
GGGGGCAAGGACAGCTGCAGAGGTGACAGCGGAGGGGCACCTGGTGTTCCTAGATAGTAAAACAGAGAGGT
GGTTTGTGGGAGGAATAGTGTCTGGGGTTCCATGAATGTGGGGAAGCAGGTGATGGAGTGTACAC
AAAAGTTATTAACATATATTCCCTGGATCGAGAACAATAATTAGTGATTTTTAACTTGGCTGTCTGCAGTCA
AGGATTTCTCATTTTTAGAAATGCCTGTGAAGACCTTGGCAGCGACGTGGCTCGAGAAGCATTATCATT
ACTGTGGACATGGCAGTTGTTGCTCCACCCAAAAAACAGACTCCAGGTGAGGCTGTGTCAATTTCTCCA
CTTGCCAGTTTAATTCAGCCTTACCCATTGACTCAAGGGGACATAAACCACGAGAGTGACAGTCATCTT
TGCCACCCAGTGAATGTCACTGCTCAAAATACATTTTCAATTACCTTAAAAAGCCAGTCTCTTTTCATAC
TGGCTGTGGCATTCTGTAAACTGCCTGTCCATGCTCTTTGTTTTTAACTTGTCTTATTGAAAAAAA
AAAAAAA

SEQ ID NO:11 Secuencia proteica de sMAP (MAP19) humana

MRLLLGLLLCGSVATPLGPKWPEPVFGRLLASPGFPGEYANDQERRWTLAPPGYRLRLRYFTHFDLELSHL
CEYDFVKLSSGAKVLATLCGQESTDTERAPGKDTFYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGFEEFYAAEDIDEC
QVAPGEAPTCDHHCHNHLGGFYCSRAGYVLRNKRKTCSEQSL

SEQ ID NO: 12 secuencia de ADNc de sMAP (MAP19) humana

GGCCAGCTGGACGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGCCTTCTGTGTGGCTCGGTGGCCACCC
CCTTGGGCCCGAAGTGGCCTGAACCTGTGTTTCGGGGCGCCTGGCATCCCCCGGCTTTCAGGGGAGTATGC
CAATGACCAGGAGCGGGCTGGACCCCTGACTGCACCCCCCGGCTACCGCCTGCGCCTCTACTTCACCCAC
TTCGACCTGGAGCTCTCCACCTCTGCGAGTACGACTTCGTCAAGCTGAGCTCGGGGGCCAAGGTGCTGG
CCACGCTGTGCGGGCAGGAGAGCACAGACACGGAGCGGGCCCCCTGGCAAGGACACTTCTACTCGCTGGG
CTCCAGCTGGACATTACCTTCCGCTCCGACTACTCCAACGAGAAGCCGTTACGGGGTTCGAGGCCTTTC
TATGCAGCCGAGGACATTGACGAGTGCCAGGTGGCCCCGGGAGAGGGCGCCACCTGCGACCACCACTGCC
ACAACCACCTGGGGCGGTTTCTACTGCTCCTGCCGCGCAGGCTACGTCTGCACCGTAAACAAGCGCACCTG
CTCAGAGCAGAGCCTCTAGCCTCCCCTGGAGCTCCGGCCTGCCAGCAGGTGAGAAGCCAGAGCCAGCCT
GCTGGCCTCAGCTCCGGGTTGGGCTGAGATGGCTGTGCCCAACTCCCATTACCCACCATGGACCCAAT
AATAAACCCTGGCCCCACCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

5

Cebadores de ADN:

- SEQ ID NO:13: 5'-gcacccagagccacagtg-3'
- SEQ ID NO:14: 5'-gcctccagtggtggc-3'
- SEQ ID NO:15: 5-gcctccagtggtca-3'

SEQ ID NO:16: 5'-cgatctggagagcgaactc-3'  
SEQ ID NO:17: 5'-ctgttcttcacactggctg-3'  
SEQ ID NO:18: 5'-ctgctgagatcatgtgttc-3'  
SEQ ID NO:19: 5'-TTATACGACTCACTA-3'

5



**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido aislado asociado a ficolina que tiene en su extremo C-terminal la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos 20-380 de la SEQ ID NO: 1, o una variante funcional de la misma que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 1.
- 5 2. El polipéptido aislado asociado a ficolina de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene al menos un 80 %, tal como un 90 %, tal como 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1.
3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho polipéptido es capaz de asociarse con una cualquiera de lectina de unión a manosa (MBL), ficolina-1, ficolina-2, ficolina-3, C1q, proteínas surfactantes de pulmón SP-A y/o SP-D, y moléculas de defensa de tipo colágeno intracelular, tal como CL-L1.
- 10 4. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho polipéptido es una proteína recombinante.
5. Un polipéptido aislado asociado a ficolina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos 20-380 de la SEQ ID NO: 1, o una variante funcional de la misma que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 1.
- 15 6. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho polipéptido carece de un péptido señal.
7. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 20 9. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 8.
10. Una célula huésped que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 9.
11. Un procedimiento de producción del polipéptido, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, comprendiendo el procedimiento cultivar una célula de acuerdo con la reivindicación 10, en un medio de crecimiento apropiado en condiciones que permitan la expresión de la construcción de polinucleótido y recuperar el polipéptido resultante del medio de cultivo.
- 25 12. Una composición que comprende el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
13. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 30 14. Un procedimiento de detección de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, comprendiendo dicho procedimiento:
  - a) obtener una muestra biológica;
  - b) poner en contacto dicha muestra biológica con un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7; y
  - c) detectar complejos de dicho anticuerpo y dicho polipéptido, si los hay;como indicación de la presencia del polipéptido en dicha muestra.
- 35 15. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso como un medicamento.

Figura 1

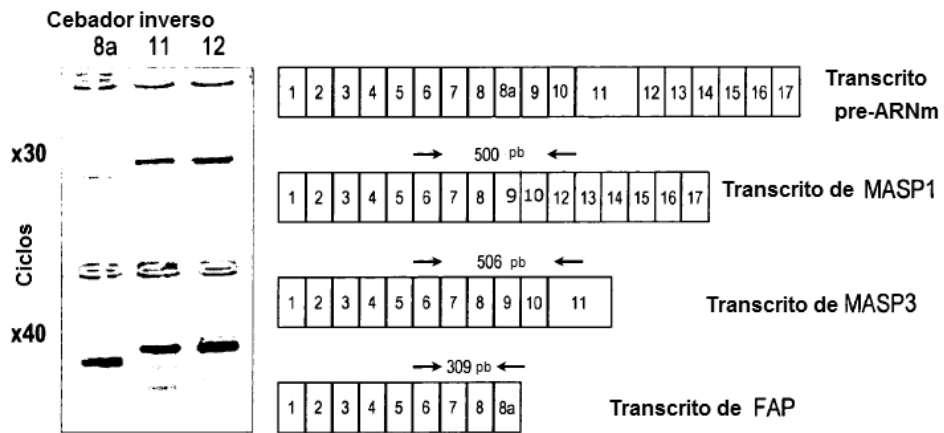


Figura 2

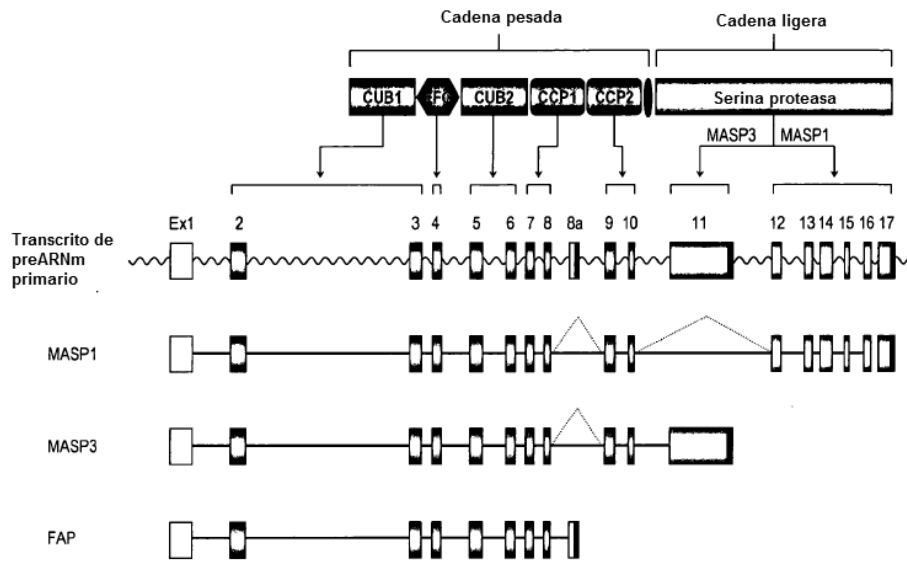


Figura 3

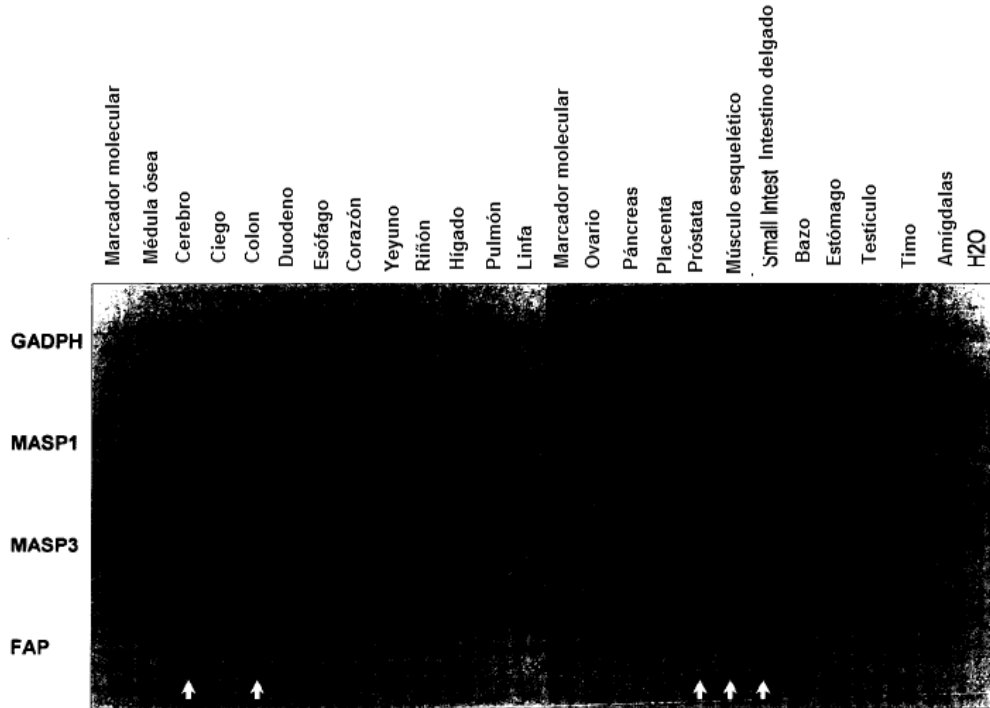


Figura 4

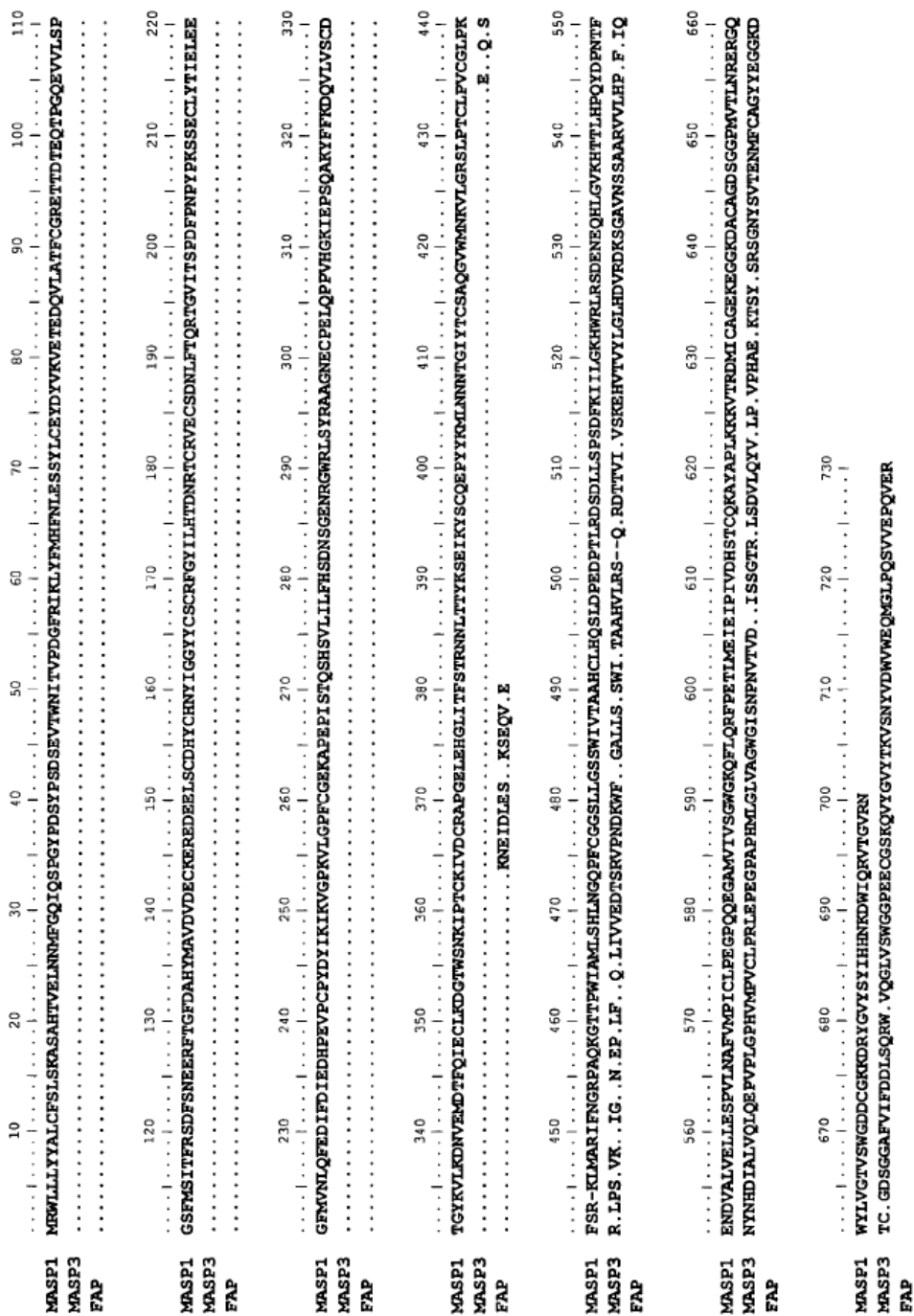




Figura 6

Efecto de rHuMAP-1 sobre la reconstitución en C' de suero defectivo en  $-/MBL$  con rHuMBL

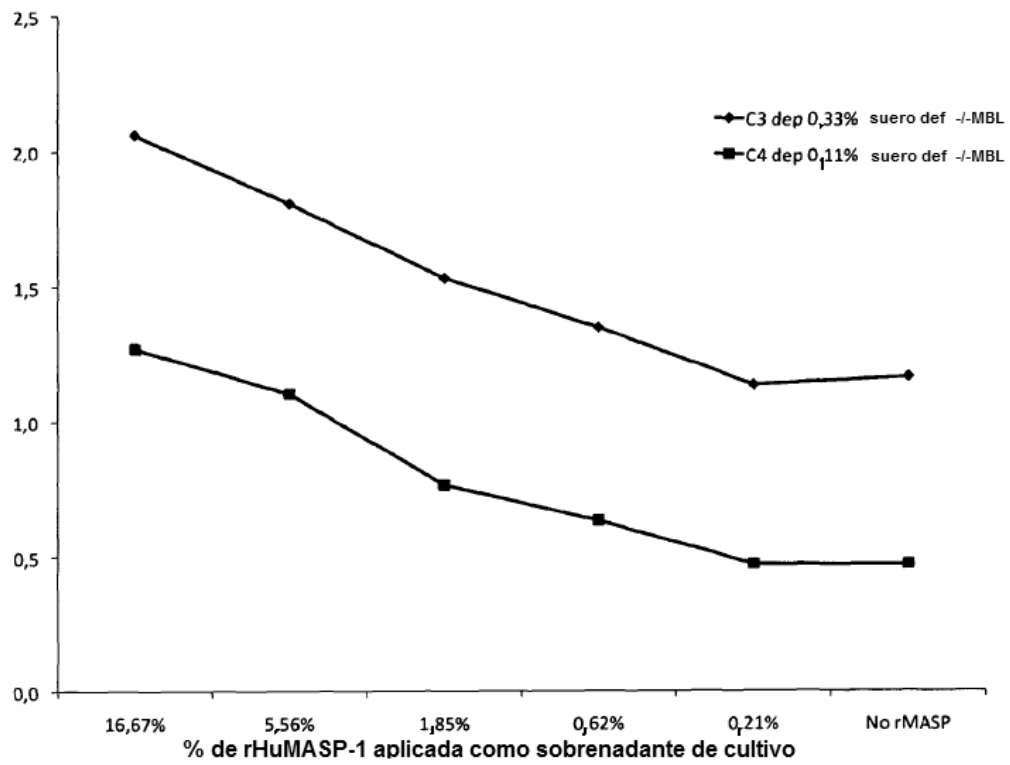


Figura 7

Efecto de rHuMASP-2 sobre la reconstitución en C' de suero defectivo en -/MBL con rHuMBL

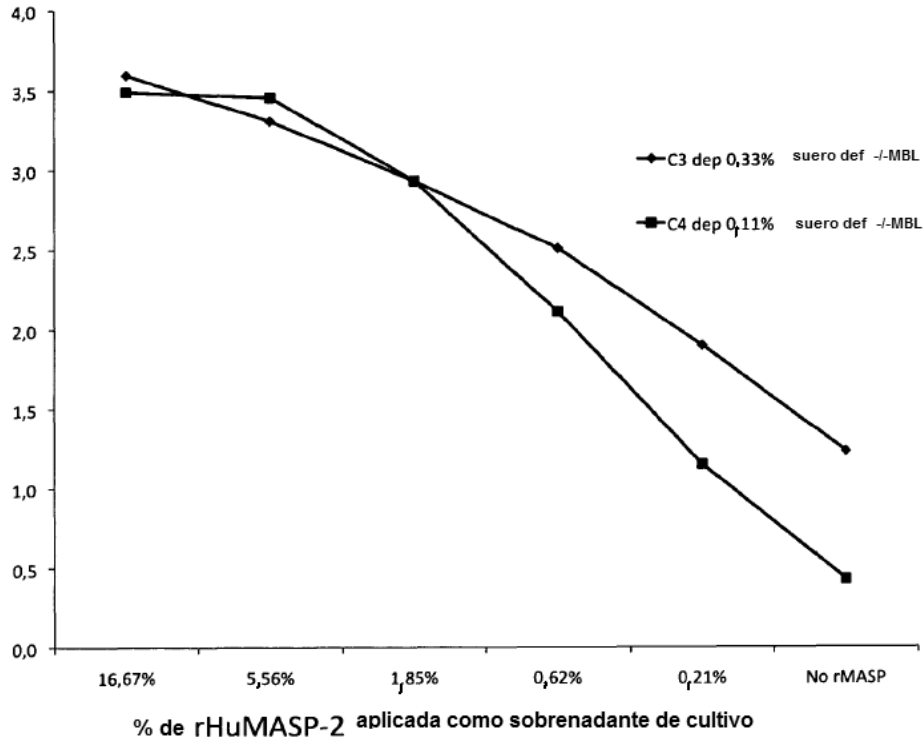




Figura 8

Efecto de rHuMASP-3 sobre la reconstitución en C' de suero defectivo en *-/MBL* con rHuMBL

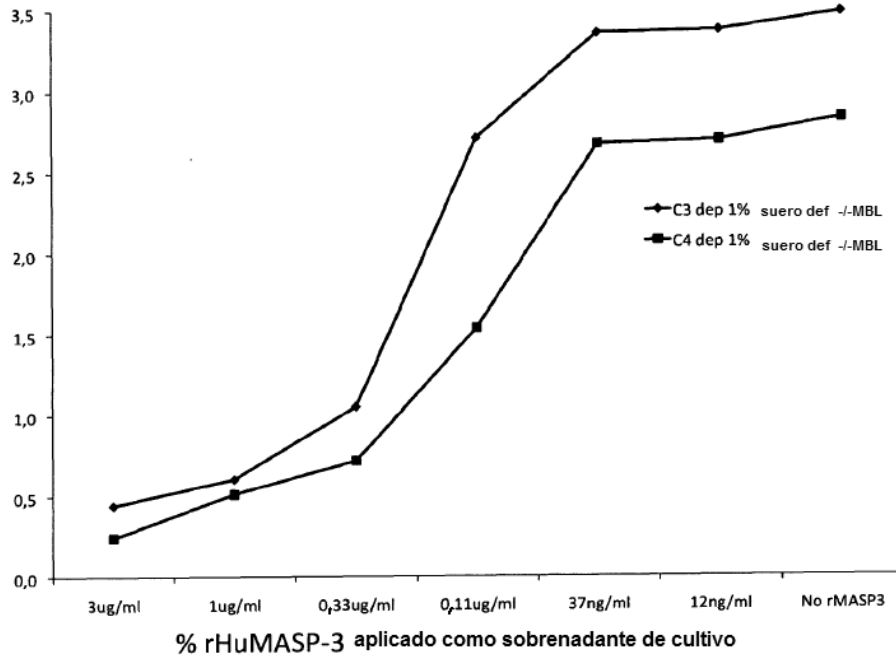


Figura 9

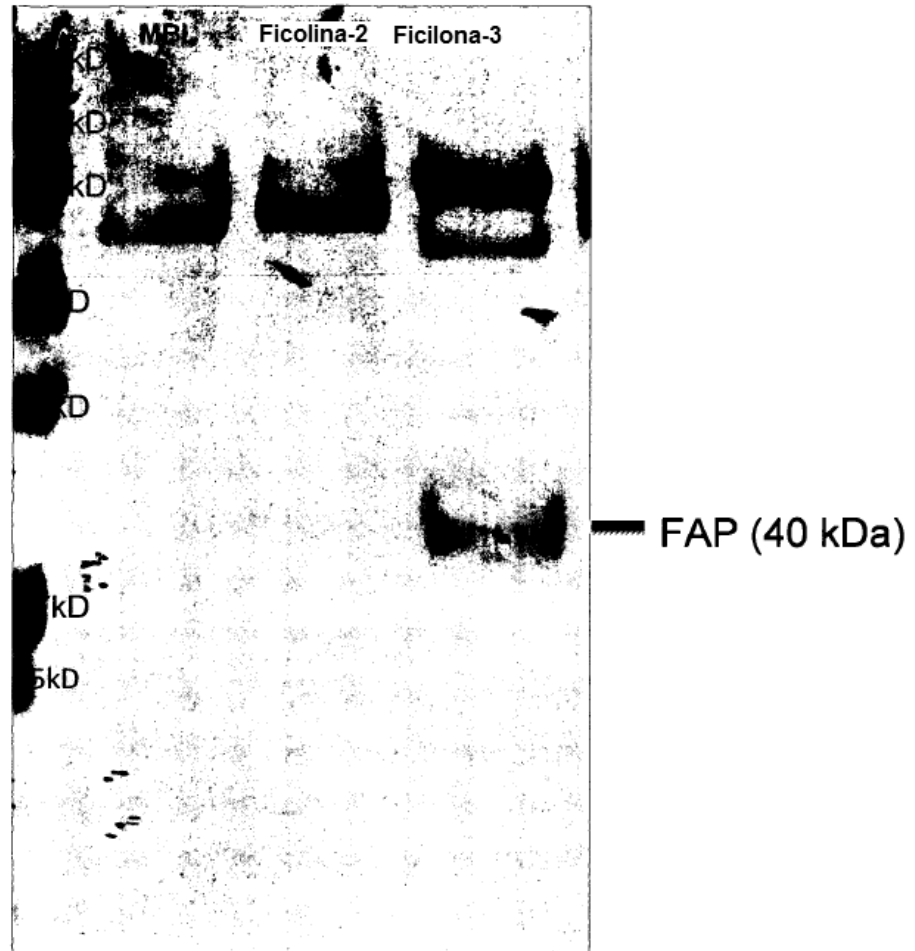


Figura 10

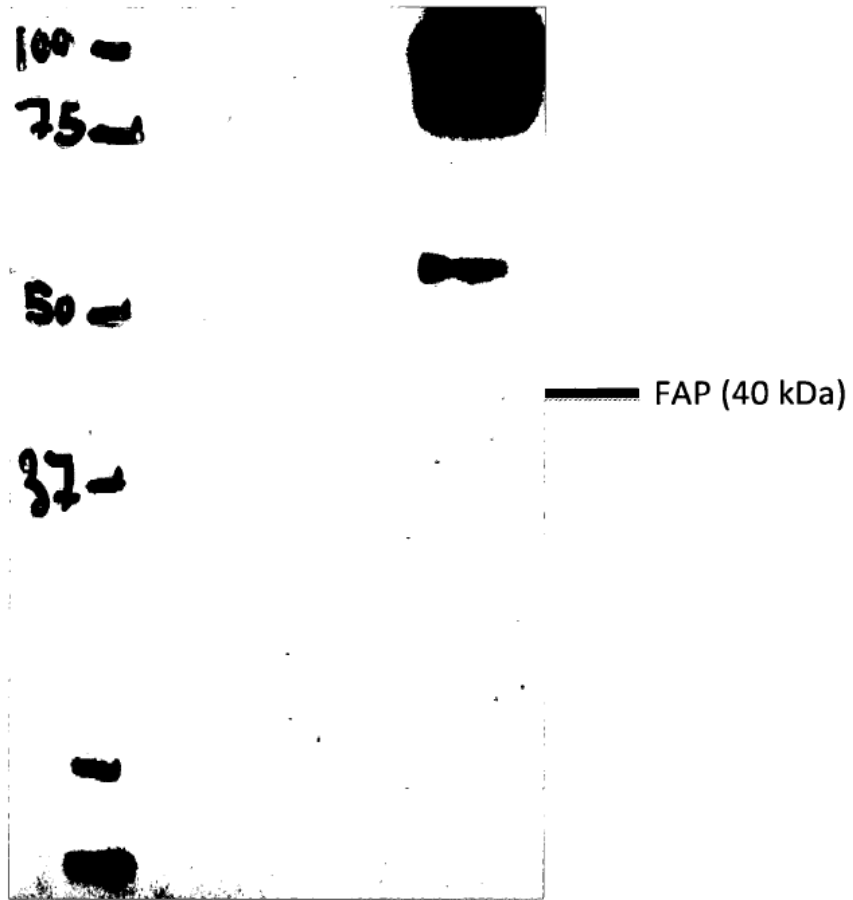


Figura 11

ligando inmovilizado	analito soluble	$K_{on}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$K_{off}$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (nM)
rFicolina-2	MASP-1	$8,9 \times 10^4$	$4,4 \times 10^{-4}$	5,0
rFicolina-2	MASP-3	$1,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^{-4}$	2,9

Figura 12

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100     110     120
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GULF  E T E N M E L K N K V Q D L E N Q L R I T O V S A P P A G S M T P K S P S T D I F D M I P F S P I S H Q S S M P T R N C T Q P P V P S R S T E I K R D L F G A E P F D P N C G A A D F P P D I Q S K L D E M Q V T I L I D W P I N D I F H F
FAP   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      . . . . . E I . . . . . S E . . . . . K S E . . . . . T E . . . . .

```

```

      130      140
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GULF  D M G Q R E C Y P K L W F P S I F A I K T R L K
FAP   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

Figura 13

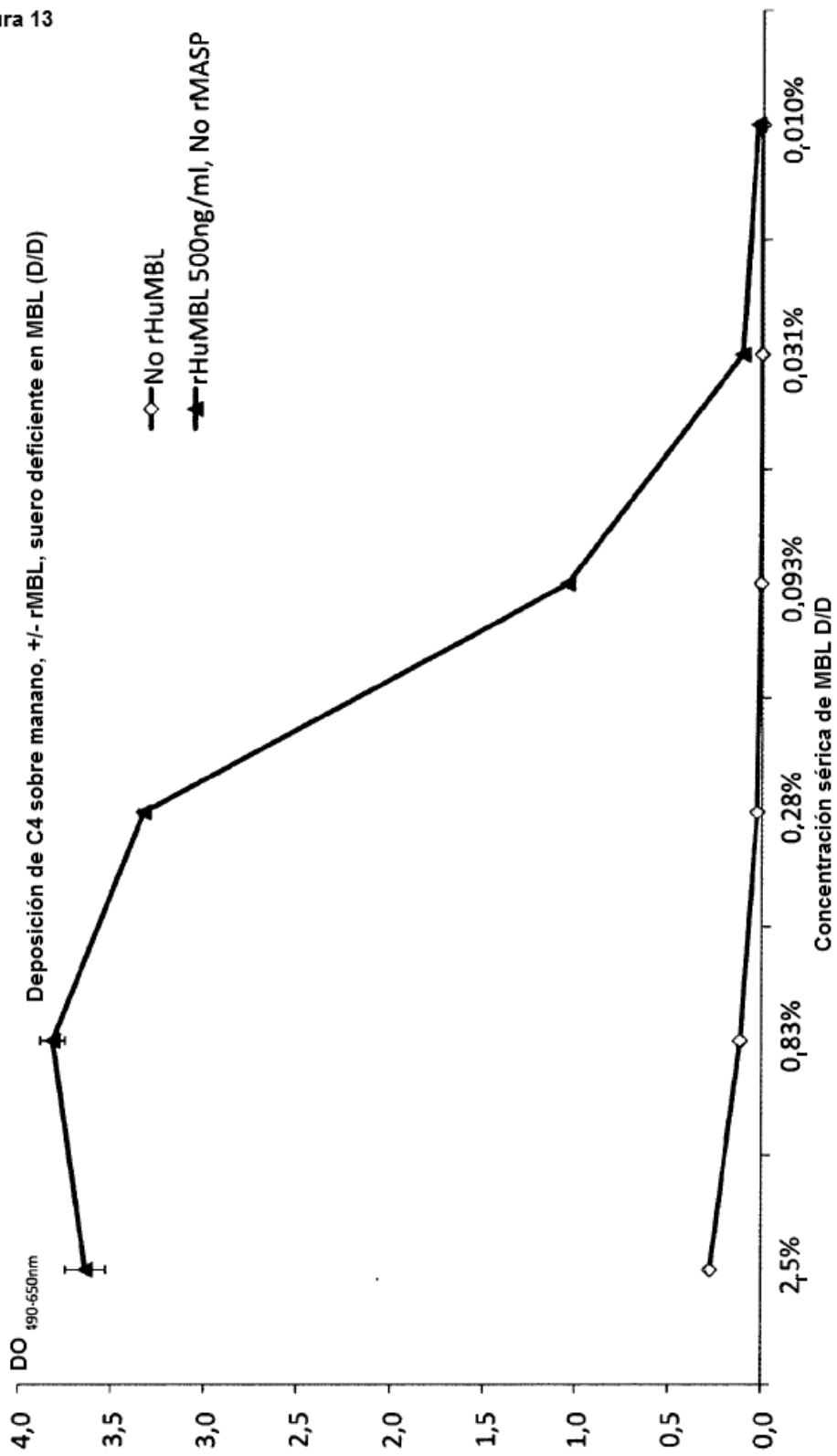


Figura 14

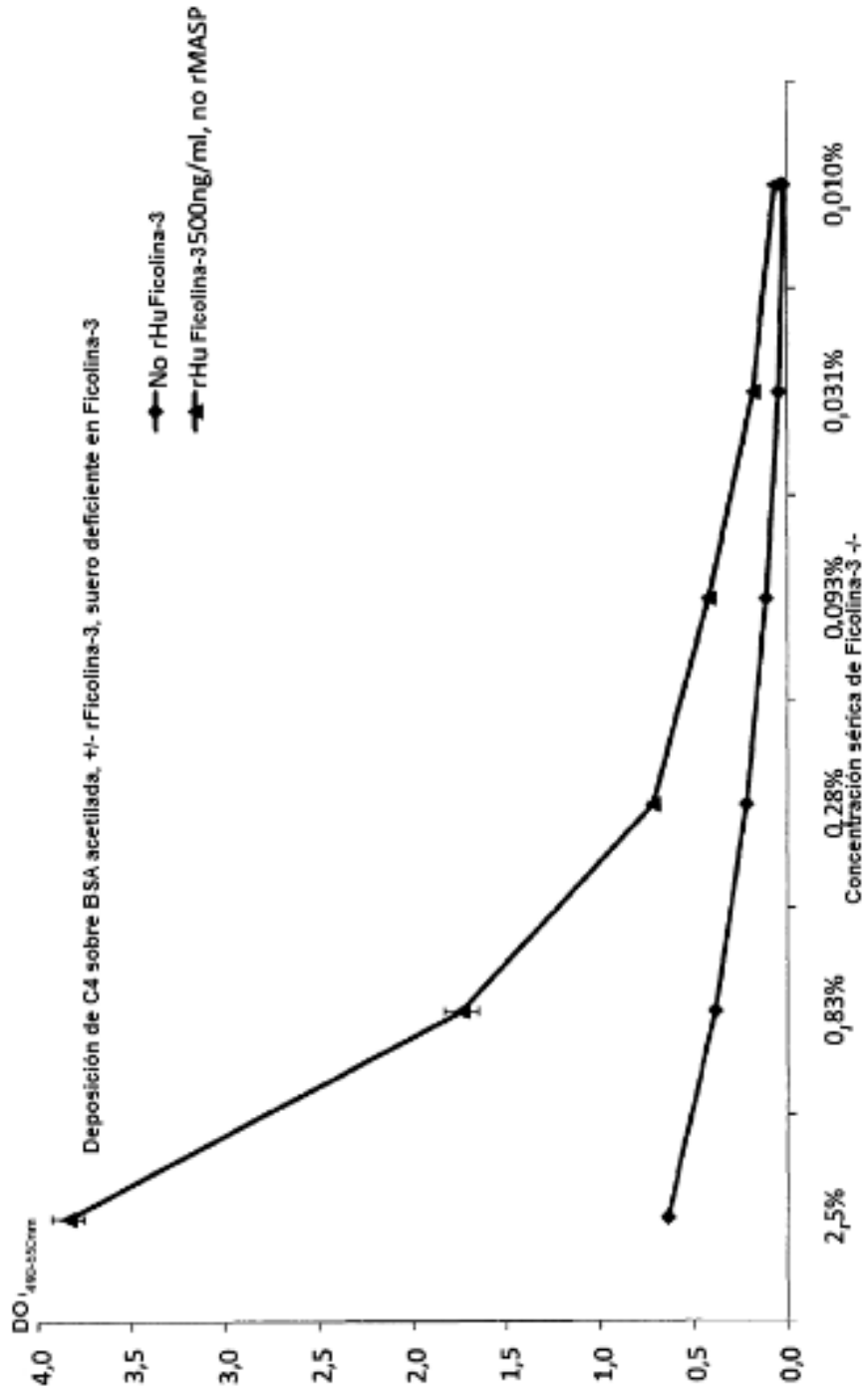


Figura 15

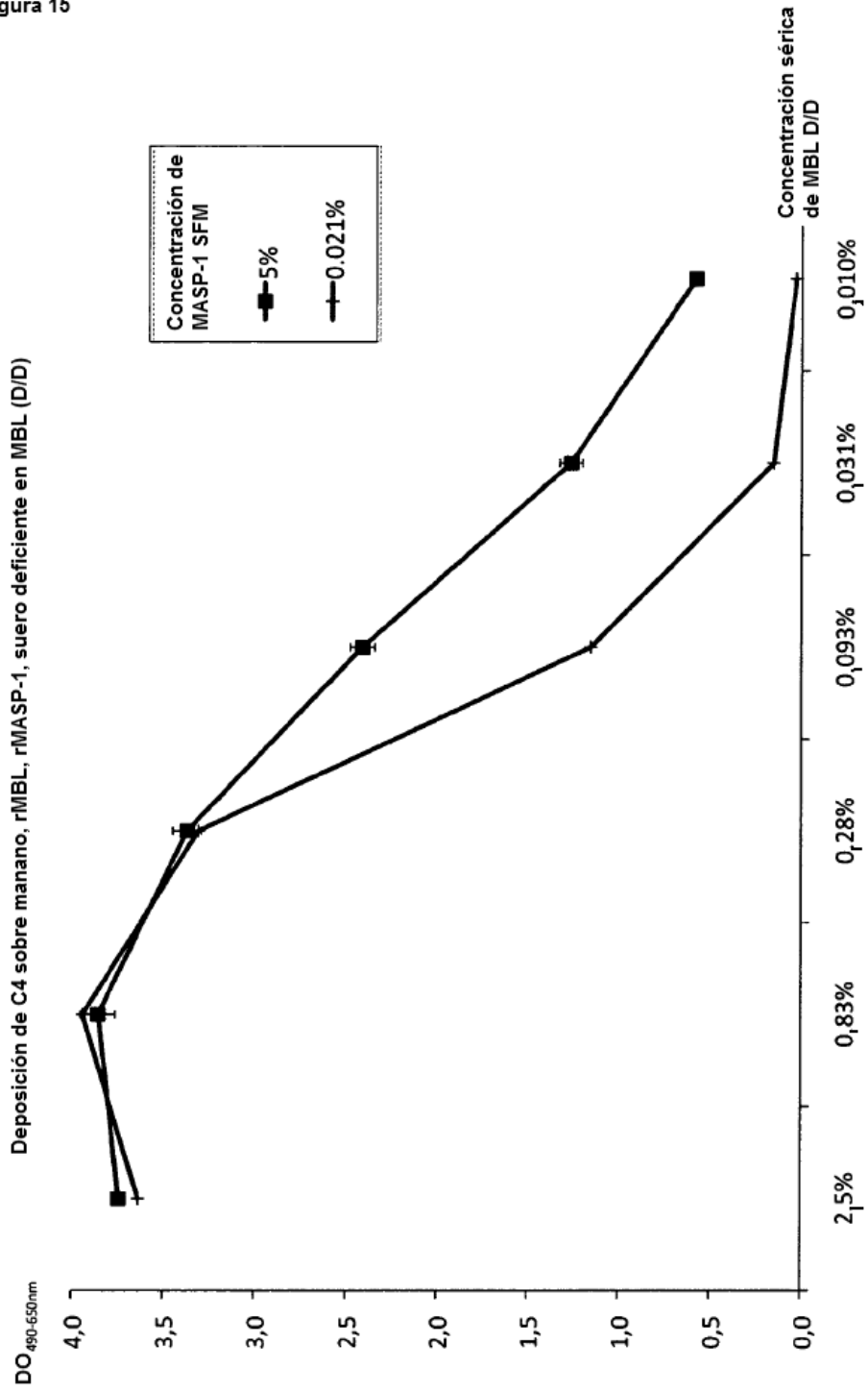




Figura 16

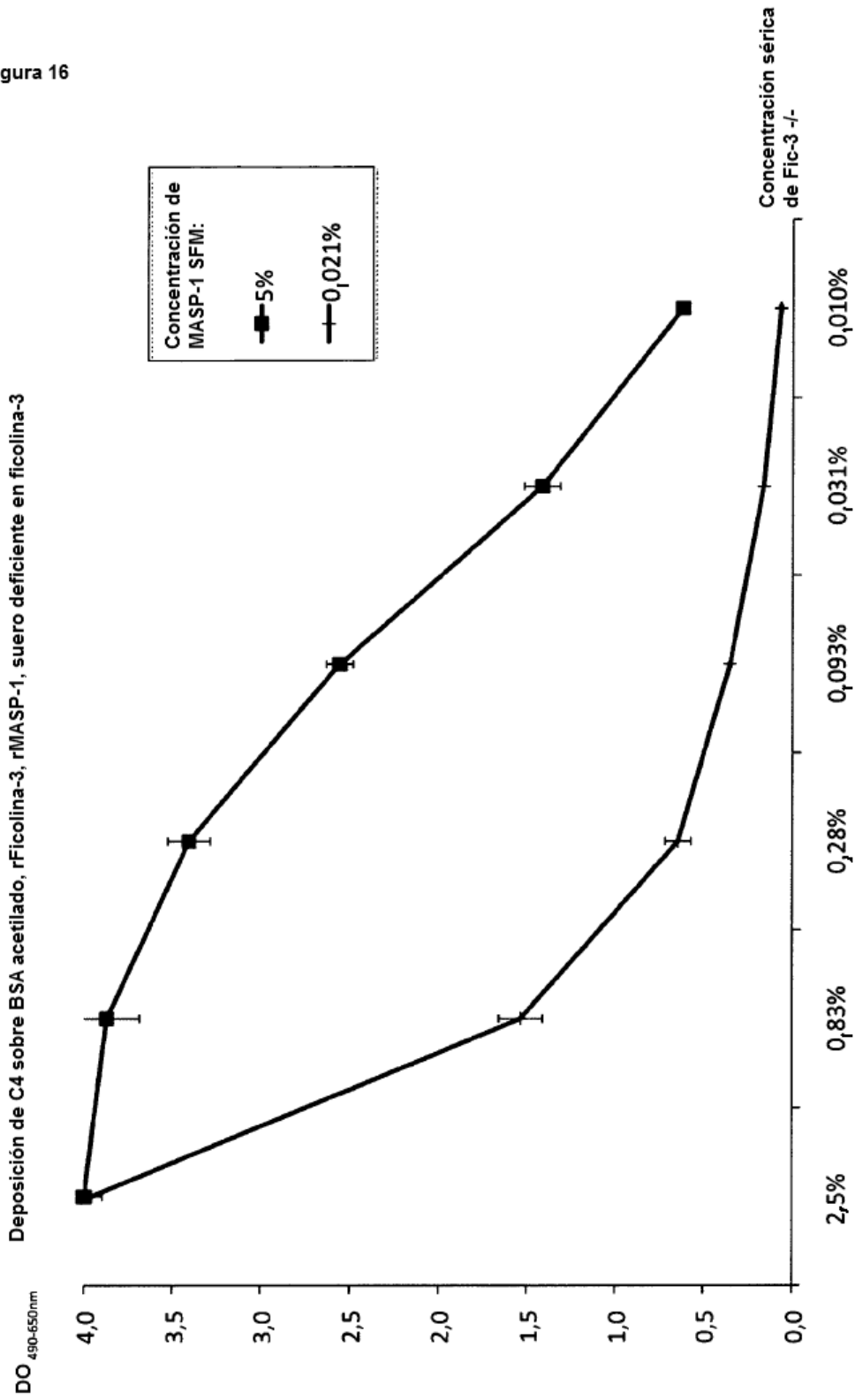


Figura 17

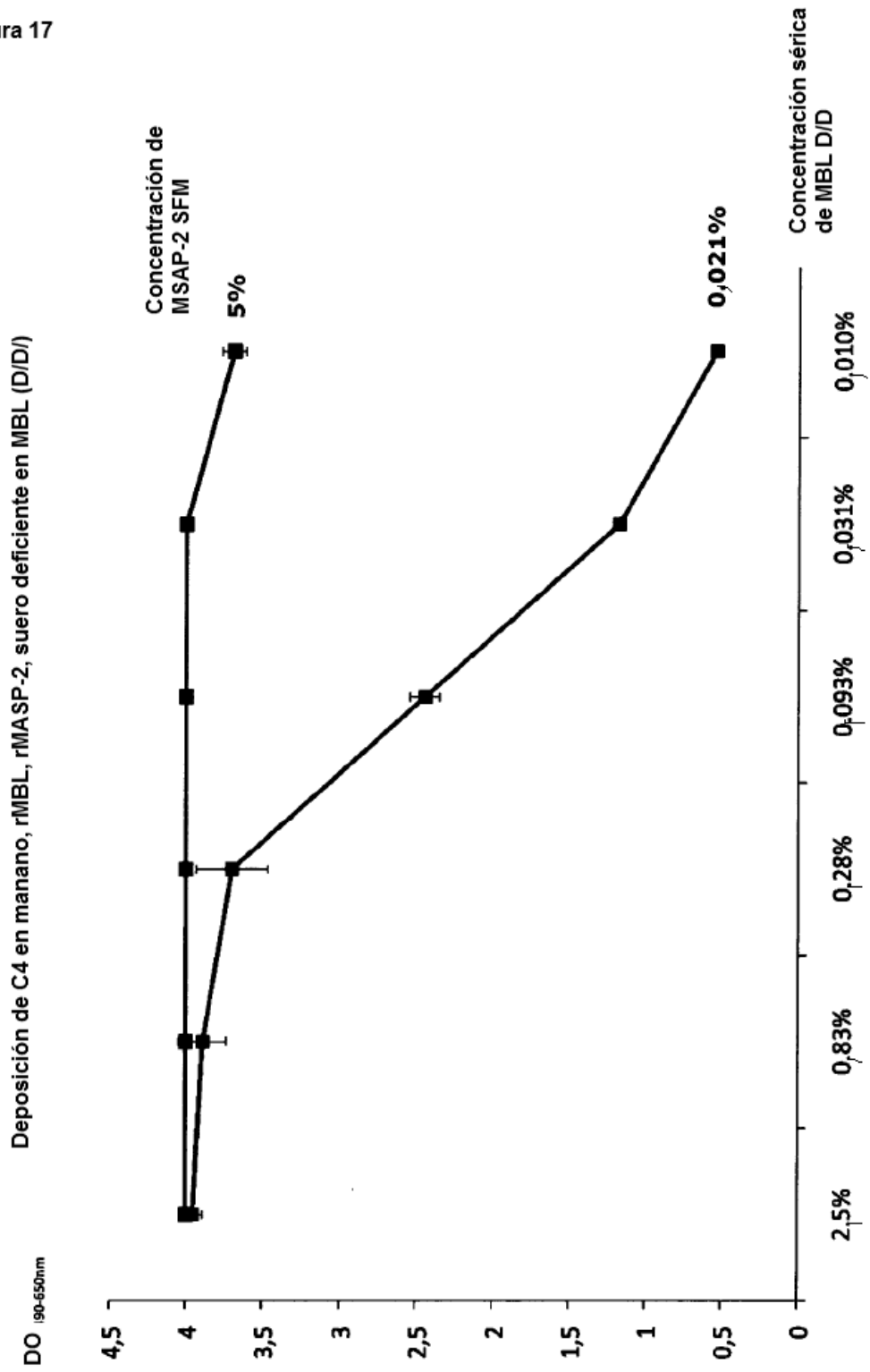


Figura 18

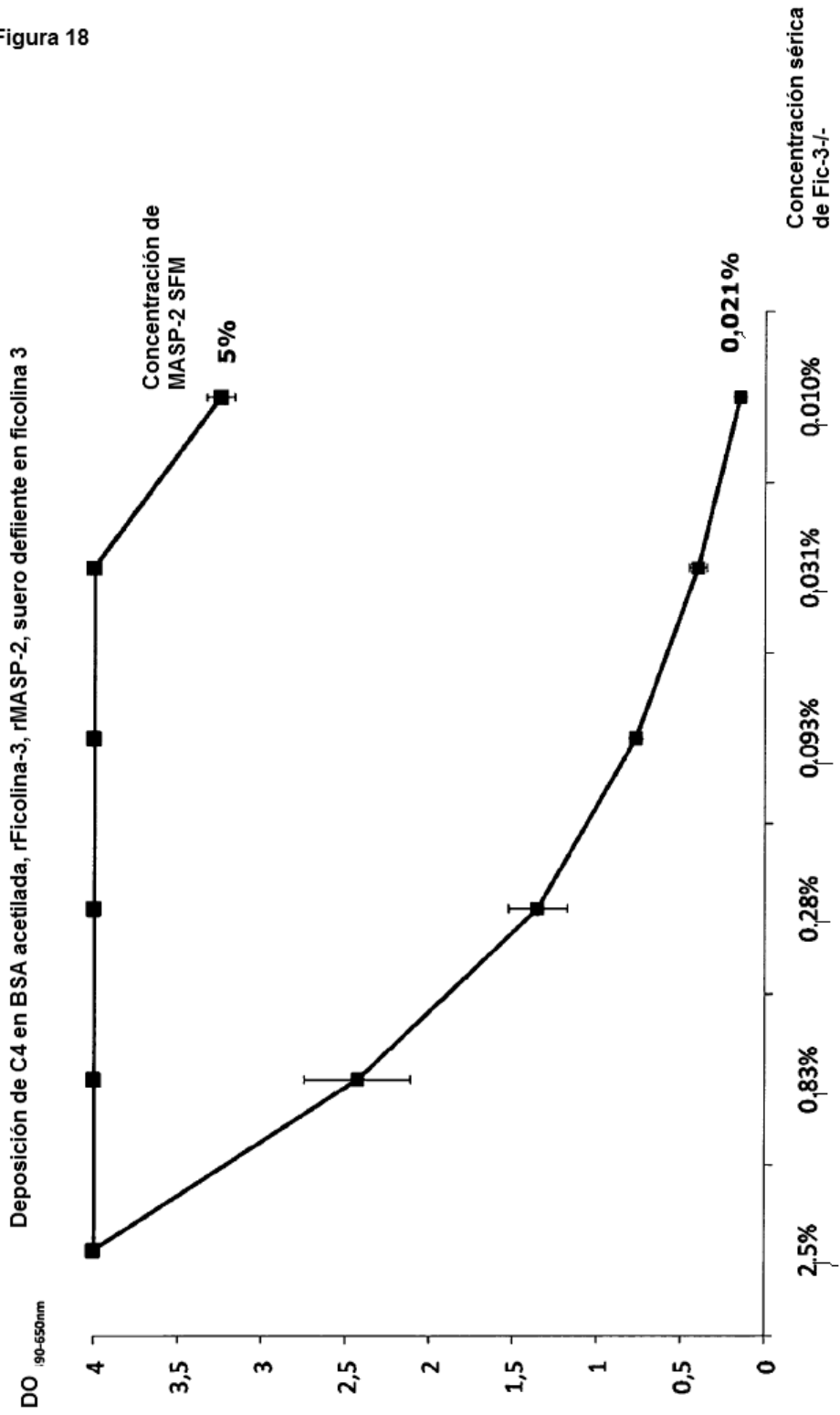


Figura 19

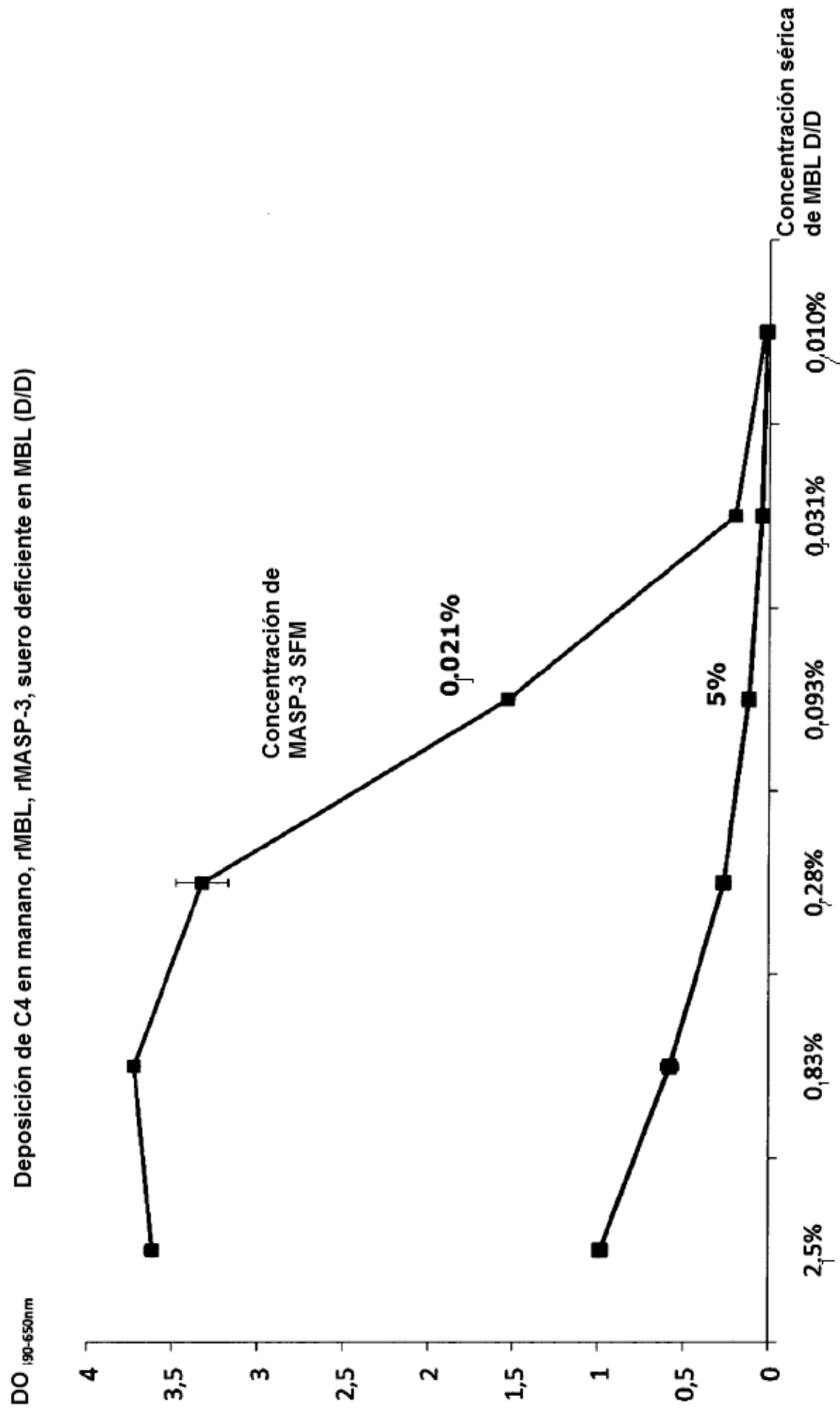


Figura 20

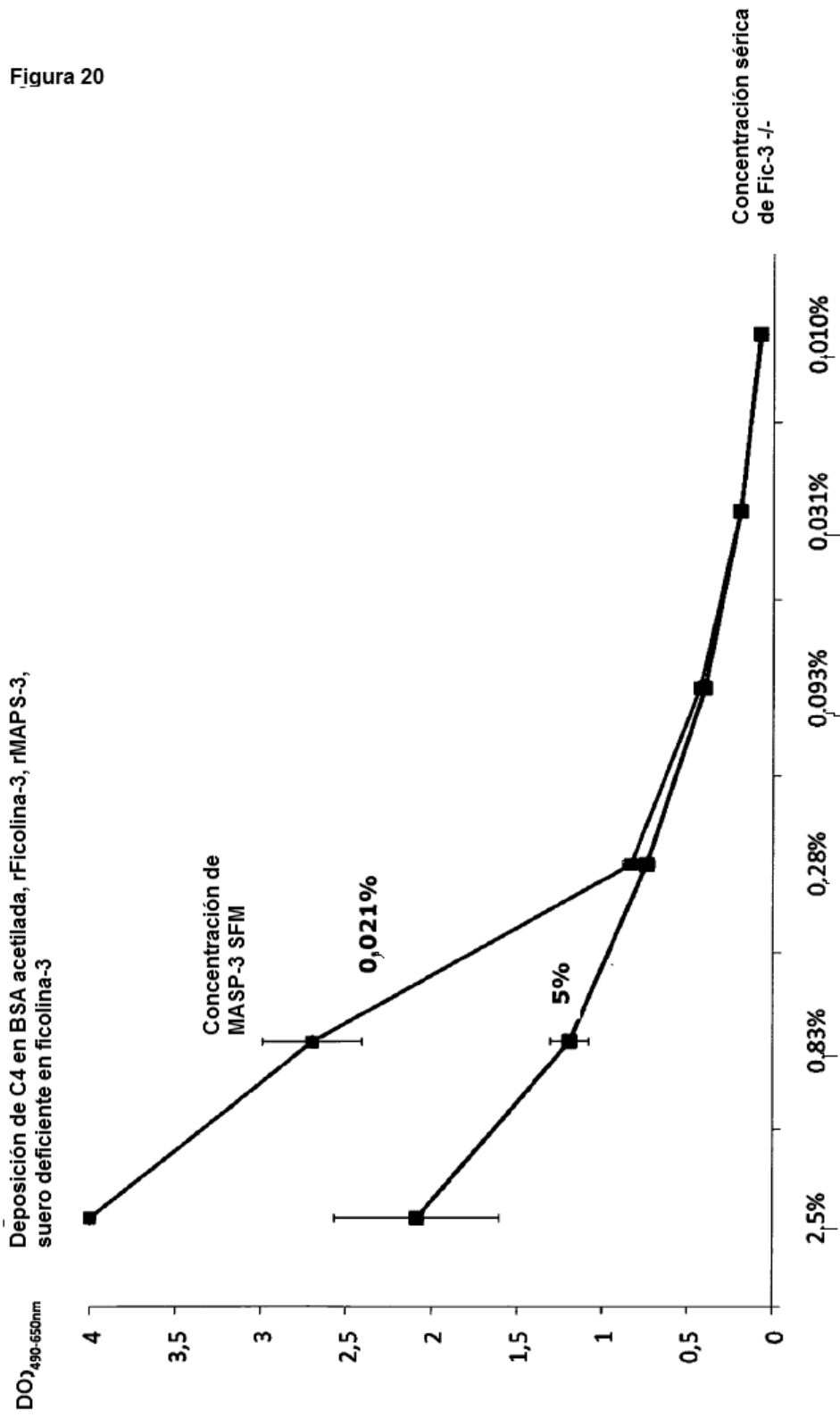


Figura 21

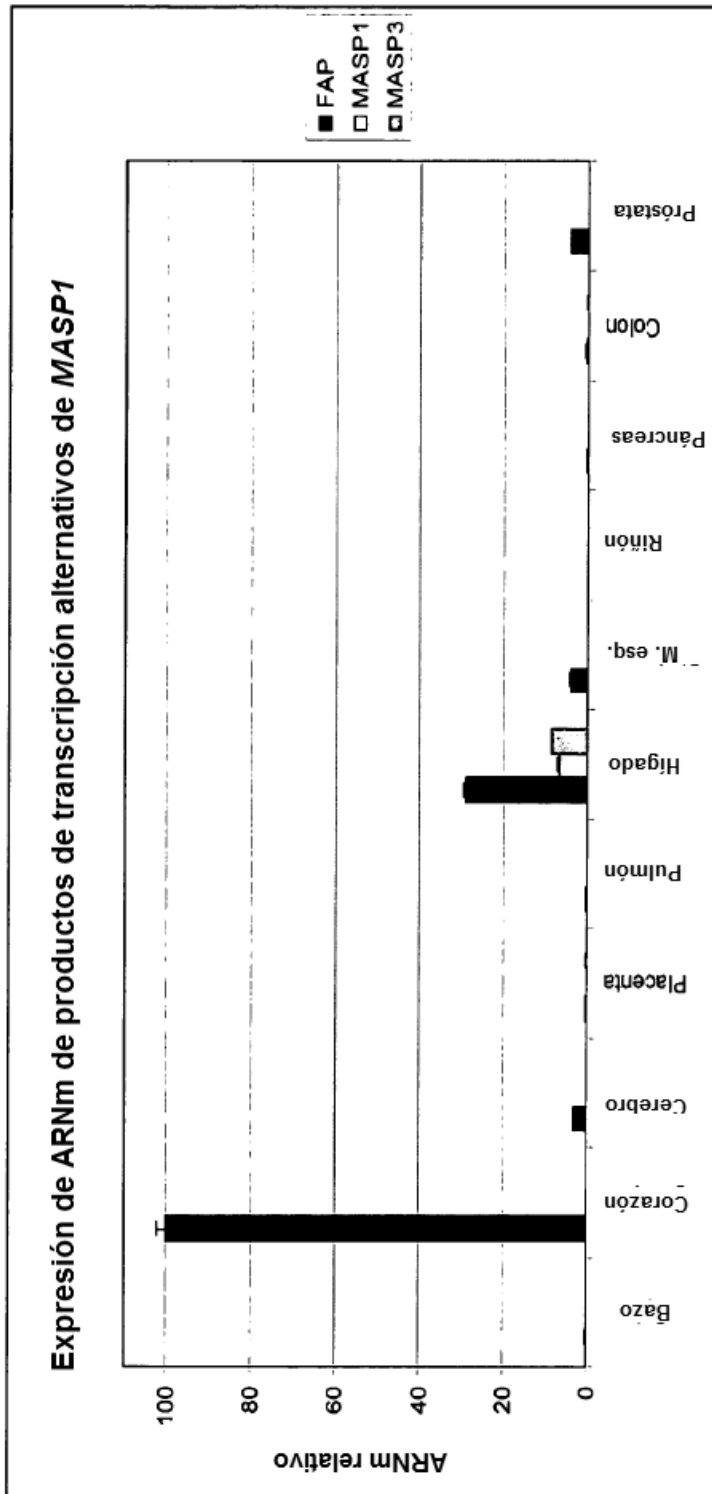


Figura 22

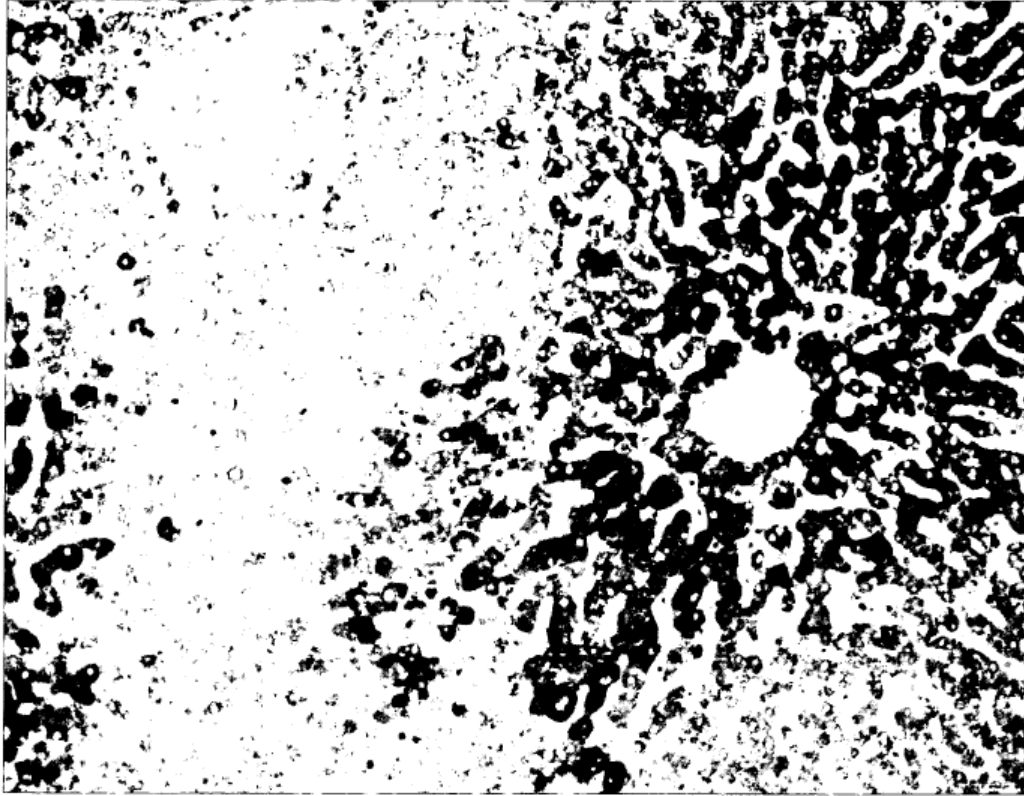


Figura 23





Figura 24

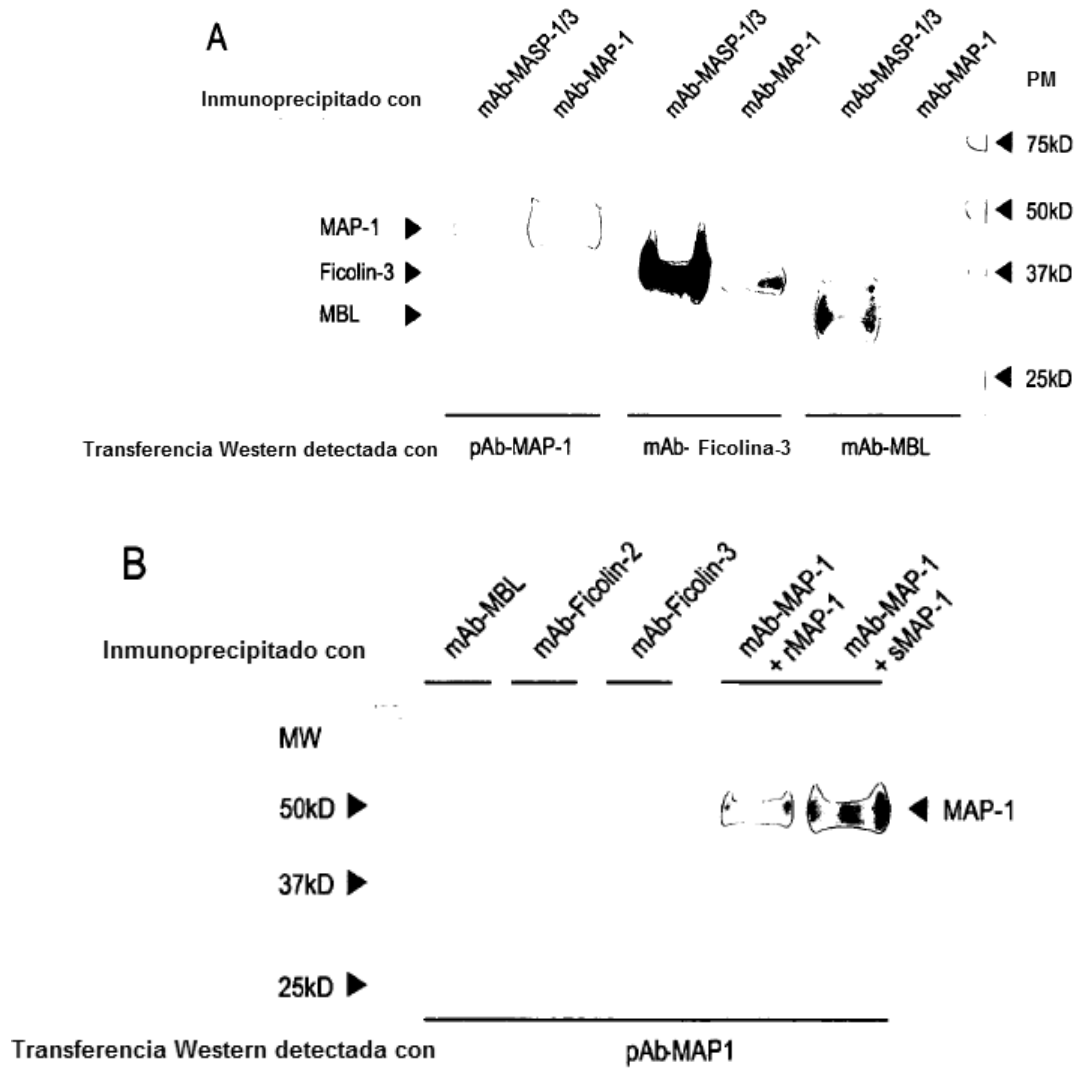


Figura 25

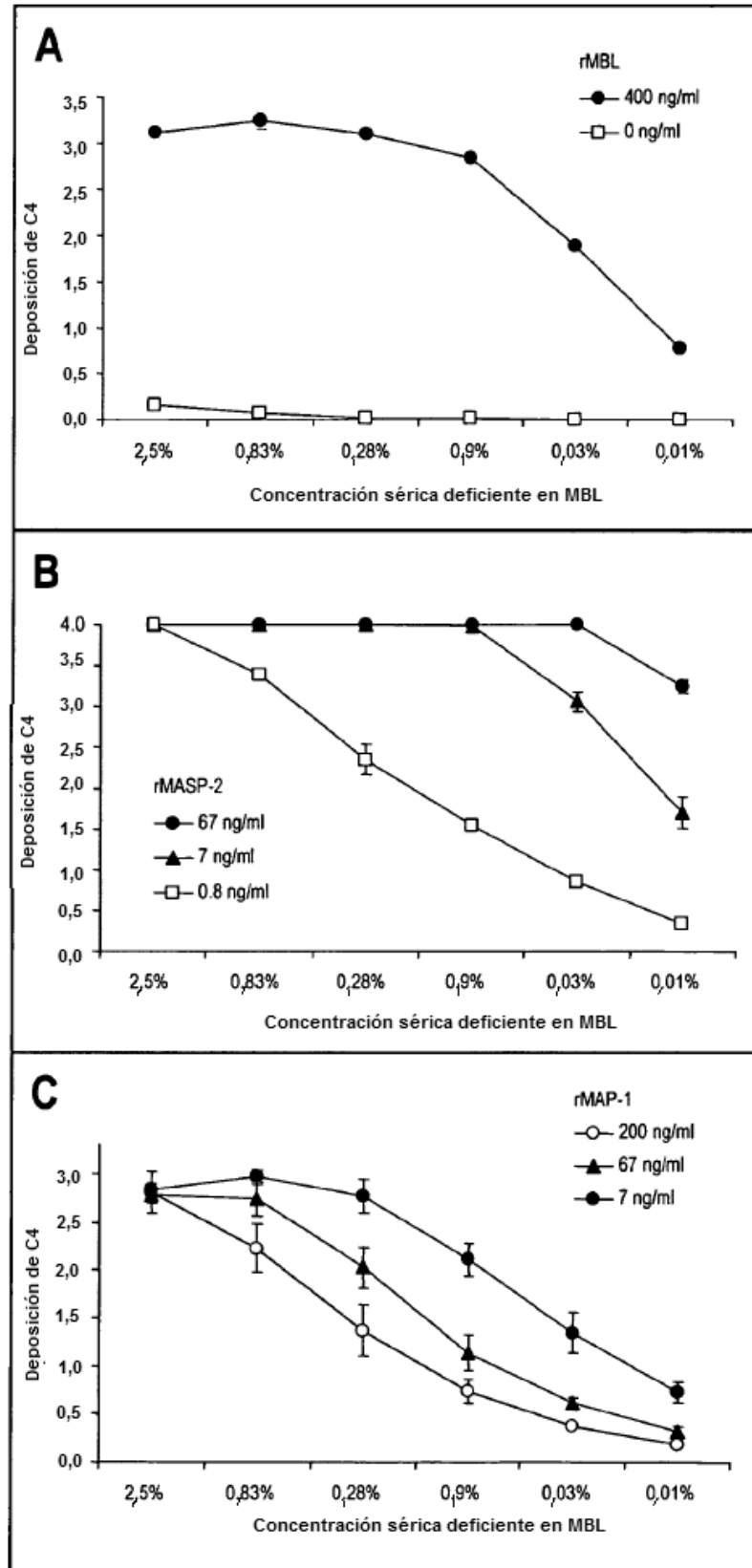


Figura 25 continuación

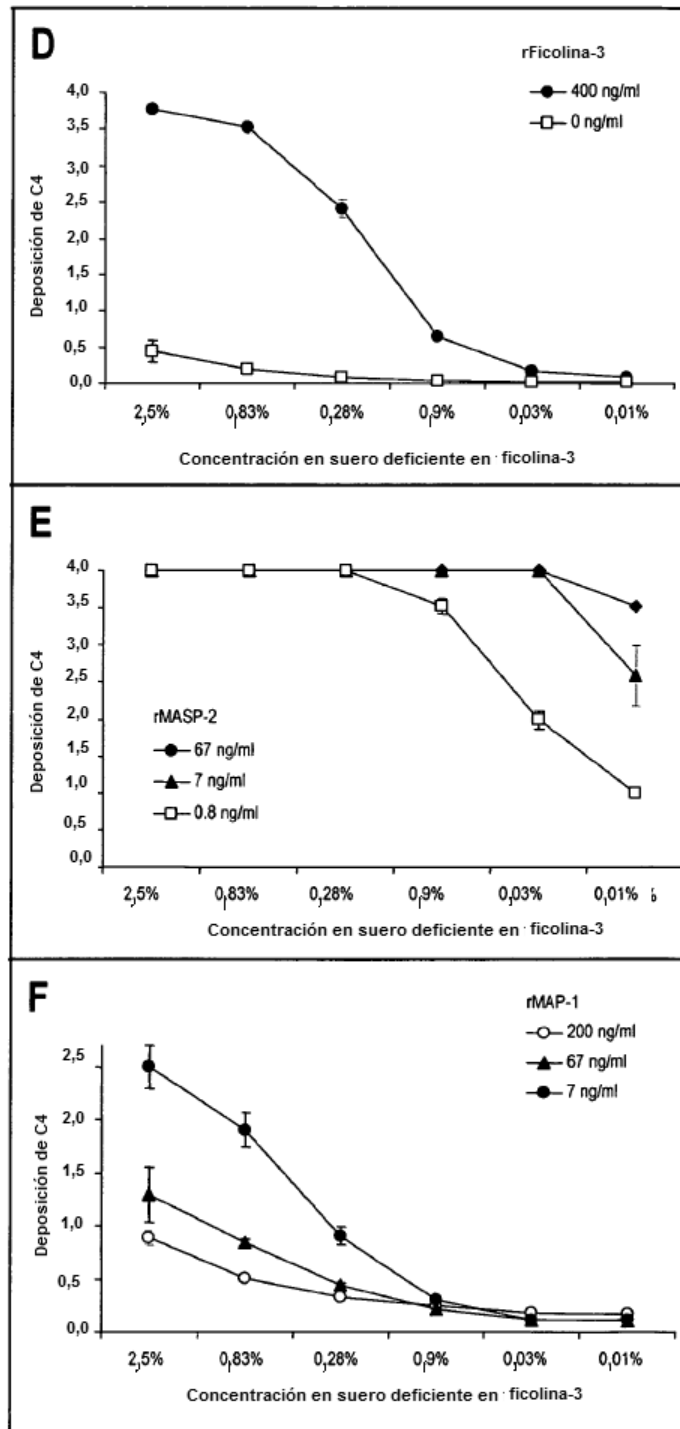


Figura 26

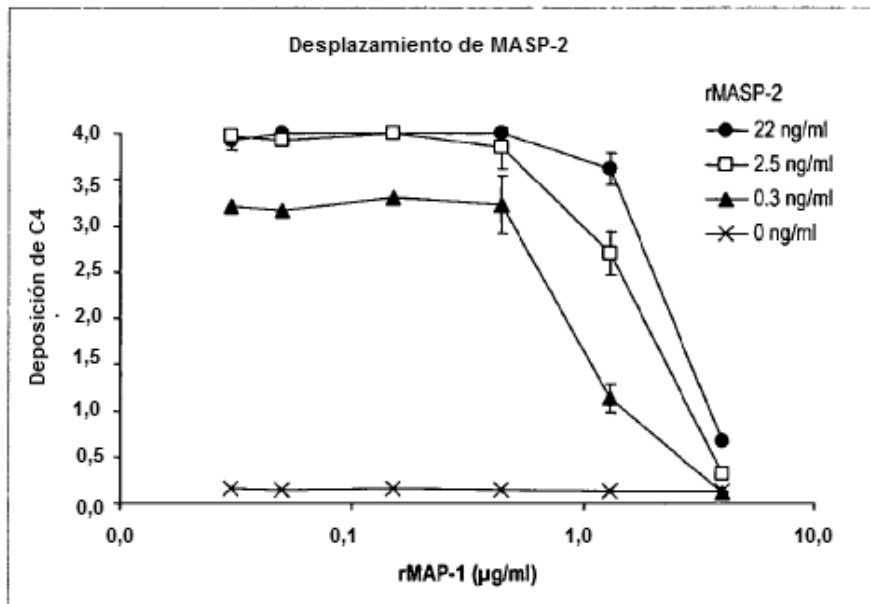


Figura 27

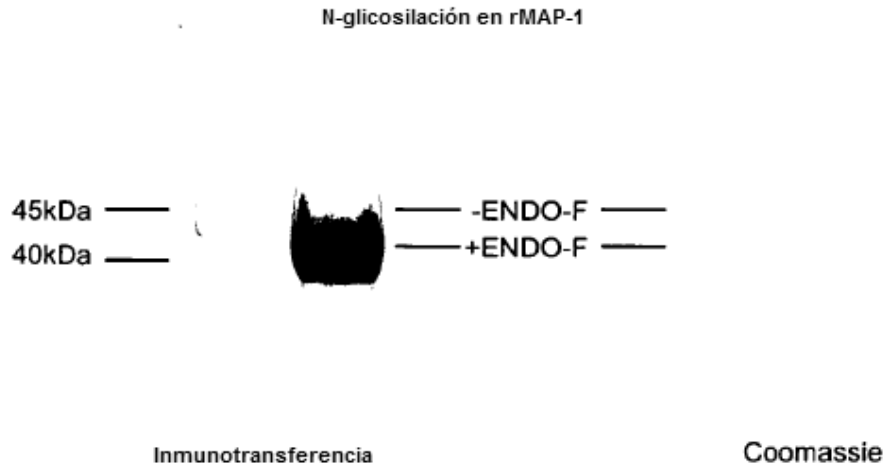


Figura 28A, B:

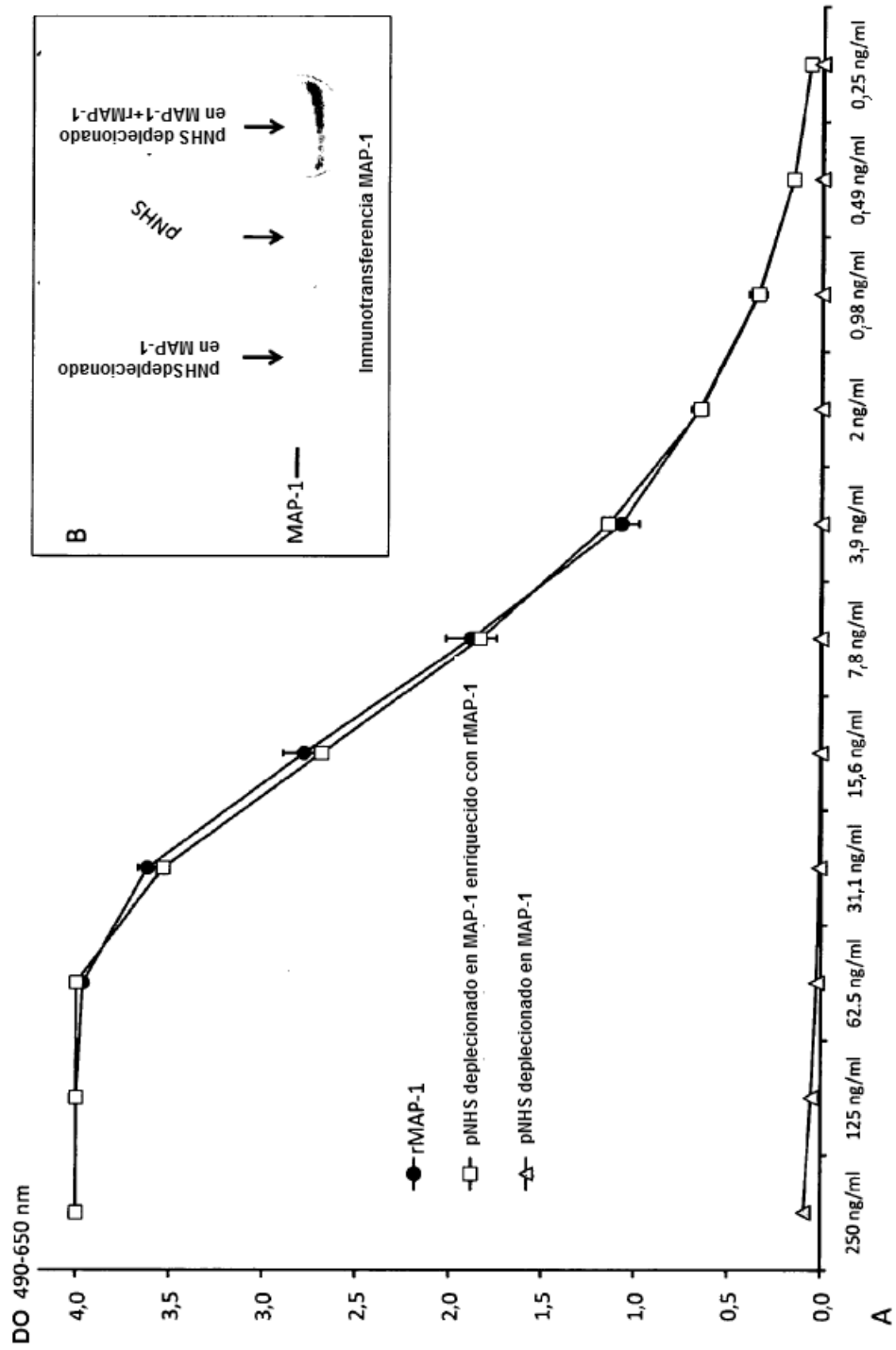


Figura 29A:

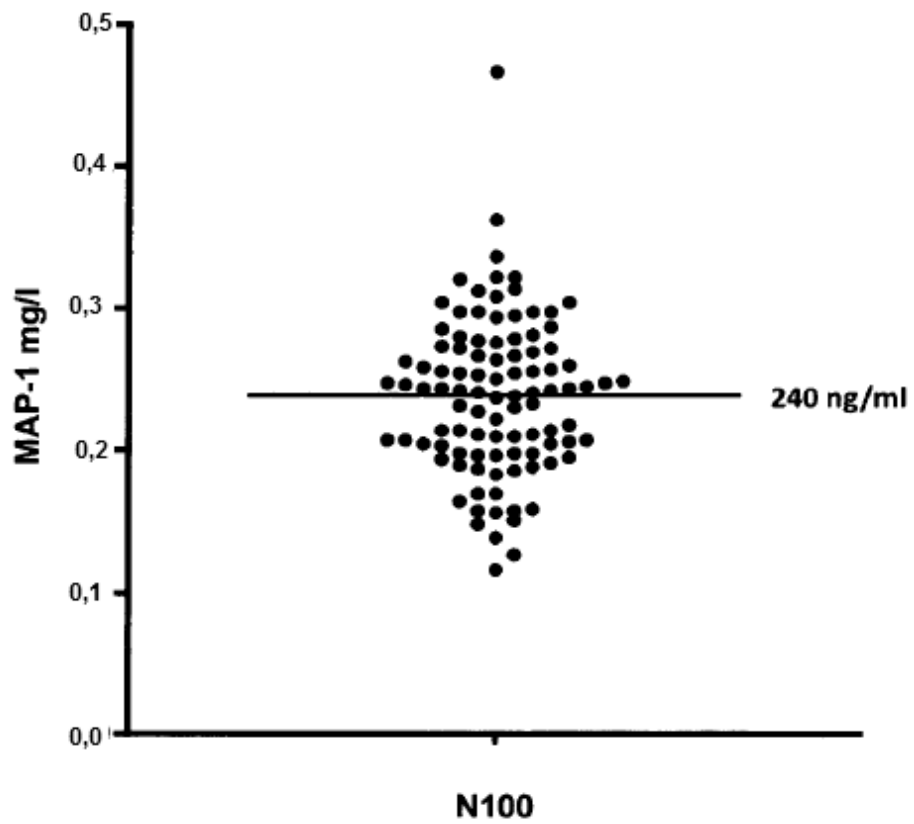


Figura 29B:

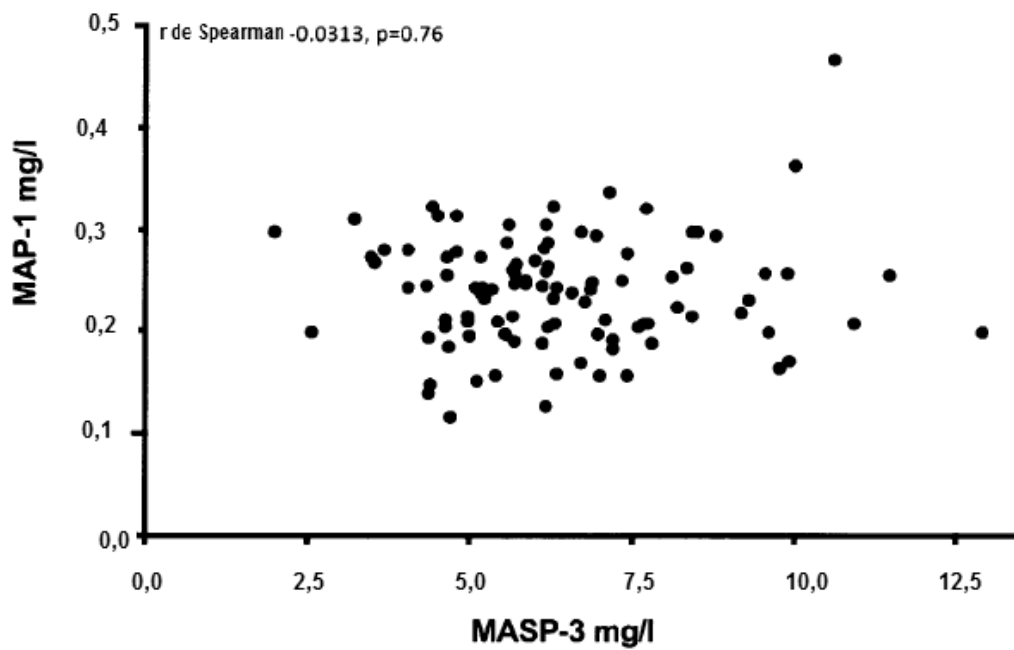


Figura 29C

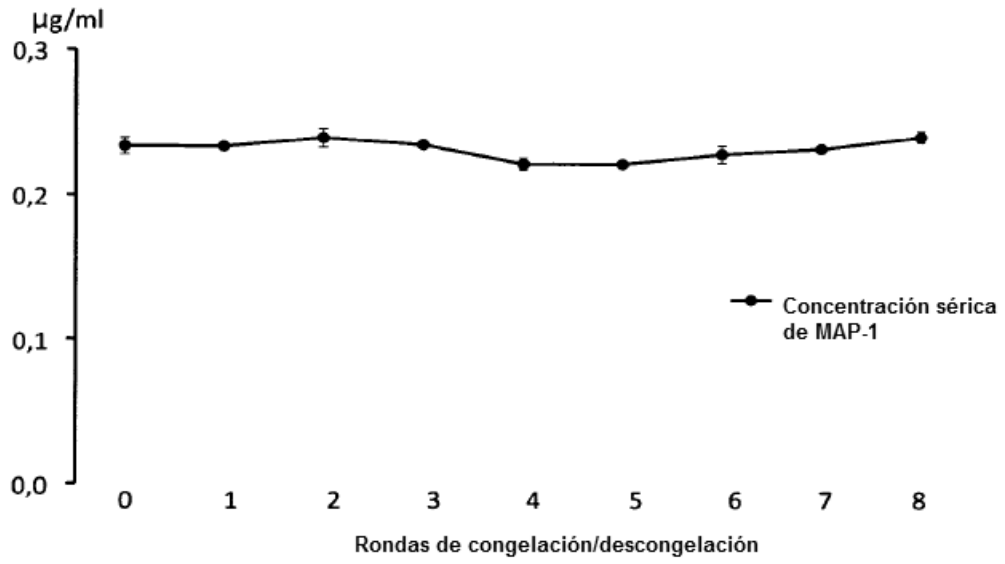




Figura 30A:

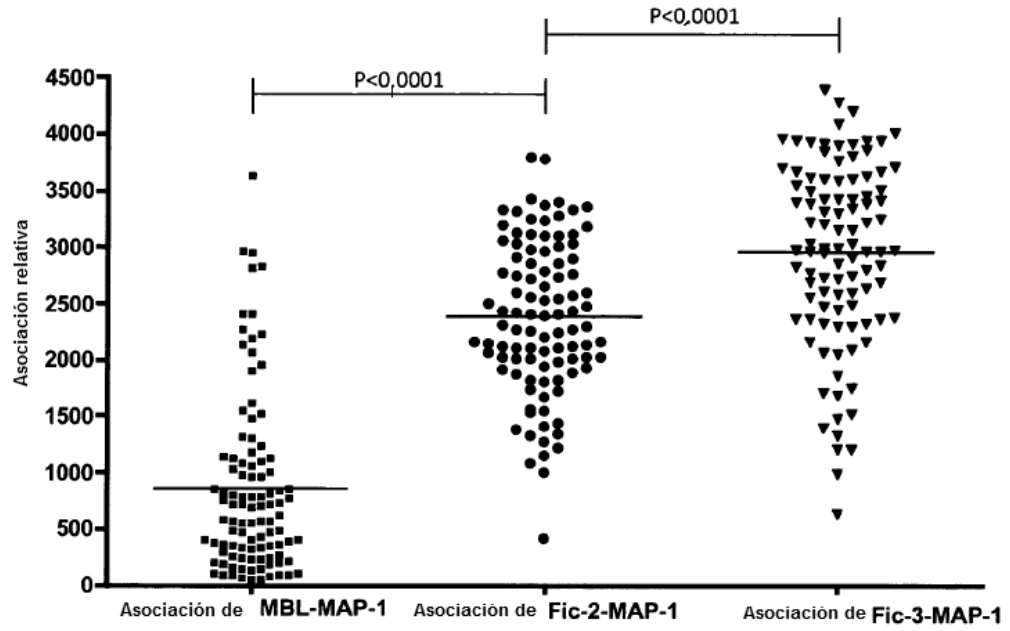


Figura 30B:

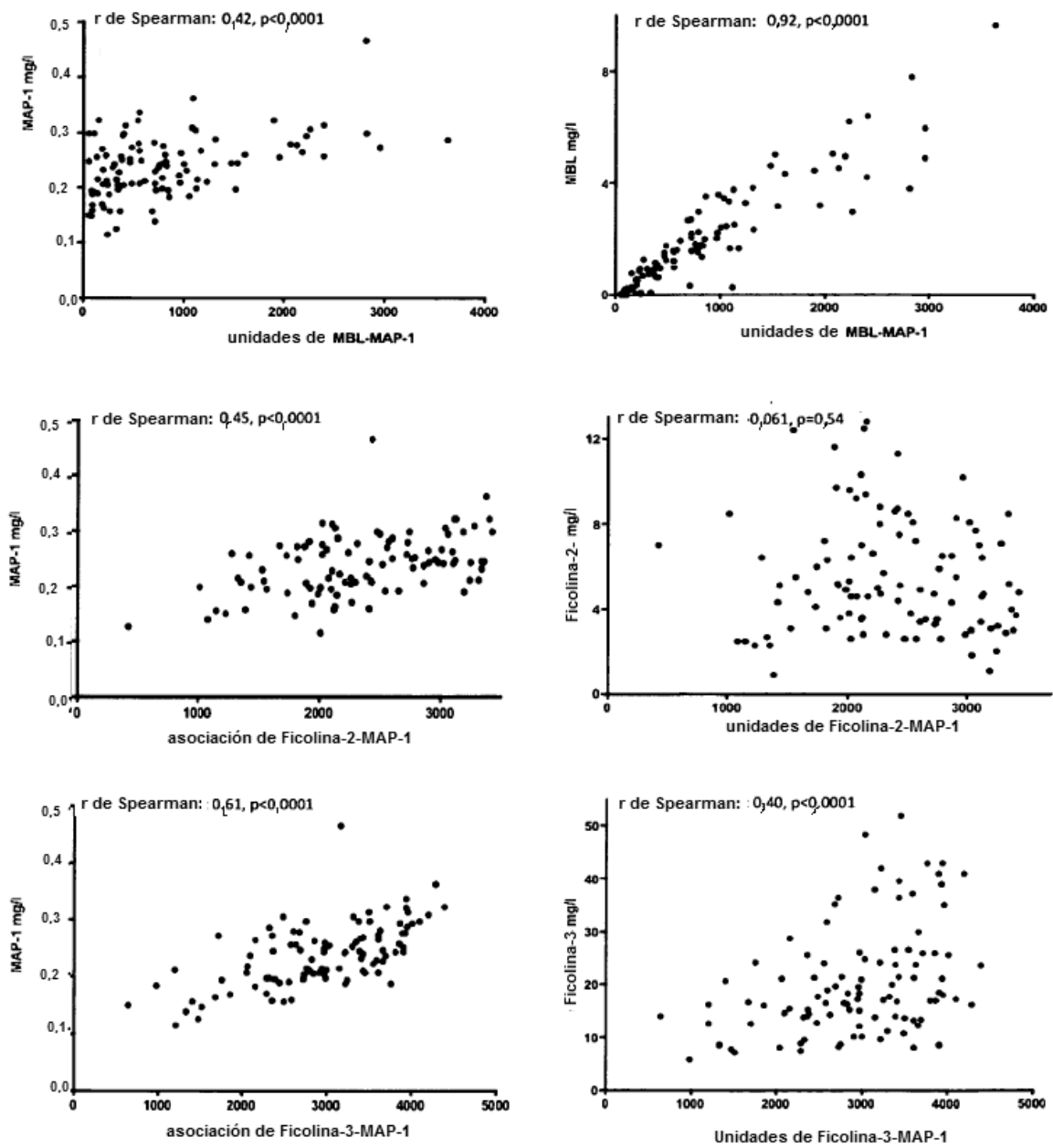


Figura 31A:

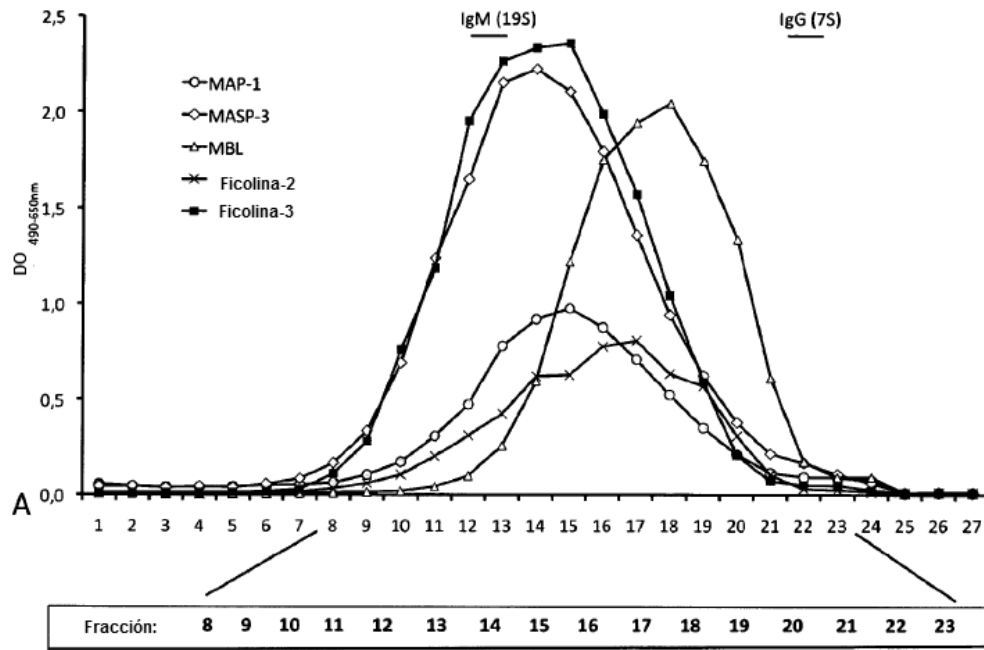
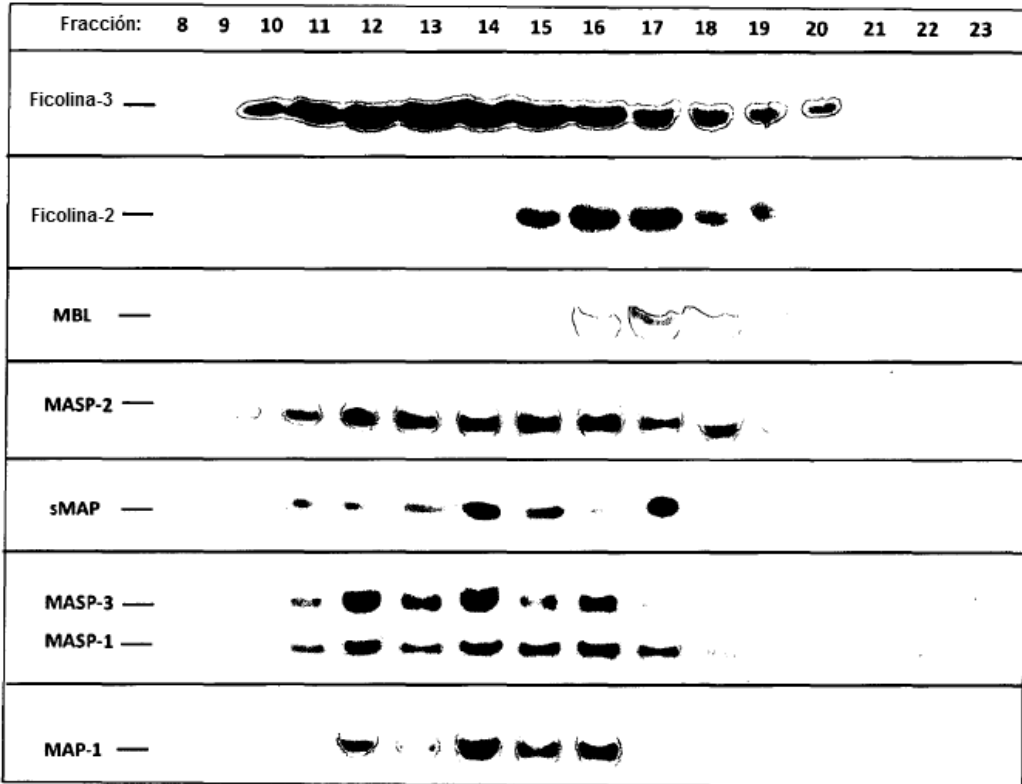


Figura 31A:



B

Figura 31C

