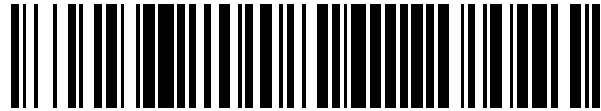


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 477**

51 Int. Cl.:

C07K 16/36 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2007 E 07868632 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2097455**

54 Título: **Anticuerpos anti-factor D humanizados**

30 Prioridad:

02.11.2006 US 856505 P

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

23.12.2014

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**WU, HERREN;
SINGH, SANJAYA;
FUNG, SEK CHUNG;
AN, LING-LING;
LOWMAN, HENRY B. y
KELLEY, ROBERT F.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 525 477 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

Anticuerpos anti-factor D humanizados

Antecedentes de la invención

5 El sistema del complemento desempeña un papel central en el aclaramiento de complejos inmunitarios y la respuesta inmunitaria a agentes infecciosos, antígenos foráneos, células infectadas por virus y células tumorales. Sin embargo, el complemento también está implicado en la inflamación patológica y en enfermedades autoinmunitarias. Por lo tanto, la inhibición de la activación excesiva o incontrolada de la cascada del complemento podría proporcionar beneficios clínicos a pacientes con tales enfermedades y afecciones.

10 El sistema del complemento abarca dos rutas de activación distintas, denominadas rutas clásica y alternativa (V.M. Holers, en *Clinical Immunology: Principles and Practice*, ed. R. R. Rich, Mosby Press; 1996, 363-391). La ruta clásica es una cascada dependiente de calcio/magnesio que es activada normalmente por la formación de complejos antígeno-anticuerpo. La ruta alternativa es una cascada dependiente de magnesio que es activada por depósito y activación de C3 sobre ciertas superficies susceptibles (p. ej., polisacáridos de la pared celular de levaduras y bacterias, y ciertos materiales biopoliméricos). La activación de la ruta del complemento genera fragmentos biológicamente activos de proteínas del complemento, p. ej., las anafilotoxinas C3a, C4a y C5a y complejos de ataque a la membrana (MAC) C5b9, que median las actividades inflamatorias que implican la quimiotaxis de leucocitos, la activación de macrófagos, neutrófilos, plaquetas, mastocitos y células endoteliales, la permeabilidad vascular, la citolisis, y la lesión tisular.

20 El Factor D es una serina proteasa altamente específica esencial para la activación de la ruta alternativa del complemento. Escinde el factor B unido a C3b, generando la enzima C3b/Bb que es el componente activo de las convertasas C3/C5 de la ruta alternativa. El Factor D puede ser una diana adecuada para la inhibición, ya que su concentración en plasma en seres humanos es muy baja (1,8 µg/ml), y se ha demostrado que es la enzima limitante de la activación de la ruta del complemento alternativa (P.H. Lesavre y H.J. Müller-Eberhard *J. Exp Med.*, 1978; 148: 1498-1510; J.E. Volanakis et al., *New Eng J Med.*, 1985; 312: 395-401).

25 Se ha demostrado que la regulación a la baja de la activación del complemento es eficaz en el tratamiento de varias indicaciones de enfermedades en modelos animales y en estudios *ex vivo*, p. ej., lupus eritematoso generalizado y glomerulonefritis (Y. Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1996, 93: 8563-8568), artritis reumatoide (Y. Wang et al, *Proc Natl Acad Sci.*, 1995; 92: 8955-8959), bypass cardiopulmonar y hemodiálisis (C.S. Rinder, *J. Clin Invest.*, 1995; 96: 1564-1572), rechazo hiperagudo en trasplante de órganos (T.J. Kroshus et al, *Transplantation*, 1995; 60: 1194-1202), infarto de miocardio (J. W. Homeister et al., *J. Immunol.* 1993; 150: 1055-1064; H. F. Weisman et al., *Science*, 1990; 249: 146-151), lesión por reperfusión (E. A. Amsterdam et al, *Am J. Physiol.*, 1995; 268: H448-H457), y síndrome de dificultad respiratoria del adulto (R. Rabinovici et al., *J. Immunol.* 1992; 149: 1744-1750). Además, otras afecciones inflamatorias y enfermedades de complejos autoinmunitarios/inmunitarios también están estrechamente asociadas con la activación del complemento (V.M. Holers, *idem.*, B. P. Morgan *Eur J. Clin. Invest.*, 1994; 24: 219-228), incluyendo lesión térmica, asma grave, choque anafiláctico, inflamación intestinal, urticaria, angioedema, vasculitis, esclerosis múltiple, miastenia grave, glomerulonefritis membranoproliferativa y síndrome de Sjögren.

E. J. Tanhehco et al. (*Transplant Proc.* 1999; 31: 2168-2171) describen el anticuerpo anti-factor D monoclonal murino 166-32 que inhibe la ruta alternativa del sistema del complemento humano.

40 M. Harboe et al. (*Clin. Ex. Immunol.* 2004; 138: 439-446) utilizan el anti-factor D monoclonal murino para estudiar el papel cuantitativo de la amplificación de la ruta alternativa en la activación del complemento terminal inducida por la ruta clásica.

45 Existe una necesidad de anticuerpos terapéuticos en el campo de los trastornos mediados por el complemento y los anticuerpos humanizados de la presente invención proporcionan anticuerpos de alta afinidad útiles para satisfacer esta necesidad.

Compendio de la invención

50 La presente invención se refiere en general a anticuerpos que comprenden secuencias de dominio variable de cadena pesada y ligera derivadas de las secuencias de dominio variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo murino 166-32, que es un anticuerpo capaz de inhibir las actividades biológicas asociadas con el Factor D. Por ejemplo, a una concentración de 18 µg/ml (equivalente a aproximadamente 1,5 veces la concentración molar del factor D humano en la sangre; la razón molar de anticuerpo anti-Factor D con respecto al Factor D es de aproximadamente 1,5:1), se puede observar la inhibición significativa de la actividad del complemento alternativa por el anticuerpo (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.956.107)

En particular, la invención se refiere a un anticuerpo anti-Factor D o un fragmento de anticuerpo que comprenden:

55 (i) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos

97% con el SEQ ID NO: 5 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 6.

5 (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 7 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 8;

(iii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 9 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 10; o

10 (iv) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 11 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 12.

En otra realización, la identidad de secuencia es de al menos 98% o al menos 99%.

15 En una realización, el anticuerpo anti-Factor D o un fragmento del mismo comprende el dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7, en donde el aminoácido de la posición 104 del SEQ ID NO: 7 es una valina o una leucina.

En otro aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende el ácido nucleico de la invención y una célula anfitriona que comprende dicho vector.

20 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende el anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo y al uso de dicha composición para el tratamiento de una enfermedad ocular mediada por el complemento tal como la degeneración macular asociada con la edad o la retinopatía diabética.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la producción de un anticuerpo anti-Factor D o un fragmento del mismo, que comprende cultivar la célula anfitriona de la invención en un medio; y purificar el anticuerpo o fragmento allí expresados.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-Factor D o un fragmento del mismo obtenido mediante dicho método.

Breve descripción de las figuras

30 Las Figuras 1A y 1B representan la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (Figura 1A) y la cadena ligera variable (Figura 1B) del MAb Murino 166-32.

Las Figuras 2A y 2B representan la secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada variable (Figura 2A) y la cadena ligera variable (Figura 2B) del MAb Murino 166-32.

La Figura 3 representa la comparación de la cadena pesada del MAb murino 166-32.

La Figura 4 representa la comparación de la cadena ligera del MAb murino 166-32.

35 La Figura 5 representa las secuencias de aminoácidos de la Cadena Pesada Variable y la Cadena Ligera Variable para cada clon de humanizado anticuerpo Núm. 56, Núm. 111, Núm. 250 y Núm. 416.

La Figura 6 representa los resultados del análisis hemolítico para el clon del Fab de anticuerpo humanizado Núm. 56, Núm. 111, Núm. 250 y Núm. 416.

40 La Figura 7 representa la inhibición de la actividad del complemento alternativa por los clones del Fab de anticuerpo humanizado Núm. 56, Núm. 111, Núm. 250 y Núm. 416.

45 La Figura 8A-B (marcos consenso pesado variable (VH)) y Figura 9A-B (marcos consenso ligero variable (VL)) representan secuencias ilustrativas del marco consenso humano aceptor que se pueden utilizar para poner en práctica la presente invención con los siguientes identificadores de secuencia: (Figura 8A-B) marco consenso del subgrupo I VH humano menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO: 28), marco consenso del subgrupo I VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOS: 29-31), marco consenso del subgrupo II VH humano menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO: 32), marco consenso del subgrupo II VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOS: 33-35), marco consenso del subgrupo III VH humano menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO: 36), marco consenso de subgrupo III VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOS: 37-39), marco consenso del subgrupo VII VH humano menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO: 55), marco consenso del subgrupo VII VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID NO: 56-58), marco

50

5 acceptor VH humano menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO: 40), marco acceptor VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 41-42), marco acceptor 2 VH humano menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO: 43) y marco acceptor 2 VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOS: 44-46) y (Figura 9A-B) marco consenso del subgrupo I de VL kappa humano (SEQ ID NO: 47), marco consenso del subgrupo II de VL kappa humano (SEQ ID NO: 48), marco consenso del subgrupo III kappa humano (SEQ ID NO: 49) y marco consenso del subgrupo IV kappa humano (SEQ ID NO: 50).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-Factor D o un fragmento de anticuerpo que comprenden:

10 (i) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 5 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 6.

(ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 7 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 8;

15 (iii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 9 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 10; o

20 (iv) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 11 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 12.

En otra realización, la identidad de secuencia es de al menos 98% o al menos 99%.

En una realización, el anticuerpo anti-Factor D o un fragmento del mismo comprende el dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7, en donde el aminoácido de la posición 104 del SEQ ID NO: 7 es una valina o una leucina.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende el ácido nucleico de la invención y una célula anfitriona que comprende dicho vector.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende el anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo y al uso de dicha composición para el tratamiento de una enfermedad ocular mediada por el complemento tal como la degeneración macular asociada con la edad o la retinopatía diabética.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la producción de un anticuerpo anti-Factor D o un fragmento del mismo, que comprende cultivar la célula anfitriona de la invención en un medio; y purificar el anticuerpo o fragmento allí expresados.

35 En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-Factor D o un fragmento del mismo obtenido mediante dicho método.

Definiciones

40 Los términos utilizados en toda esta solicitud se deben interpretar con el significado habitual y típico para los expertos normales en la técnica. Sin embargo, los solicitantes desean que los siguientes términos tengan la definición concreta definida a continuación.

45 La frase "sustancialmente idéntica" con respecto a una secuencia de polipéptidos de una cadena de anticuerpo puede ser interpretada como una cadena de anticuerpo que muestra una identidad de secuencia de al menos 70%, u 80%, o 90% o 95% con la secuencia de polipéptidos de referencia. El término con respecto a una secuencia de ácido nucleico puede ser interpretada como una secuencia de nucleótidos que muestra una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 85%, o 90%, o 95% o 97% con la secuencia de ácido nucleico de referencia.

50 Se deberá interpretar que el término "identidad" o "homología" representan el porcentaje de residuos de aminoácidos de la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de una secuencia correspondiente con la cual se comparan, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario para lograr el máximo porcentaje de identidad para la secuencia completa, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Ni las extensiones ni las inserciones N- o C-terminales deberán ser consideradas reductoras de la identidad u homología. Los métodos y programas informáticos para el alineamiento son bien conocidos en la técnica. La identidad de secuencia se puede medir utilizando un soporte lógico para el análisis de

secuencias.

El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales completos), anticuerpos policlonales, y anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos). Los anticuerpos (Ab) y las inmunoglobulinas (Ig) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos presentan especificidad de unión a una diana específica, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas de tipo anticuerpo que carecen de especificidad por la diana. Los anticuerpos y las inmunoglobulinas nativos son generalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo.

Según se utiliza en la presente memoria, "anticuerpo anti-Factor D humano" significa un anticuerpo que se une específicamente al factor D humano de tal manera que inhibe o reduce sustancialmente la activación del complemento.

El término "variable" en el contexto de los dominios variables de anticuerpos, se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo concreto para su diana concreta. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye homogéneamente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables (HVR), en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada una cuatro regiones FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDR de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a la diana de los anticuerpos (véase Kabat et al.). Según se utiliza en la presente memoria, la numeración de los residuos de aminoácidos de la inmunoglobulina se realiza de acuerdo con el sistema de numeración de residuos de aminoácidos de inmunoglobulinas de Kabat et al., (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987), a menos que se indique lo contrario.

El término "región hipervariable", "HVR", o "HV", cuando se usan en la presente memoria, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en la VH (H1, H2, H3), y tres en la VL (L1, L2, L3). Están en uso varias delineaciones de la región hipervariable y se incluyen en la presente memoria. Las regiones determinantes de la complementariedad de Kabat (CDR) se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente utilizadas (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol Biol* 196: 901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son utilizadas por el soporte lógico de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35b	H26-h35b	H26-H32	H30-h35b
(Numeración de Kabat)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Numeración de Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables extendidas" como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en la VH. Los residuos del dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat et al., más arriba para cada una de estas

definiciones.

Los residuos del "marco" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable o de los residuos de la CDR definidos en la presente memoria.

5 Los términos "numeración de residuos del dominio variable como en Kabat" o " numeración de la posición de aminoácidos como en Kabat", y variaciones de los mismos, se refieren al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, un FR o una CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de un solo aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (p. ej., residuos 82a, 82b, y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 del FR de la cadena pesada. La numeración de residuos de Kabat se puede determinar para un anticuerpo dado mediante alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada por Kabat "convencional".

15 El sistema de numeración de Kabat se utiliza generalmente cuando se refiere a un residuo del dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (p. ej., Kabat et al., Sequences of Immunological Interest., 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice de la EU" se utiliza generalmente para referirse a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (p. ej., el índice de la EU referido en Kabat et al, más arriba; la región bisagra del dominio constante de cadena pesada incluye aproximadamente los residuos 216 a 230 (numeración de EU) de la cadena pesada). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo EU de IgG1 humana. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, las referencias a los números de residuos en el dominio variable de los anticuerpos representan la numeración de los residuos por el sistema de numeración de Kabat. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, las referencias a los números de residuos en el dominio constante de los anticuerpos representa la numeración de los residuos por el sistema de numeración EU (p. ej., véase la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Núm. 60/640.323, Figures for EU numbering).

30 El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo completo, generalmente la región de unión a la diana o variable. Los ejemplos de los fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. La frase "fragmento o análogo funcional " de un anticuerpo es un compuesto que tiene actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo completo. Por ejemplo, un fragmento o análogo funcional de un anticuerpo anti-Factor D humano es aquel que se puede unir al Factor D de tal manera que evita o reduce sustancialmente la activación del complemento. Según se utiliza en la presente memoria, "fragmento funcional" con respecto a los anticuerpos, se refiere a fragmentos Fv, F(ab) y F(ab')₂. Un fragmento "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a la diana. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y ligera en una estrecha asociación, no covalente (dímero V_H - V_L). Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a la diana en la superficie del dímero V_H - V_L. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión a la diana al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para una diana) tiene la capacidad de reconocer y unirse a la diana. Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a la diana.

45 El fragmento Fab contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena la pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos F(ab') se producen por escisión del enlace disulfuro en las cisteínas de la bisagra del producto de digestión con pepsina de F(ab')₂. Los acoplamientos químicos adicionales de fragmentos de anticuerpo son conocidos por los expertos normales en la técnica.

55 El término "anticuerpo monoclonal" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio diana. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante sobre la diana. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden ser sintetizados por el cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como el obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso en la presente invención se pueden aislar

de bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas bien conocidas. Los anticuerpos monoclonales parentales que se van a utilizar de acuerdo con la presente invención se pueden elaborar mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, *Nature* 256, 495 (1975), o se pueden elaborar mediante métodos recombinantes.

- 5 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej. murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a la diana de los anticuerpos) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulinas no humanas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede comprender también al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de un molde seleccionado de inmunoglobulina humana.

15 Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que por lo general se toman de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)], sustituyendo las CDR o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos Núm. 4816567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

25 La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a utilizar en la elaboración de los anticuerpos humanizados puede en algunos casos ser importante para reducir la antigenicidad y/o la respuesta HAMA (anticuerpo anti-ratón humano) cuando el anticuerpo se destina a uso terapéutico en seres humanos. La reducción o eliminación de una respuesta HAMA es generalmente un aspecto significativo del desarrollo clínico de agentes terapéuticos adecuados. Véanse, p. ej., Khazraeli et al., *J. Natl. Cancer Inst.* (1988), 80:937; Jaffers et al., *Transplantation* (1986), 41:572; Shawler et al., *J. Immunol.* (1985), 135:1530; Sears et al., *J. Biol. Response Mod.* (1984), 3:138; Miller et al., *Blood* (1983), 62:988; Hakimi et al., *J. Immunol.* (1991), 147:1352; Reichmann et al., *Nature* (1988), 332:323; Junghans et al., *Cancer Res.* (1990), 50:1495. Según se describe en la presente memoria, la invención proporciona anticuerpos que se humanizan de tal manera que la respuesta HAMA se reduce o elimina. Las variantes de estos anticuerpos se pueden obtener adicionalmente utilizando métodos rutinarios conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen adicionalmente más adelante. De acuerdo con el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se escruta frente a toda la biblioteca de secuencias conocidas de dominios variables humanos. La secuencia del dominio V humano que es más cercana a la del roedor se identifica y la región marco humana (FR) dentro de la misma se acepta para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol* 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método utiliza una región marco concreta derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de cadenas ligeras o pesadas. Se puede utilizar el mismo marco para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol* 151: 2623 (1993)).

45 Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo como se describe en la presente memoria puede servir como una secuencia de partida (parental) para la diversificación de las secuencias marco y/o hipervariables. Una secuencia de marco seleccionada a la cual está conectada una secuencia hipervariable de partida es referida en la presente memoria como marco humano aceptor. Si bien los marcos humanos aceptores pueden ser, o derivar, de una inmunoglobulina humana (regiones VL y/o VH de la misma), los marcos humanos aceptores pueden ser, o derivar de, una secuencia marco consenso humana ya que se ha demostrado que tales marcos tienen una inmunogenicidad mínima, o nula, en pacientes humanos. Un "marco humano aceptor" para los fines de la presente memoria es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco VL o VH derivado de un marco de inmunoglobulina humana, o de un marco consenso humano. Un marco humano aceptor "derivado de" un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de los mismos, o puede contener cambios de secuencias de aminoácidos preexistentes. Cuando están presentes cambios de aminoácidos preexistentes, preferiblemente están presentes no más de 5 y preferiblemente 4 o menos, o 3 o menos, cambios de aminoácidos preexistentes. En una realización, el marco humano aceptor de VH es idéntico en secuencia a la secuencia marco VH de inmunoglobulina humana o la secuencia marco consenso humana. En una realización, el marco humano aceptor VL tiene una secuencia idéntica a la secuencia marco VL de inmunoglobulina humana o secuencia marco consenso humana. Un "marco consenso humano" es un marco que representa el residuo de aminoácido que aparece más frecuentemente en una selección de secuencias marco VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominios variables. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.* En una realización, para la VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.* En una

realización, para la VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat et al.

5 Cuando el aceptor deriva de una inmunoglobulina humana, se puede seleccionar opcionalmente una secuencia marco humana que se selecciona basándose en su homología con la secuencia marco donadora mediante la alineamiento de la secuencia de marco donadora con diversas secuencias marco humanas de una colección de secuencias marco humanas, y seleccionar la secuencia marco más homóloga como aceptor. El marco humano aceptor puede ser, o derivar de, secuencias de la línea germinal de anticuerpos humanos disponibles en las bases de datos públicas.

Por ejemplo, los marcos consenso humanos pueden ser, o derivar de, secuencias marco consenso del subgrupo VII de VH y/o de subgrupo I de VL kappa.

10 El molde del marco humano utilizado para la generación de un anticuerpo anti-Factor D de la invención puede comprender secuencias marco de un molde que comprende una combinación de VI-4.1b + (familia VH7) y JH4d para la cadena VH (Figura 3) y/o una combinación de DPK4 (familia Vkl) y JK2 para la cadena VL (Figura 4).

15 Por lo tanto, el marco humano aceptor de VH puede comprender una, dos, tres o todas de las secuencias marco siguientes: FR1 que comprende $QX_1QLVQSGX_2ELKKPGASVKVSCAS$ (aminoácidos 1-25 del SEQ ID NO: 27), en donde X_1 es I o V, X_2 es P o S; FR2 que comprende $WVX_3QAPGQGLE$ (aminoácidos 36-46 del SEQ ID NO: 27), en donde X_3 es K o R; FR3 que comprende $RFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAX_4YYCX_5R$ (aminoácidos 67-98 del SEQ ID NO: 27), en donde X_4 es T o V, X_5 es E o A; FR4 que comprende $WGQGTLTVSS$ (aminoácidos 105-115 del SEQ ID NO: 8 o aminoácidos 105-115 del SEQ ID NO: 27).

Los ejemplos de los marcos de consenso de VH incluyen:

- 20 marco consenso del subgrupo I de VH humano menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO: 28);
- marco consenso del subgrupo I de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 29-31);
- marco consenso del subgrupo II de VH humano menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO: 32);
- marco consenso del subgrupo II de VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 33-35);
- marco consenso del subgrupo III de VH humano menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO: 36);
- 25 marco consenso del subgrupo III de VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 37-39);
- marco consenso del subgrupo VII de VH humano menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO: 55);
- marco consenso del subgrupo VII de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 56-58);
- marco aceptor de VH humano menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO: 40);
- marco aceptor de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 41-42);
- 30 marco aceptor 2 de VH humano menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO: 43); o
- marco aceptor 2 de VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 44-45).

El marco humano aceptor de VH puede comprender una, dos, tres o todas de las siguientes secuencias marco:

- FR1 que comprende $QVQLVQSGPELKKPGASVKVSCAS$ (aminoácidos 1-25 del SEQ ID NO: 8),
- FR2 que comprende $WVRQAPGQGLE$ (aminoácidos 36-46 del SEQ ID NO: 8),
- 35 FR3 que comprende $RFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCER$ (aminoácidos 67-98 del SEQ ID NO: 8),
- $RFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCE$ (aminoácidos 67-97 del SEQ ID NO: 8),
- $RFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC$ (aminoácidos 67-96 del SEQ ID NO: 8),
- $RFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCS$ (SEQ ID NO: 51), o
- $RFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCSR$ (SEQ ID NO: 52)
- 40 FR4 que comprende $WGQGTLTVSS$ (aminoácidos 105-115 del SEQ ID NO: 8 o aminoácidos 105-115 del SEQ ID NO: 27).

El marco humano aceptor de VL puede comprender una, dos, tres o todas de las siguientes secuencias marco:

- FR1 que comprende $DIQX_6TQSPSSLSX_7SVGDRVITIC$ (aminoácidos 1-23 del SEQ ID NO: 26), en donde X_6 es V

o M, X₇ es M o A;

FR2 que comprende WYQQKPGKX₈PKLLIX₉ (aminoácidos 35-49 del SEQ ID NO: 26), en donde X₈ es P o V, X₉ es S o Y;

5 FR3 que comprende GVPSRFSX₁₀SGSGX₁₁DFTLTISSLQPEDVATYYC (aminoácidos 57-88 del SEQ ID NO: 26), en donde X₁₀ es S o G, X₁₁ es A o T;

FR4 que comprende FGQGTX₁₂EIK (SEQ ID NO: 54), en donde X₁₂ es V o L.

Los ejemplos de marcos consenso de VL incluyen:

marco consenso del subgrupo I de VL kappa humano (SEQ ID NO: 47);

marco consenso del subgrupo II de VL kappa humana (SEQ ID NO: 48);

10 marco consenso del subgrupo III de VL kappa humano (SEQ ID NO: 49); o

marco consenso del subgrupo IV de VL kappa humano (SEQ ID NO: 50)

El marco humano aceptor de VL puede comprender una, dos, tres o todas de las siguientes secuencias marco:

FR1 que comprende DIQVTQSPSSLSASVGDRVITIC (aminoácidos 1-23 del SEQ ID NO: 7),

FR2 que comprende WYQQKPGKVPKLLIS (aminoácidos 35-49 del SEQ ID NO: 7),

15 FR3 que comprende GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC (aminoácidos 57-88 del SEQ ID NO: 7),

FR4 que comprende FGQGTX₁₂EIK (aminoácidos 98-107 del SEQ ID NO: 7), o FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 53).

20 Si bien el aceptor puede tener una secuencia idéntica a la secuencia marco humana seleccionada, ya sea ésta de una inmunoglobulina humana o de un marco consenso humano, la secuencia aceptora puede comprender también sustituciones de aminoácidos preexistentes con respecto a la secuencia de inmunoglobulina humana o la secuencia marco consenso humana. Estas sustituciones preexistentes son preferentemente mínimas; normalmente diferencias de cuatro, tres, dos o un aminoácidos solamente con respecto a la secuencia de inmunoglobulina humana o la secuencia marco consenso.

25 Los residuos de la región hipervariable del anticuerpo no humano se incorporan a los marcos humanos aceptores VL y/o VH. Por ejemplo, se pueden incorporar residuos correspondientes a los residuos de las CDR de Kabat, los residuos de los bucles hipervariables de Chothia, los residuos Abm, y/o residuos de contacto. Opcionalmente, se incorporan los residuos de la región hipervariable extendida como sigue:

24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3), 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95 -102 (H3).

Los anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden las siguientes regiones hipervariables (CDR):

30 (i) En un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 5, la CDR 1 se define por el SEQ ID NO: 16, la CRD 2 se define por el SEQ ID NO: 17 y la CDR 3 se define por el SEQ ID NO: 18; y en un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 6, la CDR 1 se define por el SEQ ID NO: 13, la CRD 2 se define por el SEQ ID NO: 14 y la CDR 3 se define por el SEQ ID NO: 15;

35 (ii) En un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7, la CDR 1 se define por el SEQ ID NO: 16, la CRD 2 se define por el SEQ ID NO: 17 y la CDR 3 se define por el SEQ ID NO: 19; y en un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 8, la CDR 1 se define por el SEQ ID NO: 13, la CRD 2 se define por el SEQ ID NO: 14 y la CDR 3 se define por el SEQ ID NO: 20;

40 (iii) En un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 9, la CDR 1 se define por el SEQ ID NO: 16, la CRD 2 se define por el SEQ ID NO: 21 y la CDR 3 se define por el SEQ ID NO: 22; y en un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 10, la CDR 1 se define por el SEQ ID NO: 23, la CRD 2 se define por el SEQ ID NO: 14 y la CDR 3 se define por el SEQ ID NO: 20; y

45 (iv) En un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 11, la CDR 1 se define por el SEQ ID NO: 16, la CRD 2 se define por el SEQ ID NO: 24 y la CDR 3 se define por el SEQ ID NO: 19; y en un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 12, la CDR 1 se define por el SEQ ID NO: 25, la CRD 2 se define por el SEQ ID NO: 14 y la CDR 3 se define por el SEQ ID NO: 20;

También se describe en la presente memoria un anticuerpo que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas entre (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 25; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 14; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el SEQ ID NO: 15 y el SEQ ID NO: 20; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 16; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el SEQ ID NO: 17, el SEQ ID NO: 21 y el SEQ ID NO: 24; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre SECT ID NO: 18, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 19.

También se describe en la presente memoria un anticuerpo anti-Factor D que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas entre (a) una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 34%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 25; (b) una HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 14; (c) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 33%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre los SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 20; (d) una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 16; (e) una HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 24; y (f) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el SEQ ID NO: 18, el SEQ ID NO: 22 y el SEQ ID NO: 19. Una HVR que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% puede contener sustituciones, inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácidos conserva la capacidad para unirse al Factor D. Por ejemplo, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado o suprimido de la secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 24. Adicionalmente se describe en la presente memoria un anticuerpo que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas entre (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el SEQ ID NO: 13 y el SEQ ID NO: 25; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 14; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el SEQ ID NO: 15 y el SEQ ID NO: 20; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 16; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el SEQ ID NO: 17, el SEQ ID NO: 21 y el SEQ ID NO: 24; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el SEQ ID NO: 18, el SEQ ID NO: 22 y el SEQ ID NO: 19.

Se describe en la presente memoria un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada seleccionado del SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 y un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera seleccionado entre el SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 11. Por ejemplo un anticuerpo puede comprender un dominio variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 6 o un dominio variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 5. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 6 y un dominio variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 5. También se describe en la presente memoria un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 8 o un dominio variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 7. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 8 y un dominio variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 7. Adicionalmente se describe en la presente memoria un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 10 o un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 9. En una realización un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 9. Adicionalmente se describe en la presente memoria un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 12 o un dominio variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 11. En una realización un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 12 y un dominio variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 11.

Se describe en la presente memoria un anticuerpo anti-Factor D que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 6, 8, 10 y 12. Una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% puede contener sustituciones, inserciones, o deleciones respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácidos

conserva la capacidad de unirse al Factor D. Por ejemplo, un total de 1 a 10 aminoácidos puede haber sido sustituido, insertado o suprimido en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 6, 8, 10 o 12. Las sustituciones, inserciones o deleciones se pueden producir en regiones fuera de las HVR (es decir, en los FR). Un anticuerpo anti-Factor D puede comprender un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 6, 8, 10 o 12.

También se describe en la presente memoria un anticuerpo anti-Factor D que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 5, 7, 9 y 11. Una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% contiene sustituciones, inserciones, o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácidos conserva la capacidad de unirse al Factor D. Por ejemplo, un total de 1 a 10 aminoácidos puede haber sido sustituido, insertado o eliminado en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 5, 7, 9 y 11. Las sustituciones, inserciones o deleciones se pueden producir en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Un anticuerpo anti-Factor D puede comprender un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 5, 7, 9 y 11.

Un anticuerpo anti-Factor D puede comprender cualquier secuencia de dominio variable marco adecuada, siempre que el anticuerpo conserve la capacidad de unirse al Factor D. Por ejemplo, los anticuerpos anti Factor-D pueden comprender una secuencia marco del dominio variable de cadena pesada que es una combinación de VI.4.1 b + y JH4d (Véase la Figura 3). Alternativamente, los anticuerpos anti-Factor D pueden comprender una secuencia consenso marco de la cadena pesada del subgrupo VII humana. Los anticuerpos anti-D factor de la invención pueden comprender una secuencia marco del dominio variable de cadena pesada que comprende FR1 que comprende los aminoácidos 1-25 del SEQ ID NO: 8, FR2 que comprende los aminoácidos 36-46 del SEQ ID NO: 8, FR3 que comprende los aminoácidos 67 a 98 del SEQ ID NO: 8 y FR4 que comprende los aminoácidos 105-115 del SEQ ID NO: 8. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia del dominio variable de la cadena pesada comprende una o varias sustituciones en la posición 40 y/u 88 (numeración de Kabat). En una realización de estos anticuerpos, la posición 40 es cisteína (C) o alanina (A) y/o la posición 88 es cisteína (C) o alanina (A). Los anticuerpos anti-D factor también pueden comprender una secuencia marco de dominio variable de cadena ligera que es una combinación de DPK4 y JK2 (Véase la Figura 4). Alternativamente, los anticuerpos anti-Factor D pueden comprender una secuencia consenso marco de cadena ligera kappa I (κ) humana. Los anticuerpos anti-Factor D de la invención pueden comprender una secuencia marco del dominio variable de cadena ligera que comprende FR1 que comprende los aminoácidos 1-23 del SEQ ID NO: 7, FR2 que comprende los aminoácidos 35-49 del SEQ ID NO: 7, FR3 que comprende los aminoácidos 57-88 del SEQ ID NO: 7 y FR4 que comprende los aminoácidos 98-107 del SEQ ID NO: 7. En algunos de estos anticuerpos, la secuencia de marco variable de cadena ligera comprende una o más sustituciones en la posición 15, 43 y/o 104 (numeración de Kabat). En algunos de estos anticuerpos, la posición 15 es cisteína (C) o valina (V), la posición 43 es cisteína (C) o alanina (A) y/o la posición 104 es valina (V) o leucina (L).

Adicionalmente, un anticuerpo anti-Factor D de la invención puede comprender cualquier secuencia del dominio constante adecuada, siempre que el anticuerpo conserve la capacidad de unirse al Factor D. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden al menos una porción de un dominio constante de cadena pesada. En una realización, los anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden un dominio constante de cadena pesada de una cualquiera o una combinación de una cadena pesada α , δ , ϵ , γ , o μ . Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, que tienen cadenas pesadas denominadas α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen adicionalmente en subclases basándose en diferencias relativamente minoritarias en secuencia y función de C_H , p. ej., los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. En una realización, los anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden un dominio constante de la cadena pesada que comprende sustituciones en las posiciones de aminoácidos que dan como resultado un efecto deseado sobre la función efectora (p. ej. afinidad de unión). En una realización, los anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden un dominio constante de la cadena pesada que comprende sustituciones en las posiciones de aminoácidos que no dan como resultado un efecto sobre la función efectora (p. ej., afinidad de unión). En una realización, los anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden un dominio constante de la cadena pesada de tipo IgG (p. ej. IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) y comprenden adicionalmente una sustitución en la posición 114 (numeración de Kabat; equivalente a 118 en la numeración EU), 168 (numeración de Kabat; equivalente a 172 en la numeración EU), 172 (numeración de Kabat; equivalente a 176 en la numeración EU) y/o 228 (numeración EU). En una realización, los anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden un dominio constante de cadena pesada del tipo IgG (p. ej. IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) y comprenden adicionalmente una sustitución en la posición 114 en donde la posición 114 es cisteína (C) o alanina (A), la posición 168 es cisteína (C) o alanina (A), la posición 172 es cisteína (C) o alanina (A) y/o la posición 228 es una prolina (P), arginina (R) o serina (S).

Adicionalmente, por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden al menos una porción de un dominio constante de la cadena ligera. En una realización, los anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden un dominio constante de cadena ligera de una cualquiera o una combinación de una

cadena ligera kappa o lambda, ya que la cadena ligera de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. En una realización, los anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden un dominio constante de la cadena ligera que comprende sustituciones en las posiciones de aminoácidos que dan como resultado un efecto deseado sobre la función efectora (p. ej., afinidad de unión). En una realización, los anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden un dominio constante de la cadena ligera que comprende sustituciones en las posiciones de aminoácidos que no dan como resultado un efecto sobre la función efectora (p. ej., afinidad de unión). En una realización, los anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden un dominio constante de la cadena ligera de tipo kappa y comprenden adicionalmente una sustitución en la posición 110, 144, 146 y/o 168 (numeración de Kabat). En una realización, los anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden un dominio constante de cadena ligera de tipo kappa y comprenden adicionalmente una sustitución en la posición 110 en donde 110 es cisteína (C) o valina (V), en la posición 144 en donde 144 es cisteína (C) o alanina (A), en la posición 146 en donde 146 es isoleucina (I) o valina (V) y/o en la posición 168 en donde 168 es cisteína (C) o serina (S).

También se describen en la presente memoria anticuerpos que compiten con el anticuerpo murino 166-32 y/o el clon del anticuerpo anti-Factor D humanizado Núm. 56, Núm. 111, Núm. 250 o Núm. 416, y/o un anticuerpo que comprende secuencias de dominio variable o HVR de un clon del anticuerpo anti-Factor D humanizado Núm. 56, Núm. 111, Núm. 250 o Núm. 416. También se proporcionan anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo murino 166-32 y/o el clon del anticuerpo anti-Factor D humanizado Núm. 56, Núm. 111, Núm. 250 o Núm. 416, y/o un anticuerpo que comprende secuencias del dominio variable o HVR del clon del anticuerpo anti-Factor D humanizado Núm. 56, Núm. 111, Núm. 250 o Núm. 416.

Se describe en la presente memoria un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad monovalente del anticuerpo para el Factor D (p. ej., afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab para el Factor D) es menor, por ejemplo al menos 1 vez o 2 veces menor que la afinidad monovalente de un anticuerpo quimérico (p. ej., la afinidad del anticuerpo quimérico como un fragmento Fab a Factor D), que comprende, consiste o consiste esencialmente en un dominio variable de cadena ligera del SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena pesada del SEQ ID NO: 1.

Adicionalmente se describe en la presente memoria un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad bivalente del anticuerpo para el Factor D (p. ej., afinidad del anticuerpo como una IgG para el Factor D) es menor, por ejemplo al menos 1 vez o 2 veces menor que la afinidad bivalente de un anticuerpo quimérico (p. ej., afinidad del anticuerpo quimérico como una IgG para el Factor D), que comprende, consiste o consiste esencialmente en un dominio variable de cadena ligera del SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena pesada del SEQ ID NO: 1.

También se describe en la presente memoria un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad monovalente del anticuerpo para el Factor D (p. ej., afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab para el Factor D) es mayor, por ejemplo al menos 1 vez o 2 veces mayor que la afinidad monovalente de un anticuerpo quimérico (p. ej., afinidad del anticuerpo quimérico como un fragmento Fab para el Factor D), que comprende, consiste o consiste esencialmente en un dominio variable de cadena ligera del SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena pesada del SEQ ID NO: 1.

Se describe en la presente memoria un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad bivalente del anticuerpo para el Factor D (p. ej., afinidad del anticuerpo como una IgG para el Factor D) es mayor, por ejemplo al menos 1 vez o 2 veces mayor que la afinidad bivalente de un anticuerpo quimérico (p. ej., afinidad del anticuerpo quimérico como una IgG para el Factor D), que comprende, consiste o consiste esencialmente en un dominio variable de cadena ligera del SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena pesada del SEQ ID NO: 1.

La afinidad del anticuerpo anti-Factor D de la invención en su forma monovalente para el Factor D (p. ej., afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab para el Factor D) puede ser 1,0 nM ($1,0 \times 10^{-9}$ M) o mejor. La afinidad del anticuerpo en su forma monovalente para el Factor D (p. ej., afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab para el Factor D) puede ser 0,5 nM ($0,5 \times 10^{-9}$ M) o mejor. La afinidad del anticuerpo en su forma monovalente para el Factor D (p. ej., afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab para el Factor D) puede ser 1,0 pM ($1,0 \times 10^{-12}$ M) o mejor. La afinidad del anticuerpo en su forma monovalente para el Factor D (p. ej., afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab para el Factor D) puede ser 0,5 pM ($0,5 \times 10^{-12}$ M) o mejor.

La afinidad del anticuerpo de la invención en su forma bivalente para el Factor D (p. ej., afinidad del anticuerpo como una IgG para el Factor D) puede ser 1,0 nM ($1,0 \times 10^{-9}$ M) o mejor. Adicionalmente la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente para el Factor D (p. ej., afinidad del anticuerpo como una IgG para el Factor D) puede ser 0,5 nM ($0,5 \times 10^{-9}$ M) o mejor. Adicionalmente la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente para el Factor D (p. ej., afinidad del anticuerpo como una IgG para el Factor D) puede ser 1,0 pM ($1,0 \times 10^{-12}$ M) o mejor. La afinidad del anticuerpo en su forma bivalente para el Factor D (p. ej., afinidad del anticuerpo como una IgG para el Factor D) puede ser 0,5 pM ($0,5 \times 10^{-12}$ M) o mejor.

La afinidad del anticuerpo anti-Factor D de la invención en su forma monovalente para el Factor D (p. ej., afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab para el Factor D) puede estar entre 0,5 mM ($0,5 \times 10^{-6}$ M) y 0,5 pM ($0,5 \times 10^{-12}$ M). La afinidad del anticuerpo en su forma monovalente para el Factor D (p. ej., afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab para el Factor D) puede estar entre 15 nM (15×10^{-9} M) y 0,1 nM ($0,1 \times 10^{-9}$ M). La afinidad del anticuerpo en su forma monovalente para el Factor D (p. ej., afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab para el

Como está establecido en la técnica, la afinidad de unión de un ligando a su receptor se puede determinar utilizando cualquiera de una variedad de análisis, y se puede expresar en términos de una variedad de valores cuantitativos. Por consiguiente, la afinidad de unión se puede expresar como valores de K_d y refleja la afinidad de unión intrínseca (p. ej., con efectos de avidéz minimizados). En general y preferiblemente, la afinidad de unión se mide *in vitro*, ya sea en un entorno libre de células o asociado a células. Como se describe en mayor detalle en la presente memoria, la diferencia de veces en la afinidad de unión se puede cuantificar en términos de la razón del valor de afinidad de unión monovalente de un anticuerpo humanizado (p. ej., en forma de Fab) y el valor de afinidad de unión monovalente de un anticuerpo de referencia/comparador (p. ej., en forma Fab) (p. ej., un anticuerpo murino que tiene secuencias de la región hipervariable donadoras), en donde los valores de la afinidad de unión se determinan en condiciones de análisis similares. Por lo tanto, por ejemplo, la diferencia de veces en la afinidad de unión se puede determinar como la razón de los valores de K_d del anticuerpo humanizado en forma de Fab y dicho anticuerpo Fab de referencia/comparador. Por ejemplo, si un anticuerpo (A) tiene una afinidad que es "3 veces menor" que la afinidad de un anticuerpo de referencia (M), si el valor de K_d para A es $3x$, el valor de K_d de M sería $1x$, y la razón de K_d de A con respecto a K_d de M sería 3:1. Por el contrario, si un anticuerpo (C) tiene una afinidad que es "3 veces mayor" que la afinidad de un anticuerpo de referencia (R), si el valor de K_d para C es $1x$, el valor de K_d para R sería $3x$, y la razón de K_d de C con respecto a K_d de R sería 1:3. Se puede utilizar cualquiera de diversos análisis conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en la presente memoria, para obtener mediciones de la afinidad de unión, incluyendo, por ejemplo, Biacore, radioinmunoanálisis (RIA) y ELISA.

Adicionalmente, los valores de K_d para un anticuerpo pueden variar dependiendo de las condiciones del análisis concreto utilizado. Por ejemplo, las mediciones de la afinidad de unión se pueden obtener en un análisis en donde el Fab o el anticuerpo están inmovilizados y se mide la unión del ligando, es decir, el Factor D, o alternativamente, el ligando, es decir, el Factor D, para el Fab o el anticuerpo está inmovilizados y se mide la unión del Fab o el anticuerpo. Las mediciones de la afinidad de unión también se pueden obtener en un análisis en donde las condiciones de regeneración pueden comprender (1) glicina 10 mM o $MgCl_2$ 4M a pH 1,5, y (2) pH entre un pH de 1,0 y un pH de 7,5, incluyendo un pH de 1,5, un pH de 5,0, un pH de 6,0 y un pH de 7,2. En una realización, las mediciones de la afinidad de unión se pueden obtener en un análisis en donde las condiciones de unión pueden comprender (1) PBS o solución salina tamponada con HEPES y (2) Tween-20, es decir, Tween 20 al 0,1%. En una realización, las mediciones de la afinidad de unión se pueden obtener en un análisis en donde la fuente del ligando, es decir, el Factor D, puede ser de fuentes disponibles comercialmente. En una realización, las mediciones de la afinidad de unión se pueden obtener en un análisis en donde (1) el Fab o el anticuerpo se inmovilizan y se mide la unión del ligando, es decir, el Factor D, (2) las condiciones de regeneración comprenden $MgCl_2$ 4M a pH 7,2 y (3) las condiciones de unión comprenden solución salina tamponada con HEPES, pH 7,2 que contiene Tween 20 al 0,1%. En una realización, las mediciones de afinidad de unión se pueden obtener en un análisis en donde (1) el ligando, es decir, el Factor D, está inmovilizado y se mide la unión de Fab o anticuerpo, (2) las condiciones de regeneración comprenden glicina 10 mM a pH 1,5 y (3) las condiciones de unión comprenden tampón PBS.

Los términos "célula", "línea celular" y "cultivo celular" incluyen la progenie. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluyen las progenies variantes que tienen la misma función o propiedad biológica, escrutadas en la célula transformada originalmente. Las "células anfitrionas" utilizadas en la presente invención son generalmente anfitriones procariotas o eucariotas.

El término "vector" representa un constructo de ADN que contiene una secuencia de ADN que está conectada operablemente a una secuencia de control adecuada capaz de efectuar la expresión del ADN en un anfitrión adecuado. Tales secuencias de control incluyen un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar tal transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión del ARNm al ribosoma adecuados, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago, o simplemente un inserto genómico potencial. Una vez transformado en un anfitrión adecuado, el vector puede replicarse y funcionar independientemente del genoma anfitrión, o puede, en algunos casos, integrarse en el propio genoma. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se utilizan a veces indistintamente, ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, se pretende que la invención incluya otras formas de vectores que cumplen funciones equivalentes y que son, o puedan llegar a ser conocidos en la técnica.

La palabra "marca" cuando se utiliza en la presente memoria se refiere a un compuesto o composición detectables que se pueden conjugar directamente o indirectamente a una molécula o proteína, p. ej., un anticuerpo. La marca puede ser detectable por sí misma (p. ej., marcas de radioisótopos o marcas fluorescentes) detectables o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

Según se utiliza en la presente memoria, "fase sólida" representa una matriz no acuosa a la cual se puede adherir un anticuerpo. Los ejemplo de fases sólidas incluidas en la presente memoria incluyen aquella formadas parcial o enteramente de vidrio (p. ej., vidrio de poro controlado), polisacáridos (p. ej., agarosa), poli(acrilamidas, poliestireno, poli(alcohol vinílico) y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de análisis; en otras es una columna de purificación (p. ej., una columna de cromatografía de afinidad).

Generación de anticuerpos

Selección y transformación de células anfitrionas

Las células anfitrionas adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente memoria son células procarióticas, de levadura o eucarióticas superiores. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen organismos tanto Gram-negativos como Gram-positivos, por ejemplo, enterobacterias tales como *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, y *Shigella*, así como Bacilos, *Pseudomonas*, y *Streptomyces*. Un anfitrión de clonación en *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27325). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Además de los procariotas, los microbios eucarióticos tales como los hongos filamentosos o las levaduras son anfitriones de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae* es el más comúnmente utilizado entre los microorganismos anfitriones eucarióticos inferiores. Sin embargo, otros varios géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en la presente memoria, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*; *Candida*; *Trichoderma*; *Neurospora crassa*; y hongos filamentosos tales como, p. ej., anfitriones *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células anfitrionas adecuadas para la expresión de anticuerpos glicosilados derivan de organismos multicelulares. En principio, cualquier cultivo de células eucariotas superiores es factible, ya sea cultivo de vertebrados o invertebrados. Los ejemplos de las células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos, Luckow et al., *Bio/Technology* 6, 47-55 (1988); Miller et al., *Genetic Engineering*, Setlow et al. comps. Vol. 8, págs. 277-279 (Plenum Publishing 1986); Mveda et al., *Nature* 315, 592-594 (1985). Se han identificado numerosas cepas de baculovirus y variantes y las correspondientes células anfitrionas de insectos permisivas de anfitriones tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Está públicamente disponible una variedad de cepas virales para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus se pueden utilizar en la presente memoria como virus de acuerdo con la presente invención, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Por otra parte, los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco, también se pueden utilizar como anfitriones.

Las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados, en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Véase *Tissue Culture*, Academic Press, Kruse y Patterson, eds. (1973). Los ejemplos de las líneas celulares anfitrionas de mamíferos útiles son riñón de mono; línea de riñón embrionario humano; células de riñón cría de hámster; células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón; células de carcinoma de cuello uterino humano (HeLa); células de riñón canino; células de pulmón humano; células de hígado humano; tumor mamario de ratón; y células NS0.

Las células anfitrionas se transforman con los vectores descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células anfitrionas utilizadas para producir la variante de anticuerpo de esta invención se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma) son adecuados para el cultivo de células anfitrionas. Además, cualquiera de los medios descritos por Ham et al., *Meth. Enzymol.* 58: 44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.767.704; 4.657.866; 4.560.655; 5.122.469; 5.712.163; o 6.048.728 se puede utilizar como medio de cultivo para las células anfitrionas. A cualquiera de estos medios se le puede añadir según sea necesario un suplemento de hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como X-cloruros, en donde X es sodio, calcio, magnesio; y fosfatos), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMICINATM), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH, y similares, son las utilizadas previamente con la célula anfitriona seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto normal en la técnica.

Purificación de anticuerpos

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretar directamente al medio. Si la variante de anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, los desechos particulados, ya sea células anfitrionas o fragmentos lisados, se puede eliminar, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, la pasta

celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los desechos celulares se puede eliminar mediante centrifugación. Cuando la variante de anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se concentran generalmente primero utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una
 5 unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la técnica de
 10 purificación preferida la cromatografía de afinidad. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en la variante de anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas4 de IgG1, IgG2 o IgG4 humanas (Lindmark et al., J. Immunol Meth 62: 1-13 (1983)). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para la IgG3 humana (Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de
 15 afinidad es frecuentemente agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden ser alcanzados con la agarosa. Cuando la variante de anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en Sepharose™-heparina sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato amónico también están disponibles en
 20 función de la variante de anticuerpo que se vaya a recuperar.

Después de cualquiera de las etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende la variante de anticuerpo de interés y los contaminantes se puede someter a una cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferiblemente realizada a bajas concentraciones de sal (p. ej., una concentración de sal de aproximadamente 0-0,25 M).
 25

Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas del polipéptido o anticuerpo se pueden preparar para su almacenamiento en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas mezclando el polipéptido que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores "farmacéuticamente aceptables" opcionales típicamente empleados en la técnica (todos los cuales son denominados "excipientes"). Por ejemplo, agentes tamponadores, agentes estabilizantes, conservantes, agentes para conferir isotonicidad, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros aditivos diversos. (Véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, A. Osol, de Ed. (1980)). Tales aditivos
 30 deben ser no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas.
 35

Los agentes tamponadores ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Están presentes preferiblemente a una concentración que varía de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Los agentes tamponadores adecuados para uso con la presente invención incluyen ácidos tanto orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos tales como tampones de citrato (p. ej., mezcla de citrato monosódico-citrato disódico, mezcla de ácido cítrico-citrato trisódico, mezcla de ácido cítrico-citrato monosódico, etc.), tampones de succinato (p. ej., mezcla de ácido succínico-succinato monosódico, mezcla de ácido succínico-hidróxido sódico, mezcla de ácido succínico-succinato disódico, etc.), tampones de tartrato (p. ej., mezcla de ácido tartárico-tartrato sódico, mezcla de ácido tartárico-tartrato potásico, mezcla de ácido tartárico-hidróxido sódico, etc.), tampones de fumarato (p. ej., mezcla de ácido fumárico-fumarato monosódico, etc.), tampones de fumarato (p. ej., mezcla de ácido fumárico-fumarato monosódico, mezcla de ácido fumárico-fumarato disódico, mezcla fumarato monosódico-fumarato disódico, etc.), tampones de gluconato (p. ej., mezcla de ácido glucónico-gluconato sódico, mezcla de ácido glucónico-hidróxido sódico, mezcla de ácido glucónico-gluconato potásico, etc.), tampón de oxalato (p. ej., mezcla de ácido oxálico-oxalato sódico, ácido oxálico-hidróxido sódico, mezcla de ácido oxálico-oxalato potásico, etc.), tampones de lactato (p. ej., mezcla de ácido láctico-lactato sódico, mezcla de ácido láctico-hidróxido sódico, mezcla de ácido láctico-lactato potásico, etc.) y tampones de acetato (p. ej., mezcla de ácido acético-acetato sódico, mezcla de ácido acético-hidróxido sódico, etc.). Adicionalmente, se pueden citar los tampones de fosfato, tampones de histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.
 40
 45
 50

Se pueden añadir conservantes para retrasar el crecimiento microbiano, y se pueden añadir en cantidades que oscilan de 0,2% a 1% (p/v). Los conservantes adecuados para uso con la presente invención incluyen fenol, alcohol bencílico, meta-cresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, haluros de benzalconio (p. ej., cloruro, bromuro, yoduro), cloruro de hexametonio, alquilparabenos tales como metil- o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol.
 55

Los agentes para conferir isotonicidad a veces conocidos como "estabilizadores" se pueden añadir para asegurar la isotonicidad de las composiciones líquidas de la presente invención e incluyen alcoholes de azúcares polihidroxilados, preferiblemente alcoholes de azúcares trihidroxilados o superiores, tales como glicerina, eritritol,
 60

arabitol, xilitol, sorbitol y manitol.

Los estabilizadores se refieren a una amplia categoría de excipientes que pueden cuya función puede variar de un agente de carga a un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a prevenir la desnaturalización o la adherencia a la pared del recipiente. Los estabilizadores típicos pueden ser alcoholes de azúcares polihidroxilados (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares orgánicos o alcoholes de azúcares, tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinositol, galactitol, glicerol y similares, incluyendo ciclitoles, tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, alfa-monotioglicerol y tiosulfato de sodio; polipéptidos de bajo peso molecular (es decir, <10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona, monosacáridos tales como xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa y trisacáridos tales como rafinosa; polisacáridos tales como dextrano. Los estabilizadores pueden estar presentes en el intervalo de 0,1 a 10.000 partes en peso por parte en peso de la proteína activa.

Se pueden añadir tensioactivos no iónicos o detergentes (también conocidos como "agentes humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico así como para proteger la proteína terapéutica contra la agregación inducida por agitación, lo que también permite que la formulación se exponga a esfuerzo de cizallamiento superficial sin causar la desnaturalización de la proteína. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), polioxámeros (184, 188, etc.), polioles Pluronic[®], monoéteres de polioxietilensorbitán (Tween[®]-20, Tween[®]-80, etc.). Los tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

Los excipientes diversos adicionales incluyen agentes de carga (p. ej., almidón), agentes quelantes (por ejemplo EDTA), antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico, metionina, vitamina E) y co-disolventes. La formulación de la presente memoria también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación concreta que se está tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar adicionalmente un agente inmunosupresor. Tales moléculas están presentes combinadas adecuadamente en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido. Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a edición, A. Osal, Ed. (1980).

Las formulaciones que se van a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la variante de anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de Estados Unidos. Núm. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT[™] (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Si bien los polímeros tales como acetato de etileno-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el organismo durante un tiempo prolongado, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37°C dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de ensalces S - S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, se puede lograr la estabilización modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

La cantidad de polipéptido terapéutico, anticuerpo o fragmento del mismo que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección concretos dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Cuando sea posible, es deseable determinar la curva de dosis-respuesta y las composiciones farmacéuticas de la invención primero in vitro, y a continuación en sistemas de modelos animales útiles antes de probarlas en seres humanos.

En una realización preferida, se administra una solución acuosa de polipéptido terapéutico, anticuerpo o fragmento del mismo mediante inyección subcutánea. Cada dosis puede variar de aproximadamente 0,5 µg a aproximadamente 50 µg por kilogramo de peso corporal, o más preferiblemente, de aproximadamente 3 µg a aproximadamente 30 µg por kilogramo de peso corporal.

El programa de dosificación para la administración subcutánea puede variar de una vez al mes a diariamente dependiendo de varios factores clínicos, incluyendo el tipo de enfermedad, la gravedad de la enfermedad, y la sensibilidad del sujeto al agente terapéutico.

Usos para el anticuerpo humanizado

5 Los anticuerpos humanizados descritos en la presente memoria son útiles en análisis de diagnóstico, p. ej., para detectar la expresión de una diana de interés en células, tejido, o suero específicos. Para las aplicaciones de diagnóstico, la variante de anticuerpo se marcará típicamente con un radical detectable. Se encuentran disponibles numerosas marcas. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se han descrito anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente por medio de una reacción química y a continuación puede emitir luz que se puede medir (utilizando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcas enzimáticas incluyen luciferasas (p. ej., luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de Estados Unidos. Núm. 4.737.456), Luciferina, 2,3-dihidroftalazínodionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacarido oxidasas (p. ej., glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay, en Methods in Enzym. (Ed. J. Langone y H. Van Vunakis), Academic press, Nueva York, 73: 147-166 (1981).

20 Algunas veces, la marca se conjuga indirectamente con la variante de anticuerpo. El experto en la técnica será consciente de diversos mecanismos para lograr esto. Por ejemplo, la variante de anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de marcas mencionadas anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y por lo tanto, la marca se puede conjugar con la variante de anticuerpo de esta manera indirecta. Alternativamente, para conseguir la conjugación indirecta de la marca con la variante de anticuerpo, la variante de anticuerpo se conjuga con un pequeño hapteno (por ejemplo digloxina) y uno de los diferentes tipos de marcas mencionadas anteriormente se conjuga con una variante de anticuerpo anti-hapteno (p. ej., anticuerpo anti-digloxina). Por lo tanto, se puede lograr la conjugación indirecta del marcador con la variante de anticuerpo.

Alternativamente, la variante de anticuerpo no necesita estar marcada, y la presencia de la misma se puede detectar utilizando un anticuerpo marcado que se une a la variante de anticuerpo.

30 Los anticuerpos descritos y reivindicados en la presente memoria se pueden emplear en cualquier método de análisis conocido, tal como análisis de unión competitiva, análisis sándwich directos e indirectos, y análisis de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, págs. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Los análisis de unión competitiva se basan en la capacidad de un patrón marcado para competir con la muestra de ensayo por la unión a una cantidad limitada de variante de anticuerpo. La cantidad de diana en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos generalmente se insolubilizan antes o después de la competición. Como resultado, el patrón y la muestra de ensayo que se unen a los anticuerpos se pueden separar convenientemente del patrón estándar y la muestra de ensayo que permanecen sin unir.

40 Los análisis sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una porción inmunogénica diferente, o epítipo, o a la proteína que se va a detectar. En un análisis sándwich, la muestra de ensayo que se va a analizar se une a un primer anticuerpo que está inmovilizado sobre un soporte sólido, y después de eso un segundo anticuerpo se une a la muestra de ensayo, formando de ese modo un complejo de tres partes insoluble. Véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar marcado a su vez con un radical detectable (análisis sándwich directos) o se puede medir utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con un radical detectable (análisis sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de análisis sándwich es un análisis ELISA, en cuyo caso el radical detectable es una enzima.

Para la inmunohistoquímica, la muestra de tumor puede ser fresca o congelada o puede estar incluida en parafina y fijada con un conservante tal como formalina, por ejemplo.

50 Los anticuerpos también se pueden utilizar para análisis de diagnóstico in vivo. Generalmente, la variante de anticuerpo está marcada con un radionucleótido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de modo que el tumor puede localizarse utilizando inmunoescintigrafía. Por ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo anti-IgE de alta afinidad para detectar la cantidad de IgE presente en, por ejemplo, los pulmones de un paciente asmático.

El anticuerpo de la presente invención se puede proporcionar en un kit, es decir, una combinación de reactivos envasada en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el análisis de diagnóstico. Cuando la variante de anticuerpo está marcada con una enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima (p. ej., un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectables). Además, se pueden incluir otros aditivos, tales como estabilizadores, tampones (p. ej., un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variar ampliamente para proporcionar

concentraciones en solución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del análisis. Concretamente, los reactivos se pueden proporcionar en forma de polvos secos, generalmente liofilizados, incluyendo excipientes que en disolución proporcionarán una solución de reactivo que tenga la concentración apropiada.

5 Usos in vivo para el anticuerpo

Se contempla que los anticuerpos de la presente invención se puedan utilizar para tratar un mamífero. El anticuerpo se puede administrar a un mamífero no humano con el fin de obtener datos preclínicos, por ejemplo. Los mamíferos no humanos ilustrativos que se van a tratar incluyen primates no humanos, perros, gatos, roedores y otros mamíferos en los que se realizan estudios preclínicos. Tales mamíferos pueden ser modelos animales establecidos para una enfermedad que se va a tratar con el anticuerpo o se pueden utilizar para estudiar la toxicidad del anticuerpo de interés. En cada una de estas realizaciones, se pueden realizar estudios de las escalas de dosis en el mamífero.

El anticuerpo o polipéptido se administran mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para el tratamiento inmunosupresor local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Además, la variante de anticuerpo se administra de forma adecuada mediante infusión de pulsos, concretamente con dosis decrecientes de la variante de anticuerpo. Preferiblemente, la dosificación se administran mediante inyecciones, más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada del anticuerpo o polipéptido dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, de la gravedad y curso de la enfermedad, de si la variante de anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, del historial clínico del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y de la discreción del médico a cargo.

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 0,1 mg/kg a 150 mg/kg (p. ej., 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, ya sea mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar de aproximadamente 1 mg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y análisis convencionales. Un régimen de dosificación ilustrativo se describe en el documento WO 94/04188 .

Las composiciones de anticuerpos se pueden formular, dosificar y administrar de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno concreto que se esté tratando, el mamífero concreto que se esté tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo que se va a administrar se registrará por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar, o tratar una enfermedad o trastorno. El anticuerpo se formula opcionalmente, aunque no es necesario, con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores comentados más arriba. Estos se utilizan generalmente a las mismas dosificaciones y con las rutas de administración utilizadas aquí anteriormente o aproximadamente de 1 a 99% de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

Los anticuerpos de la presente invención que reconocen el Factor D como su diana se pueden utilizar para tratar trastornos mediados por el complemento. Estos trastornos están asociados con la activación del complemento excesiva o incontrolada. Estos incluyen: activación del complemento durante las operaciones de bypass cardiopulmonar; la activación del complemento por isquemia-reperusión después de un infarto de miocardio agudo, aneurisma, derrame cerebral, choque hemorrágico, lesión por aplastamiento, fallo multiorgánico, choque hipovolémico e isquemia intestinal. Estos trastornos también pueden incluir enfermedades o afecciones tales como afecciones inflamatorias, quemaduras graves, endotoxemia, choque séptico, síndrome de dificultad respiratoria en el adulto, hemodiálisis; choque anafiláctico, asma grave, angioedema, enfermedad de Crohn, anemia de células falciformes, glomerulonefritis postestreptocócica y pancreatitis. El trastorno puede ser el resultado de una reacción adversa a un medicamento, alergia a medicamentos, síndrome de fuga vascular inducido por IL-2 o alergia media de contraste radiográfico. También incluye enfermedades autoinmunitarias tales como lupus eritematoso generalizado, miastenia grave, artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple. La activación del complemento también está asociada con el rechazo de trasplantes. Recientemente ha habido una fuerte correlación demostrada entre la activación del complemento y enfermedades oculares tales como la degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplo 1: Humanización de MAb murino para Factor D 166-32

5 Las secuencias de la región de cadena pesada variable (V_H) y de la región variable de cadena ligera (V_L) del MAb 166 a 32 murino se compararon con las secuencias de la línea germinal del anticuerpo humano disponibles en las bases de datos públicas. Se utilizaron varios criterios a la hora de decidir sobre un molde como se describe en la etapa 1 anterior, incluyendo la longitud total, la posición de la CDR similar dentro del marco, la homología general, el tamaño de la CDR, etc. Todos estos criterios tomados en conjunto proporcionaron un resultado por elegir el molde humana óptimo como se muestra en el alineamiento de secuencia entre las secuencias de cadena pesada y ligera del MAb 166-32 y las respectivas secuencias del molde humano representadas en las Figuras 3 y 4.

En este caso, se utilizó más de un molde de marco humano para diseñar este anticuerpo. El molde humano elegido para la cadena V_H fue una combinación de VI-4.1b + (locus 7-04.1) (Núm. de acceso X62110) (familia VH7) y JH4d (Véase la Figura 3). El molde humano seleccionado para la cadena V_L fue una combinación de DPK4 (familia VK I) combinado con JK2 (Véase la Figura 4).

15 Una vez que se hubo seleccionado el molde, se construyó una biblioteca de Fab mediante síntesis de ADN y PCR solapante. La biblioteca estaba compuesta de las CDR del MAb 166-32 sintetizadas con los respectivos moldes humanos seleccionados. Los nucleótidos solapantes que codificaban las secuencias V_H y V_L parciales se sintetizaron en el intervalo de aproximadamente 63 a aproximadamente 76 nucleótidos con solapamientos de 18 a 21 nucleótidos. Los vectores que expresaban una biblioteca de Fab humanizados contra el antígeno Factor D se construyeron, y se transformaron en *E. coli* DH10B, a continuación se cultivaron en placa sobre césped bacteriano XL-1B.

20 La calidad de la biblioteca se evaluó para determinar el tamaño (el número de clones independientes) y la diversidad (la distribución de las mutaciones). Los clones individuales con doble inserción de cadena tanto ligera como pesada fueron aproximadamente 14 de los 20 secuenciados. Las mutaciones por titubeo "wobble" del marco se distribuyeron uniformemente.

La amplificación mediante PCR del gen V_L y V_H se realizó utilizando un cebador directo biotinilado que contenía la secuencia específica para la región marco FR1 y una secuencia saliente hibridada con el extremo de la secuencia líder (gen III) y un cebador inverso de la región constante conservada (Ck o CH1) en condiciones de PCR convencionales. El producto de la PCR se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa, o por medio de un kit comercial de purificación de PCR para eliminar los cebadores biotinilados no incorporados y una PCR no específica.

Ejemplo 2: Escrutinio de la Biblioteca

Se utilizó Capture Filter Lift para el escrutinio primario. El tamaño del escrutinio real es más de 3 veces más grande que el tamaño de la biblioteca teórica. Los candidatos se escrutaron adicionalmente mediante análisis ELISA de un solo punto. Los mejores aglutinantes se confirmaron adicionalmente mediante titulación directa del antígeno utilizando Factor D basado en la concentración de Fab.

Escrutinio Levantamiento por Captura "Capture Lift"

Se utilizó Capture Filter Lift Assay para el escrutinio primario para determinar la unión de Fab al Factor D. Se cultivó un alto título de fagos y se incubó a 37°C hasta su uso (aproximadamente 6-8 horas). Se diluyó anti-kappa humana de cabra hasta 10 µg/ml en 10 ml de PBST; Los filtros de nitrocelulosa para levantar las placas se prepararon de acuerdo con los procedimientos de levantamiento de placas convencionales y a continuación se sumergieron en 10 ml de tampón de bloqueo durante 2 hrs en un agitador. Los filtros se enjuagaron 3 veces con PBST. Los filtros se aplicaron a un césped de placa y se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 15-24 horas. Los filtros se retiraron a continuación de las placas y se lavaron con TBST 3x.

45 El Factor D (50 µg/ml) se diluyó en PBST a 0,1 µg/ml y se añadieron 4 ml por filtro. Los filtros se incubaron en la disolución durante 2 horas en un agitador a temperatura ambiente seguido de enjuagado 3x, 5 minutos cada vez. Se añadió 166-222-HRP diluido (1:10.000 con PBST) a un volumen de 4 ml por filtro y los filtros se incubaron durante 1 hr en un agitador. Los filtros se enjuagaron 4x. Los filtros se secaron y a continuación se sumergieron en sustrato TMB seguido de inmersión en agua para detener la reacción. Se identificaron los clones positivos.

Ejemplo 3: Escrutinio ELISA de un solo punto

50 Se utilizó un análisis ELISA de un solo punto para el escrutinio secundario. Placas Immulon II se recubrieron con anti-Fab humano de cabra (1:12.000, 50 µl/pocillo) durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, las placas se lavaron 4x con un lavador de placas. Se añadió tampón de bloqueo a un volumen de 100 µl por pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron a continuación 4x.

Cada Fab a escrutar se añadió a un volumen de 50 µl por pocillo (ya sea a partir de 15 ml de preparación

5 periplásmica o de sobrenadante) y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4x seguido de la adición de 50 µl/pocillo de factor D biotinilado a 0,01 µg/ml. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se lavaron 4x. Se añadió Estreptavidina-HRP (1:10.000 en PBST) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 5x y a continuación se revelaron mediante la adición de sustrato TMB a 50 µl/pocillo. Se añadió tampón de parada a un volumen de 50 µl cuando estuvieron bien reveladas (10-45 min) y las placas se leyeron a 450 nm.

Ejemplo 4: Secuenciación de los clones de anti-Factor D humanizados

10 Se secuenciaron dieciséis clones humanizados con buena afinidad de unión por el factor D humano (véase la Tabla 1). Entre estos, la posición 2 (100% humano) y 49 (100% de ratón) en la cadena ligera, y la posición 93 (100% de ratón) en la cadena pesada están altamente conservadas lo que indica que son importantes en el mantenimiento de la capacidad de unión del anticuerpo.

Tabla 1. Análisis de la secuencia de aminoácidos de clones humanizados de la biblioteca de humanización

VK	2	4	13	43	49	64	69	VH	2	9	38	93	97
Ratón	T	V	M	P	S	S	A		I	P	K	T	E
Humano	I	M	A	V	Y	G	T		V	S	R	V	A
7	I	M	M	V	S	S	T		I	P	K	V	E
30	I	V	A	V	S	S	A		V	P	K	T	E
45	I	V	M	V	S	G	A		I	S	R	V	E
46	I	V	M	V	S	S	T		I	S	R	V	E
47	I	V	A	V	S	S	T		I	S	R	V	E
48	I	V	M	V	S	S	T		V	P	R	V	E
50	I	V	M	V	S	G	A		V	P	R	T	E
51	I	M	M	V	S	G	T		I	S	K	T	E
56	I	V	A	V	S	G	T		V	P	K	T	E
57	I	M	M	V	S	S	A		V	S	R	V	E
58	I	V	M	P	S	G	A		V	P	R	V	E
59	I	V	A	P	S	S	T		V	P	K	V	E
60	I	V	M	P	S	G	T		V	P	R	V	E
63	I	V	M	V	S	S	T		V	S	R	T	E
74	I	V	M	V	S	S	T		I	S	R	V	E

15 El Clon Núm. 56 se evaluó mediante análisis BIAcore y análisis de inhibición hemolítica. El análisis BIAcore mostró que el clon Núm. 56 tiene una afinidad similar a Factor humano D como Fab 166-32 quimérico (véase la Tabla 4). El análisis de inhibición hemolítica mostró que el clon Núm. 56 es algo más potente que el Fab 166-32 quimérico (véase la Figura 6). El Clon Núm. 56 contiene dos residuos murinos en el marco de cadena ligera y cuatro residuos murinos en la cadena pesada (véase la Tabla 1). Basándose en estos resultados, se llevó a cabo una mayor optimización.

Tabla 2. Análisis de la secuencia de aminoácidos de anticuerpos optimizados de la biblioteca de humanización/optimización de los CDR3

Posiciones VK	2	4	13	43	49	64	69	CDR-L3	92	93	97
166-32	T	V	M	P	S	S	A		D	N	T
Molde Humano	I	M	A	V	Y	G	T				
104	I	V	M	P	S	S	T		D	N	T
109	I	V	A	V	S	G	A		M	N	T
111	I	V	A	V	S	G	T		D	S	T
112	I	V	A	V	S	G	T		D	S	T
114	I	V	A	V	S	G	T		D	C	T
121	I	V	A	V	S	S	A		D	N	T
125	I	V	A	P	S	S	T		D	N	T
130	I	V	A	V	S	S	T		D	N	S

Posiciones VH	2	9	38	93	97	CDR-H3	98	99	100
166-32	I	P	K	T	E		V	D	N
Molde Humano	V	S	R	V	A				
104	V	S	R	V	E		V	D	T
109	V	S	R	V	E		V	N	N
111	V	S	R	V	E		V	N	N
112	V	S	R	V	E		V	N	N
114	V	S	K	V	E		V	N	N
121	I	S	R	V	E		V	N	T
125	V	S	R	V	E		P	D	N
130	V	S	R	V	E		V	D	H

- 5 Los clones Núm. 111 y Núm. 114 se caracterizaron mediante análisis BIAcore (véase la Tabla 4). Los clones Núm. 104, Núm. 111, Núm. 114 y Núm. 130 también se caracterizaron mediante análisis de inhibición hemolítica (véase la Figura 6). Estos clones tienen afinidades más altas que 166-32 quimérico, y son más potentes que Fab quimérico en la inhibición de la ruta alternativa, como se muestra mediante el análisis de inhibición hemolítica (Figura 7). El clon Núm. 111 contiene los mismos dos residuos murinos en la cadena ligera (posición 4 y 49) que el clon Núm. 56.
- 10 También contiene el residuo murino conservado en la posición 97 de la cadena pesada que se encuentra en el clon Núm. 56. Hay una mutación beneficiosa en la CDR3 tanto de cadena pesada como ligera en el clon Núm. 111. De dos bibliotecas independientes escrutadas (biblioteca de humanización y biblioteca de humanización/optimización de las CDR3), los autores de la presente invención encontraron que los mejores clones tenían residuos consenso similares.
- 15 Para optimizar adicionalmente la afinidad del clon Núm. 111, se construyó una biblioteca de anticuerpos mediante la introducción de mutaciones individuales en la CDR-H1 y la CDR-L2 simultáneamente. En resumen, se utilizó el enfoque de mutagénesis dirigida al sitio para construir tales bibliotecas recociendo oligonucleótidos que codifican mutaciones individuales con el molde del clon Núm. 111. Se secuenciaron un total de 24 clones con afinidad muy alta por el Factor D humano. Entre los 24 clones, se identificaron varias mutaciones beneficiosas redundantes. Los clones Núm. 250, Núm. 315, Núm. 345 y Núm. 416 se seleccionaron para el análisis BIAcore (véase la Tabla 4). Los datos BIAcore mostraron que estos clones tenían mayor afinidad por el Factor D humano que el clon inicial Núm.
- 20

111. Los clones Núm. 250, Núm. 315, Núm. 348 y Núm. 416 también se sometieron a ensayo en el análisis de inhibición hemolítica (véase la Figura 6) y la inhibición de la ruta alternativa (Figura 7).

Ejemplo 5: Análisis de hemólisis AP

- 5 La función biológica de los clones humanizados se determinó utilizando el ensayo de inhibición hemolítica y análisis BIAcore (Véase el Ejemplo 6 de más abajo). El análisis hemolítico se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento. Veinte µl de glóbulos rojos de conejo (RRBC) diluidos 1:20 (0,5 ml + 9,5 ml tampón GVB/Mg-EGTA) en 20 ml de solución salina (NaCl al 0,9%) a una dilución de aproximadamente $1:2 \times 10^4$ se contaron mediante un contador Coulter. La concentración celular se ajustó a continuación a aproximadamente $2-5 \times 10^4$ células/ml. Cada placa recibió aproximadamente 500×10^6 RRBC/placa o aproximadamente 1 ml de RRBC/placa ($500 \times 10^6 / 2-5 \times 10^4$).
- 10 Las células se diluyeron en 6 ml de tampón GVB/Mg-EGTA/placa, se mezclaron y se lavaron 3 veces mediante centrifugación a 1360 rpm x 4 min a 4°C. El sedimento de RRBC se suspendió en 3 ml de tampón GVB/Mg-EGTA/placa y se mantuvo sobre hielo.

El suero humano de un congelador a -80°C se descongeló inmediatamente antes de su uso. El suero se diluyó a una concentración de 20% de suero en tampón de GVB/Mg-EGTA, 5 ml/placa (al final es 10%) y se mantuvo sobre hielo.

Tabla 3

	1	2	3	S	SB
GVB/Mg-EGTA:	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
mAb: Mezcla de 50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	—	—
Suero Hu al 20%:	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Sacudir 30 seg. a 5-6°, después mantener a RT durante 7 min.					
RBC de conejo:	30 µl	30 µl	30 µl		30 µl

- 15 Las muestras se sacudieron durante 30 segundos a 5-6°C y a continuación durante 40 minutos a 37°C. Las muestras se enfriaron a 5-6°C mientras se sacudían y a continuación se centrifugaron a 2.000 rpm x 3 min a 4°C. Aproximadamente 80 µl de sobrenadante se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo plano y se leyó el valor de DO a 590 nm utilizando un lector de placas convencional. El porcentaje de inhibición se calculó como sigue: % de inhibición = $\{[(S-SB) - (U-SB)] / (S-SB)\} \times 100\%$. (U = muestra 1, 2 o 3 (columnas 1, 2 o 3 de la Tabla 3, respectivamente).
- 20

Ejemplo 6: Análisis cinético de Fab anti-Factor D humano por medio de BiaCore

- 25 **Inmovilización-** el factor D humano (Advanced Research Inc, 0,1 mg/ml) se inmovilizó directamente sobre el chip CM5 (Biacore) utilizando un método de acoplamiento con amina. El procedimiento se describe brevemente como sigue: (1) El flujo constante (PBS) es a 5 µl/min. (2) Inyección de 35 µl de EDC/NHS (1:1). (3) Inyección de 35 µl de factor D humano en tampón de acetato, pH 4,5. (4) Bloqueo del grupo activado mediante inyección de 35 µl de etanolamina. (5) Limpieza de la superficie mediante 5 µl de Glicina 10 mM, pH 1,5. El nivel de inmovilización del ligando (factor D humano) es de aproximadamente 1000 UR. La ronda de ensayo utilizando factor D humano α (huDi, 40 µl, 31,5 g/ml) proporcionó una respuesta relativa alrededor de 900 UR.
- 30 **Análisis cinético-** Todos los Fab anti-factor D humano se diluyeron en tampón PBS. Cada muestra se preparó en una serie de concentraciones: 12,5 nM, 25 nM, 50 nM, 75 nM, 100 nM, 125 nM, y 150 nM, con pulsos de inyección de 40 µl a alta tasa de adquisición. La regeneración se completó aplicando pulsos de 5 µl de glicina 10 mM a pH 1,5. Los parámetros cinéticos se obtuvieron ajustando las trazas de unión de los Fab a un modelo de unión 1:1 a una cinética de pseudo-primer orden utilizando BIAevaluation versión 3.0. Los resultados se presentan en la Tabla 4 de más abajo.
- 35 Todo los datos se obtienen mediante la rutina de ajuste global.

Tabla 4 Resultados de BIAcore

Clon de Fab	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_d (M)
Fab 315 anti-factor D	$7,1 \times 10^5$	$2,7 \times 10^{-4}$	$3,7 \times 10^{-10}$
Fab 416 anti-factor D	$8,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-10}$
Fab 345 anti-factor D	$6,8 \times 10^5$	$3,5 \times 10^{-4}$	$5,1 \times 10^{-10}$
Fab 250 anti-factor D	$5,7 \times 10^5$	$1,9 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-10}$
Fab 56 anti-factor D	$3,6 \times 10^5$	$9,8 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-9}$
Quimérico	$4,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-9}$
Fab 111 anti-factor D	$3,3 \times 10^5$	$3,7 \times 10^{-4}$	$1,14 \times 10^{-9}$

Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar utilizando solamente la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas descritas en la presente memoria.

Listado de secuencias

- <110> Genentech, Inc.
 WU, Herren
 5 SINGH, Sanjaya
 FUNG, Sek Chung
 AN, Ling-Ling
 LOWMAN, Henry B.
 KELLEY, Robert F.
- 10 <120> Anticuerpos anti-Factor D humanizados y Usos de los mismos
- <130> P4028R1 WO
- 15 <150> US 60/856,505
 <151> 2006-11-02
- <160> 58
- 20 <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
 <211> 115
 <212> PRT
 25 <213> ARTIFICIAL
- <220>
 <223> DOMINIO DE CADENA PESADA VARIABLE DE MAB 166-32
- 30 <400> 1
- Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
- Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
- Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
- Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
- Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
- Leu Glu Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
- Glu Arg Glu Gly Gly Val Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110
- Val Ser Ser
 115
- <210> 2
 35 <211> 107
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
- <220>
 40 <223> DOMINIO DE CADENA LIGERA VARIABLE DE MAB 166-32

ES 2 525 477 T3

<400> 2

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

5 <210> 3
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL

10 <220>
 <223> DOMINIO DE CADENA PESADA VARIABLE DE MAB 166-32

<400> 3

cagatccagt tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
 tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct 120
 ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct aactggaga gacaacatat 180
 gctgatgact tcaagggacg gtttctctc tctttgaaa cctctgccag cactgcctat 240
 ttggagatca acaacctcaa aaatgaggac atggctacat atttctgtga aagagagggg 300
 15 ggggttgaca actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 345

20 <210> 4
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> DOMINIO DE CADENA LIGERA VARIABLE DE MAB 166-32

25 <400> 4

gaaacaactg tgaccagtc tcctgcatcc ctgtccatgg ctataggaga aaaagtcacc 60
 atcagatgca taaccagcac tgatattgat gatgatatga actggtacca gcagaagcca 120
 ggggaacctc ctaagctcct tatttcagga ggcaatactc ttcgtcctgg agtcccatcc 180
 cgattctcca gcagtggtc tgggtcagat ttgttttta caattgacaa catgctctca 240
 gaagatgttg cagattacta ctgtttgcaa agtgataact tgccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaggc tggaaataaa a 321

<210> 5

ES 2 525 477 T3

<211> 207
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>

5 <223> DOMINIO DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CLON HUMANIZADO #56

<400> 5

Asp Ile Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Arg
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp
 20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Ser Gly Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10

<210> 6
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

15

<220>
 <223> DOMINIO DE CADENA PESADA VARIABLE DE CLON HUMANIZADO #56

<400> 6

20

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Glu Arg Glu Gly Gly Val Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

25 <210> 7

ES 2 525 477 T3

<211> 107
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

5 <220>
 <223> DOMINIO DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CLON HUMANIZADO #111
 <400> 7

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

<210> 8
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

15 <220>
 <223> DOMINIO DE CADENA PESADA VARIABLE DE CLON HUMANIZADO # 111

20 <400> 8

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

ES 2 525 477 T3

<210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

5

<220>
 <223> DOMINIO DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CLON HUMANIZADO #250

<400> 9

10

Asp Ile Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp
 20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Ser His Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Ser Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

15

<210> 10
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

20

<220>
 <223> DOMINIO DE CADENA PESADA VARIABLE DE CLON HUMANIZADO #250

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Glu Arg Glu Gly Gly Val Asn Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

25

Val Ser Ser
 115

ES 2 525 477 T3

<210> 11
<211> 107
<212> PRT
5 <213> ARTIFICIAL

<220>
<223> DOMINIO DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CLON HUMANIZADO #416

10 <400> 11

Asp Ile Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Asp Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Ser Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

15

<210> 12
<211> 115
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

20

<220>
<223> DOMINIO DE CADENA PESADA VARIABLE DE CLON HUMANIZADO #416

<400> 12

25

ES 2 525 477 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Glu Arg Glu Gly Gly Val Asn Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 10
5 <212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
10 <223> CDR-H1 DE MAB 166-32
<400> 13

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

15 <210> 14
<211> 19
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

20 <220>
<223> CDR-H2 DE MAB 166-32
<400> 14

Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Asp
1 5 10 15

25 Asp Phe Lys
<210> 15
<211> 6
<212> PRT
30 <213> ARTIFICIAL

<220>
<223> CDR-H3 DE MAB 166-32
35 <400> 15

Glu Gly Gly Val Asp Asn
1 5

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> CDR-L1 DE MAB 166-32

 10 <400> 16

Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met Asn
1 5 10

 <210> 17
 15 <211> 7
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 20 <223> CDR-L2 DE MAB 166-32

 <400> 17

Gly Gly Asn Thr Leu Arg Pro
1 5
 25
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 30
 <220>
 <223> CDR-L3 DE MAB 166-32

 <400> 18
 35
Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Tyr Thr
1 5

 <210> 19
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> CDR-L3 DE CLON HUMANIZADO #111
 45
 <400> 19

Leu Gln Ser Asp Ser Leu Pro Tyr Thr
1 5
 50
 <210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 55
 <220>
 <223> CDR-H3 DE CLON HUMANIZADO #111

 <400> 20

Glu Gly Gly Val Asn Asn
1 5
 60

<210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 5
 <220>
 <223> CDR-L2 DE CLON HUMANIZADO #250
 <400> 21
 10
His Gly Asn Thr Leu Arg Pro
1 5
 <210> 22
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> CDR-L3 DE CLON HUMANIZADO #250
 20 <400> 22
Leu Gln Ser Asp Ser Leu Pro Tyr Thr
1 5
 25 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 30 <220>
 <223> CDR-H1 DE CLON HUMANIZADO #250
 <400> 23
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Leu Asn
 35 **1 5 10**
 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> CDR-L2 DE CLON HUMANIZADO #416
 45 <400> 24
Asp Gly Asn Thr Leu Arg Pro
1 5
 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 50 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> CDR-H1 DE CLON HUMANIZADO #416
 55 <400> 25
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Met Asn
 60 **1 5 10**
 <210> 26

<211> 107
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

5 <220>
 <223> PRODUCTO COMPUESTO DE CADENAS LIGERAS VARIABLES DE CLONES HUMANIZADOS

<220>
 <221> característica_misc
 10 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> característica_misc
 15 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> característica_misc
 20 <222> (43)..(43)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> característica_misc
 25 <222> (49)..(49)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> característica_misc
 30 <222> (64)..(64)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> característica_misc
 35 <222> (69)..(69)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 26

Asp Ile Gln Xaa Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Xaa Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp
 20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Xaa Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Xaa Asp Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Xaa
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Xaa Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Ser Leu Pro Tyr
 85 90 95

40 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 27
 <211> 115
 <212> PRT
 45 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> PRODUCTO COMPUESTO DE CADENAS PESADAS VARIABLES DE CLONES HUMANIZADOS

5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (38)..(38)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (93)..(93)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (97)..(97)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30 <400> 27

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Xaa Arg Glu Gly Gly Val Asn Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

35 <210> 28
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

40 <220>
 <223> La secuencia es sintetizada
 <400> 28

ES 2 525 477 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Trp Val
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Val Thr Ile
35 40 45

Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
50 55 60

Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 29

<211> 81

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

10

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
35 40 45

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
65 70 75 80

Ser

15 <210> 30

<211> 80

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

20 <220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 30

ES 2 525 477 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
 35 40 45

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70 75 80

<210> 31
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

5

<220>
 <223> La secuencia es sintetizada

10

<400> 31

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
 35 40 45

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70 75

<210> 32
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

15

<220>
 <223> La secuencia es sintetizada

20

<400> 32

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Trp Ile
 20 25 30
 Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Val Thr Ile
 35 40 45
 Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
 50 55 60
 Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
 65 70 75 80
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 33
 <211> 81
 5 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> La secuencia es sintetizada

10 <400> 33

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
 20 25 30
 Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 35 40 45
 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 50 55 60
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 65 70 75 80

Ser

15 <210> 34
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

20 <220>
 <223> La secuencia es sintetizada

<400> 34

ES 2 525 477 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75 80

<210> 35
<211> 79
5 <212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> La secuencia es sintetizada

10 <400> 35

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75

15 <210> 36
<211> 87
<212> PRT
20 <213> ARTIFICIAL

<220>
<223> La secuencia es sintetizada

25 <400> 36

ES 2 525 477 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Val
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Phe Thr Ile
35 40 45

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
50 55 60

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 37

<211> 81

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

10

<400> 37

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
35 40 45

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
65 70 75 80

15 Ser

<210> 38

<211> 80

20 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

25 <400> 38

ES 2 525 477 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
35 40 45

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75 80

<210> 39
<211> 79
5 <212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> La secuencia es sintetizada

10 <400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
35 40 45

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75

15 <210> 40
<211> 87
<212> PRT
20 <213> ARTIFICIAL

<220>
<223> La secuencia es sintetizada

25 <400> 40

ES 2 525 477 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Trp Val
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Phe Thr Ile
35 40 45

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
50 55 60

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly
65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 41

<211> 81

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

10

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
65 70 75 80

15

Ser

<210> 42

<211> 80

<212> PRT

20 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

25

<400> 42

ES 2 525 477 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75 80

<210> 43
<211> 87
5 <212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> La secuencia es sintetizada

10 <400> 43

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Trp Val
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Phe Thr Ile
35 40 45

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
50 55 60

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

15 <210> 44
<211> 81
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

20 <220>
<223> La secuencia es sintetizada

<400> 44

ES 2 525 477 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
65 70 75 80

Ser

<210> 45

<211> 80

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

10 <223> La secuencia es sintetizada

<400> 45

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75 80

15 <210> 46

<211> 79

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

20 <220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 46

ES 2 525 477 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70 75

<210> 47

<211> 80

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

10

<400> 47

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 20 25 30

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 50 55 60

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 65 70 75 80

15 <210> 48

<211> 80

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

20 <220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 48

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

25 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

ES 2 525 477 T3

20 25 30

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp
 50 55 60

Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 65 70 75 80

5 <210> 49
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

10 <220>
 <223> La secuencia es sintetizada
 <400> 49

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 20 25 30

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp
 50 55 60

Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 65 70 75 80

15 <210> 50
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

20 <220>
 <223> La secuencia es sintetizada
 <400> 50

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 20 25 30

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 35 40 45

25 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp
 50 55 60

Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 65 70 75 80

30 <210> 51
 <211> 31
 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

5 <400> 51

Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 52

10 <211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

15 <223> La secuencia es sintetizada

<400> 52

Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
20 25 30

20

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

25

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 53

30

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 54

<211> 10

35 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

40

<220>

<221> característica_misc

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45

<400> 54

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Xaa Glu Ile Lys
1 5 10

50 <210> 55

<211> 87

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

55 <220>

<223> La secuencia es sintetizada

ES 2 525 477 T3

<400> 55

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Trp Val
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Phe Val Phe
35 40 45

Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu
50 55 60

Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
65 70 75 80

Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
85

5

<210> 56

<211> 81

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 56

15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val
35 40 45

Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser
65 70 75 80

Ser

20

<210> 57

<211> 80

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 57

ES 2 525 477 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val
35 40 45

Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
65 70 75 80

<210> 58

<211> 79

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

10

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 58

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val
35 40 45

Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
65 70 75

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo ANTI-Factor D o un fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende:
 - (i) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 5 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 6.
 - (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 7 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 8;
 - (iii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 9 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 10; o
 - (iv) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 11 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 12.
2. El anticuerpo anti-Factor D o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1 que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 5 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 6.
3. El anticuerpo anti-Factor D o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1 que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 7 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 8.
4. El anticuerpo anti-Factor D o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1 que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 9 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 10.
5. El anticuerpo anti-Factor D o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1 que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 11 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 97% con el SEQ ID NO: 12.
6. El anticuerpo anti-Factor D o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 3 que comprende el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, en donde el aminoácido de la posición 104 del SEQ ID NO: 7 es una valina o una leucina.
7. El anticuerpo anti-Factor D o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la identidad de secuencia es de al menos 98%.
8. El anticuerpo anti-Factor D o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la identidad de secuencia es de al menos 99%.
9. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 9.
11. Una célula anfitriona que comprende el vector de la reivindicación 10.
12. Una composición que comprende el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
13. Una composición que comprende el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de trastornos mediados por el complemento, en donde el trastorno es una enfermedad ocular tal como la degeneración macular relacionada con la edad o la retinopatía diabética.
14. Un método para la producción de un anticuerpo anti-Factor D o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende:
 - (i) cultivar la célula anfitriona de la reivindicación 11 en un medio; y

(ii) purificar el anticuerpo o fragmento allí expresado.

15. Un anticuerpo anti-Factor D o un fragmento de unión a antígeno del mismo obtenido mediante el método de la reivindicación 14.

FIGURA 1A

Secuencia de Aminoácidos de la Cadena Pesada Variable del MAb Murino 166-32

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWKQAPGKGLKWMGWINT
YTGETTYADDFKGRFVFSLETSASTAYLEINNLKNEDEMATYFCEREGGVDNWG
QGTTLVSS (SEQ ID NO: 1)

FIGURA 1B

Secuencia de Aminoácidos de la Cadena Ligera Variable del MAb Murino 166-32

ETTVTQSPASLSMAIGKVTIRCITSTDIDDMNWKQKPGEPKLLISGGNTRLR
PGVPSRFSSSGYGADVFVTIDNMLSEVADYYCLQSDNLPYTFGGGTRLEIK
(SEQ ID NO: 2)

FIGURA 2A

Secuencia de Ácido Nucleico Murino para la Región Variable de la Cadena Pesada del MAb 166-32

CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACA
GTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAACTATGGAATGA
ACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAA
ACACCTACACTGGAGAGACAACATATGCTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGT
CTTCTCTTTGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGGAGATCAACAACCTCA
AAAATGAGGACATGGCTACATATTTCTGTGAAAGAGAGGGGGGGGTTGACAA
CTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 3)

FIGURA 2B

Secuencia de Ácido Nucleico Murino para la Región Variable de la Cadena Ligera del MAb 166-32

GAAACAACCTGTGACCCAGTCTCCTGCATCCCTGTCCATGGCTATAGGAGAAAA
AGTCACCATCAGATGCATAACCAGCACTGATATTGATGATGATATGAACTGGT
ACCAGCAGAAGCCAGGGGAACCTCCTAAGCTCCTTATTCAGGAGGCAATACT
CTTCGTCTGGAGTCCCATCCCGATTCTCCAGCAGTGGCTATGGTGCAGATTTT
GTTTTTACAATTGACAACATGCTCTCAGAAGATGTTGCAGATTACTACTGTTTG
CAAAGTGATAACTTGCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAGGCTGGAAATAA
AA (SEQ ID NO: 4)

FIGURA 4

Comparación del Molde de la Cadena Ligera Humana con el MAAb Murino 166-32

1 10 20 30 40
 Mu. 166-32 E T V T Q S P A S L S M A I G E K V T I R C I T T S T I D I D D D M N W Y Q O K P G E P P K L L I
 HUttemp DPK4 D I Q M A S V D R T R A S O G I S N Y L A K Y

50 60 70 80 90
 Mu. 166-32 S G G N T L R P G V P S R F S S S G Y G A D F V F T I D N M L S E D V A D Y Y C L O S D N L P Y
 HUttemp DPK4 Y A A S T L Q S G S T T L S S L O P T O K Y N S A P Y

100
 Mu. 166-32 T F G G G T R L E I K
 HUttemp JK2 I Q K (JK2)

FIGURA 5

Núm.56 VK

DIQVTQSPSSLSASVRDRVTITCistdiddmWYQQKPGKVPKLLISggnlrpGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQPEDVATYYC~~lasdnlpyt~~FGQGTKLEIK

Núm.56 VH

QVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASgytftnygmWVKQAPGQGLEwmgwintytgettyaddfkGRFVF
SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCER~~eqgvdn~~WGQGLTVTVSS

Núm.111 VK

DIQVTQSPSSLSASVDRVTITCistdiddmWYQQKPGKVPKLLISggnlrpGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQPEDVATYYC~~lasdnlpyt~~FGQGTKLEIK

Núm.111 VH

QVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASgytftnygmWVRQAPGQGLEwmgwintytgettyaddfkGRFVF
SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCER~~eqgvnn~~WGQGLTVTVSS

Núm.250 VK

DIQVTQSPSSLSASVDRVTITCistdiddmWYQQKPGKVPKLLIS~~hgnlrp~~GVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQPEDVATYYC~~lasdnlpyt~~FGQGTKLEIK

Núm.250 VH

QVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASgytftnygnWVRQAPGQGLEwmgwintytgettyaddfkGRFVFS
LDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCER~~eqgvnn~~WGQGLTVTVSS

Núm.416 VK

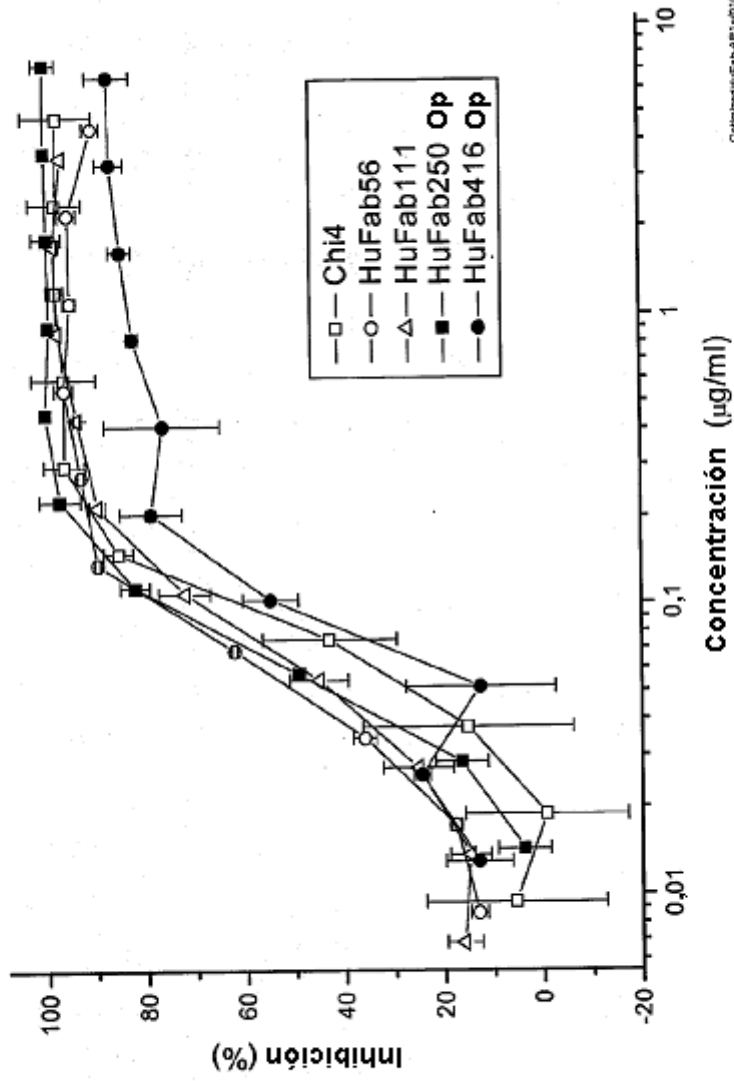
DIQVTQSPSSLSASVDRVTITCistdiddmWYQQKPGKVPKLLIS~~dgnlrp~~GVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQPEDVATYYC~~lasdnlpyt~~FGQGTKLEIK

Núm.416 VH

QVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASgytftsvgmWVRQAPGQGLEwmgwintytgettyaddfkGRFVF
SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCER~~eqgvnn~~WGQGLTVTVSS

FIGURA 6

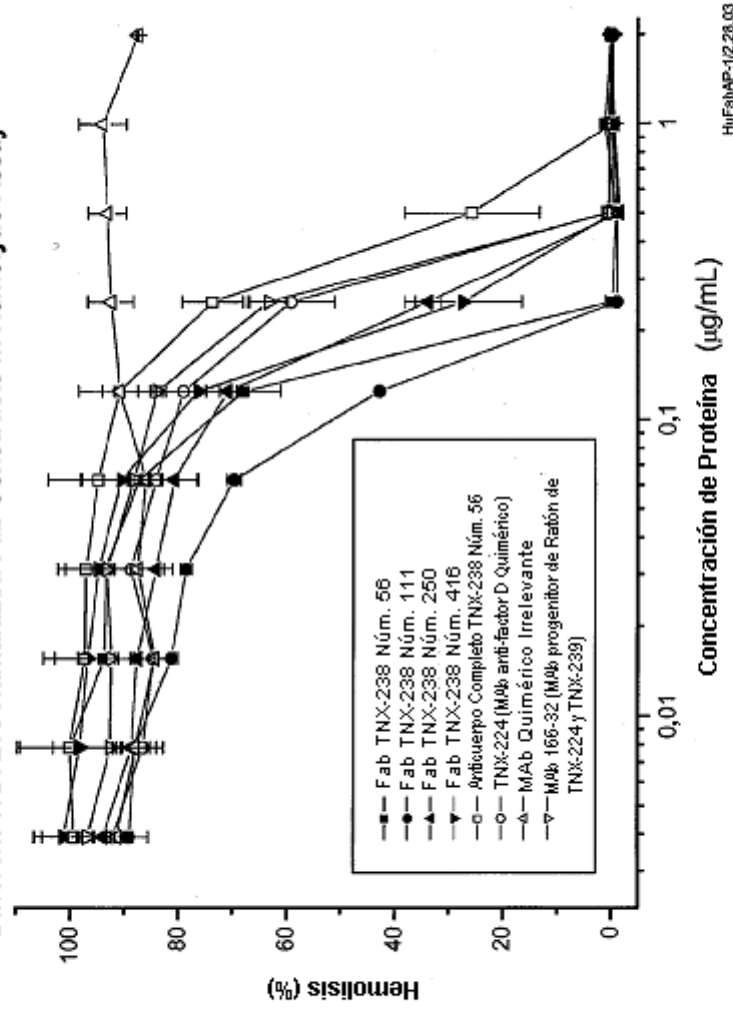
HuFab Anti-FD Optimizados Inhiben la Hemolisis AP



OptimizedHuFabAP1 v01.0002

FIGURA 7

Inhibición de la Actividad Alternativa del Complemento de Suero Humano por Diferentes Constructos Fab Humanizados TNX-238 en Análisis Hemolítico



HuFabAP-1/2.28.03

FIGURA 8A

I	A	QVQLVQSGAEVVKPKPGASVKVSCKASGYTFT	-HI-	WVRQAPGQGLEWMG	-H2-
	B	QVQLVQSGAEVVKPKPGASVKVSCKAS	-HI-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
	C	QVQLVQSGAEVVKPKPGASVKVSCKAS	-HI-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
	D	QVQLVQSGAEVVKPKPGASVKVSCKAS	-HI-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
II	A	QVQLQESGPGLVKPSTLSLTCTVSGGSVS	-HI-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-
	B	QVQLQESGPGLVKPSTLSLTCTVS	-HI-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
	C	QVQLQESGPGLVKPSTLSLTCTVS	-HI-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
	D	QVQLQESGPGLVKPSTLSLTCTVS	-HI-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
III	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-HI-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
VII	A	QVQLVQSGSELKKPKPGASVKVSCKASGYTFT	-HI-	WVRQAPGQGLEWMG	-H2-
	B	QVQLVQSGSELKKPKPGASVKVSCKAS	-HI-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
	C	QVQLVQSGSELKKPKPGASVKVSCKAS	-HI-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
	D	QVQLVQSGSELKKPKPGASVKVSCKAS	-HI-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
	Acceptor				
	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-HI-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	Segundo Acceptor				
	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-HI-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-

FIGURA 8B

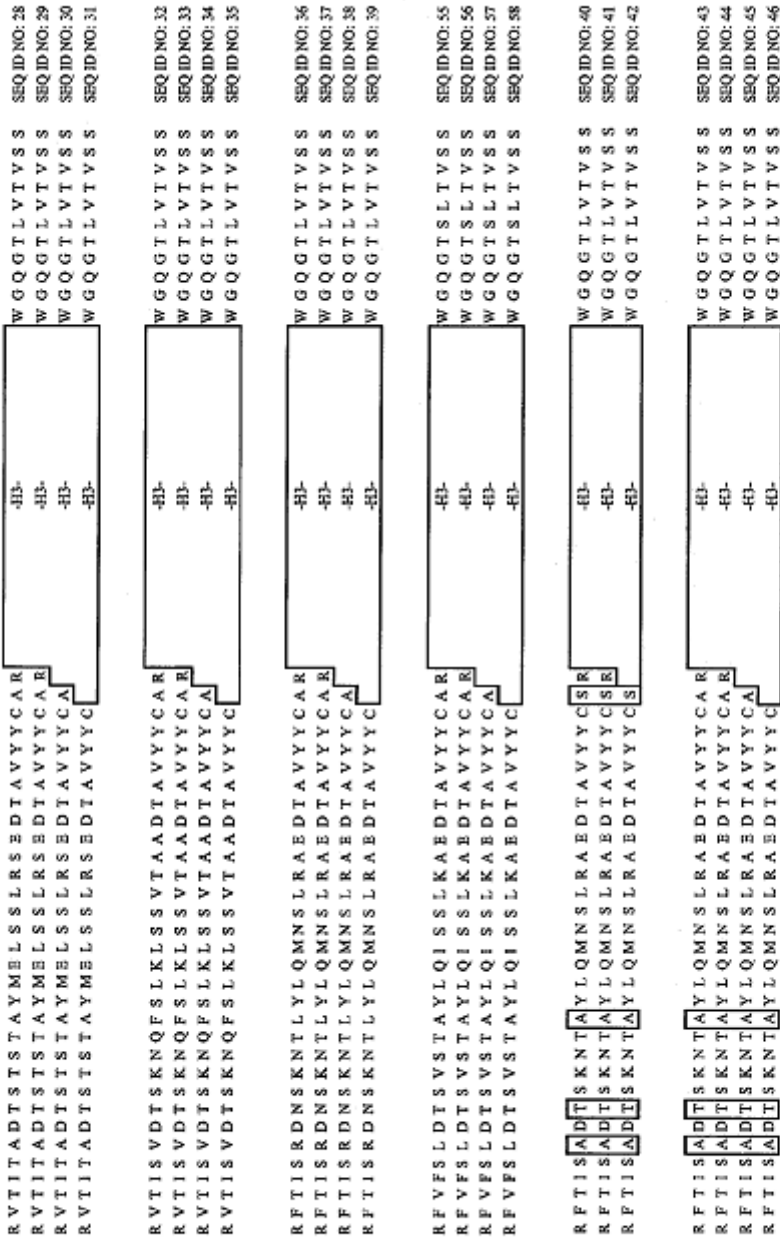


FIGURA 9A

W1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC -L1-WYQQKPGKAPKLLIY -L2-GVPSRFRSGSGSDFTLTISSLOP

W2 DIVMTQSPPLSLPVTGPASISG -L1-WYLQKPGQSPQLLIY -L2-GVPDFRFSGSGSDFTLTKISRVEA

W3 EIVLTQSPGTLSPGERATLSC -L1-WYQQKPGQAPRLLIY -L2-GIPDRFSGSGSDFTLTISRLEP

W4 DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC -L1-WYQQKPGQPPKLLIY -L2-GVPDFRFSGSGSDFTLTISSLQA

FIGURA 9B

EDFATYYC [L3] FGGTKVEIK SEQID NO: 47

EDVGVYYC [L3] FGGTKVEIK SEQID NO: 48

EDFVYYC [L3] FGGTKVEIK SEQID NO: 49

EDVAVYYC [L3] FGGTKVEIK SEQID NO: 50