

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 242**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2008 E 08756130 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2152755**

54 Título: **Prevención y tratamiento de afecciones oculares asociadas con el complemento**

30 Prioridad:

23.05.2007 US 939791 P

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

08.04.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HASS, PHILIP;
JIANPING, YIN;
KATSCHKE, KENNETH JR.;
STEFFEK, MICAH;
WIESMANN, CHRISTIAN y
VAN LOOKEREN CAMPAGNE, MENNO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 533 242 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

Prevención y tratamiento de afecciones oculares asociadas con el complemento

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la prevención y el tratamiento de afecciones oculares asociadas con el complemento, tales como neovascularización corooidal (NVC) y degeneración macular relacionada con la edad (DME).

10

Antecedentes de la invención

El sistema de complemento es una cascada enzimática compleja compuesta de una serie de glucoproteínas del suero, que existen normalmente en forma proenzimática, inactiva. Dos rutas principales, la ruta clásica y la alternativa, pueden activar el complemento, que se fusionan al nivel de C3, donde dos convertasas C3 similares escinden C3 en C3a y C3b.

15

Los macrófagos son células especialistas que han desarrollado una capacidad innata para reconocer diferencias sutiles en la estructura de marcadores de identificación expresados en la superficie celular, denominados patrones moleculares (Taylor, *et al.*, Eur J Immunol 33, 2090-2097 (2003); Taylor, *et al.*, Annu Rev Immunol 23, 901-944 (2005)). Aunque el reconocimiento directo de estas estructuras de superficie es un aspecto fundamental de la inmunidad innata, la opsonización permite que los receptores de macrófagos genéricos medien en el atrapamiento, aumentando la eficacia y diversificando el repertorio de reconocimiento del fagocito (Stuart y Ezekowitz, Immunity 22, 539-550 (2005)). El proceso de fagocitosis implica múltiples interacciones ligando-receptor, y está claro ahora que diversas opsoninas, incluyendo inmunoglobulinas, colectinas y componentes del complemento, guían las actividades celulares requeridas para la internalización del patógeno mediante interacción con receptores de superficie celular de macrófagos (revisado en Aderem y Underhill, Annu Rev Immunol 17, 593-623 (1999); Underhill y Ozinsky, Annu Rev Immunol 20, 825-852 (2002)). Aunque las inmunoglobulinas naturales codificadas por genes de línea germinal pueden reconocer una amplia serie de patógenos, la mayoría de la opsonización IgG se genera mediante inmunidad adaptativa, y por lo tanto la eliminación eficaz mediante receptores de Fc no es inmediata (Carroll, Nat Immunol 5, 981-986 (2004)). El complemento, por otro lado, reconoce rápidamente moléculas de superficie de patógenos y prepara la partícula para su captación por receptores del complemento (Brown, Infect Agents Dis 1, 63-70 (1991)).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

El complemento consiste en más de 30 proteínas del suero que opsonizan una amplia serie de patógenos para su reconocimiento por receptores del complemento. Dependiendo del desencadenante inicial de la cascada, pueden distinguirse tres rutas (revisadas en Walport, N Engl J Med 344, 1058-1066 (2001)). Las tres comparten la etapa común de activar el componente central C3, pero difieren según la naturaleza del reconocimiento y las etapas bioquímicas iniciales que conducen a la activación de C3. La ruta clásica se activa por anticuerpos unidos a la superficie del patógeno, que a su vez se unen con el componente de complemento C1q, desencadenando una cascada de serina proteasa que en última instancia escinde C3 en su forma activa, C3b. La ruta de lectina se activa después de reconocimiento de motivos de carbohidratos por proteínas lectina. Hasta la fecha, se han identificado tres miembros de esta ruta: las lectinas de unión a manosa (MBL), la familia de SIGN-R1 de lectinas y las ficolinas (Pyz *et al.*, Ann Med 38, 242-251 (2006)). Tanto las MBL como las ficolinas están asociadas con serina proteasas, que actúan como C1 en la ruta clásica, activando los componentes C2 y C4 lo que conduce a la etapa C3 central. La ruta alternativa contrasta con las rutas tanto clásicas como de lectina porque se activa debido a una reacción directa del éster C3 interno con motivos de reconocimiento en la superficie del patógeno. La unión de C3 inicial con una superficie activadora conduce a amplificación rápida de la deposición de C3b mediante la acción de las proteasas de ruta alternativa Factor B y Factor D. Resulta importante que C3b depositada por la ruta clásica o la lectina también puede conducir a amplificación de la deposición de C3b mediante las acciones de los Factores B y D. En las tres rutas de la activación del complemento, la etapa clave en la opsonización es la conversión del componente C3 a C3b. La escisión de C3 por enzimas de la cascada del complemento expone el tioéster a un ataque nucleófilo, permitiendo la unión covalente de C3b en superficies de antígenos mediante el dominio de tioéster. Esta es la etapa inicial en la opsonización del complemento. La proteólisis posterior del C3b unido produce iC3b, C3c y C3dg, fragmentos que se reconocen por receptores diferentes (Ross y Medof, Adv Immunol 37, 217-267 (1985)). Esta escisión anula la capacidad de C3b para amplificar adicionalmente la deposición de C3b y activar los componentes tardíos de la cascada del complemento, incluyendo el complejo de ataque membrana, capaz de dirigir el daño de membrana. Sin embargo, los receptores fagocíticos de macrófagos reconocen C3b y sus fragmentos preferentemente; debido a la versatilidad de la formación de enlace éster, la opsonización mediada por C3 es central para el reconocimiento de patógenos (Holers *et al.*, Immunol Today 13, 231-236 (1992)), y los receptores de los diversos productos de degradación de C3 desempeñan por lo tanto un papel importante en la respuesta inmunitaria del hospedador.

65

C3 en sí misma es una proteína compleja y flexible que consiste en 13 dominios distintos. El núcleo de la molécula está compuesto de 8 dominios llamados de macroglobulina (MG), que constituyen las cadenas α y β estrechamente empaquetadas de C3. En esta estructura están insertos los dominios CUB (proteína morfogenética del Hueso y Uegf

C1r/C1s-1) y TED, conteniendo estos últimos el enlace tioéster que permite la asociación covalente de C3b con superficies de patógenos. Los dominios restantes contienen C3a o actúan como enlazadores y espaciadores de los dominios del núcleo. La comparación de las estructuras de C3b y C3c con C3 demuestra que la molécula experimenta reordenamientos conformacionales importantes con cada proteólisis, lo que expone no solamente el TED, sino superficies nuevas adicionales de la molécula que pueden interactuar con receptores celulares (Janssen y Gros, *Mol Immunol* 44, 3-10 (2007)).

La degeneración macular relacionada con la edad (DME) es la principal causa de ceguera en todo el mundo en los ancianos. La DME se caracteriza por una pérdida progresiva de visión central atribuible a cambios degenerativos y neovasculares de la mácula, una región altamente especializada de la retina ocular responsable de la agudeza visual fina. Las estimaciones recientes indican que 14 millones de personas están ciegas o tienen una visión gravemente deteriorada debido a la DME. La enfermedad tiene una influencia enorme en la salud física y mental de la población geriátrica y sus familias y se está convirtiendo en una carga sanitaria pública importante.

Nuevos descubrimientos, sin embargo, están comenzando a proporcionar una imagen más clara de los acontecimientos celulares relevantes, factores genéticos y procesos bioquímicos asociados con la DME temprana. El gen del Factor H del complemento es el primer gen identificado en múltiples estudios independientes que confiere un riesgo genético significativo para el desarrollo de DME. De este modo, tres grupos separados han indicado que un polimorfismo de tirosina-histidina en el aminoácido 402 del Factor H está asociado con el desarrollo de DME (Klein *et al.*, *Science* 308:385-389 (2005); Haines *et al.*, *Science* 308:419-421 (2005); y Edwards *et al.*, *Science* 308:421-424 (2005)). Se ha sugerido que la inhibición de la ruta alternativa alterada por el alelo de Factor H asociado con la enfermedad provoca o contribuye significativamente al desarrollo de DME (Thurman y Holers, *J Immunol* 176:1305-1310 (2006)).

El documento WO 2006/042329 desvela la caracterización del miembro de la ruta de complemento alternativa CR1g, e implica la ruta alternativa defectuosa en el desarrollo de la enfermedad ocular asociada con el complemento.

Bora *et al.*, *J Immunol.* 2005; 147(1): 491-497 desvela que la activación del complemento, incluyendo a través de la ruta alternativa, está implicada en el desarrollo de NVC e identifica un anticuerpo anti-C6 que inhibe C6 y reduce NVC.

Tanhehco *et al.*, *Transplan Proc.* 1999; 31(5): 2168-71 desvela el mAb anti-Factor D 166-32, su inhibición de la ruta del complemento alternativa, y su uso potencial para evitar el rechazo de xenoinjertos.

Petrukhin *et al.*, *Expert Opin Ther Targets.* 2007; 11(5): 625-39 desvela el uso de anticuerpos monoclonales para el Factor D para la regulación negativa de la ruta de complemento alternativa como una terapia potencial para DME.

El documento WO 2007/056227 se refiere a inhibidores del complemento para el tratamiento o prevención de enfermedades oculares tales como DME y NVC, y desvela el anticuerpo monoclonal anti-Factor D, mAb 166-32.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un medio como se define en las reivindicaciones para la prevención o tratamiento de una afección ocular asociada con el complemento administrando a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un antagonista del Factor D.

En diversas realizaciones, el sujeto que lo necesita es un mamífero, tal como un ser humano. El antagonista del Factor D es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En diversas realizaciones, el anticuerpo puede unirse con el sitio activo del Factor D o puede unirse con un epítipo que incluye restos de sitio activo del Factor D.

Los anticuerpos específicos dentro del alcance de la presente invención incluyen, sin limitación, anticuerpo 20D12, y variantes del mismo como se define en las reivindicaciones. En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une esencialmente con el mismo epítipo que el anticuerpo 20D12, o comprende las secuencias de CDR de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo 20D12 (SEC ID N°: 1 y 2), o es el anticuerpo 20D12, o un fragmento del mismo.

Los anticuerpos anti-Factor D incluyen anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos.

Los fragmentos de anticuerpo pueden, por ejemplo, ser Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, (scFv)₂, anticuerpo lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios, minicuerpos, diacuerpos o anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Las afecciones oculares asociadas con el complemento incluyen, por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad (DME), neovascularización corooidal (NVC), uveítis, retinopatías diabéticas y otras relacionadas con la isquemia, edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, Oclusión de la Vena Retiniana Central (OVEC), neovascularización corneana y neovascularización retiniana.

También se desvela un kit que comprende un antagonista del Factor D e instrucciones para administrar dicho antagonista para tratar una afección ocular asociada con el complemento.

5 En un aspecto específico, como se define en las reivindicaciones, la invención se refiere al uso de un antagonista del Factor D en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección ocular asociada con el complemento.

10 En un aspecto específico adicional, como se define en las reivindicaciones, la invención se refiere a un antagonista del Factor D para uso en el tratamiento de una afección ocular asociada con el complemento.

Breve descripción de los dibujos

15 **Fig. 1A.** Niveles del Factor D en humor vítreo y Bruch obtenido de ojos de donantes normales y con DME. Se midieron los niveles del Factor D por un ELISA específico de Factor D como se describe. B: los niveles totales del Factor D en el ojo se determinaron calculando la contribución total del Factor D expresado en la membrana de Bruch y la cantidad total del Factor D hallado en el humor vítreo.

20 **Fig. 2.** Inmunohistoquímica del Factor D de una sección transversal de una membrana de Bruch de un ojo de donante con DME. El inserto muestra la tinción del Factor D en Drusa depositada sobre la membrana de Bruch. Además de la Drusa, la membrana de Bruch y el corioide fueron positivos para el Factor D.

Fig. 3. Caracterización de 12D20 en un ensayo hemolítico selectivo para la ruta alternativa del complemento. Los valores de CI50 se indican debajo y el ensayo se realizó como se describe en la sección de métodos.

Fig. 4. Secuencias de cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal murino 12D20 (SEC ID N°: 1 y 2).

25 **Fig. 5.** Mapeo de epítomos de los diversos anticuerpos anti-Factor D. Se indican sus potencias relativas en el ensayo de hemólisis.

Fig. 6. Secuencia de aminoácidos del polipéptido del Factor D humano nativo (SEC ID N°: 3).

Tabla 1. Análisis de componentes del complemento en DME.

Tabla 2. Tejidos donantes usados en los estudios.

30 Descripción detallada de la realización preferida

I. Definiciones

35 Las expresiones “Factor D” y “Factor D del complemento” se usan de forma intercambiable, y se refieren a polipéptidos de Factor D variantes y de secuencia nativa.

40 Un Factor D de “secuencia nativa” es un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido del Factor D derivado de la naturaleza, independientemente de su modo de preparación. Por lo tanto, el Factor D de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse por medios recombinantes y/o sintéticos. Además de una proteína de Factor D madura, tal como una proteína de Factor D humano madura (NM_001928; SEC ID N°: 3), la expresión “Factor D de secuencia nativa”, abarca específicamente formas precursoras de origen natural del Factor D (por ejemplo, una preproteína inactiva, que se escinde de forma proteolítica para producir la forma activa), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativo) y variantes alélicas de origen natural del Factor D, así como variantes conformacionales estructurales de moléculas del Factor D que tienen la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido de Factor D derivado de la naturaleza. Los polipéptidos de Factor D de animales no humanos, incluyendo primates superiores y mamíferos no humanos, se incluyen específicamente dentro de esta definición.

50 La “variante del Factor D” o “variante de Factor D del complemento” significa un polipéptido de Factor D activo como se define posteriormente que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de Factor D de secuencia nativa, tal como el polipéptido de Factor D humano de secuencia nativa de SEC ID N° 3. Habitualmente, una variante de Factor D tendrá al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, al menos aproximadamente el 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, al menos aproximadamente el 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos o al menos aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos humana madura de SEC ID N°: 3. Preferentemente, el mayor grado de identidad de secuencia se produce dentro del sitio activo del Factor D.

60 El “sitio activo” del Factor D se define por His-57, Asp-102 y Ser-195 (numeración de quimotripsinógeno) en la secuencia del Factor D humano. El Factor D tiene Asp189 (numeración de quimotripsina) en el fondo del bolsillo de especificidad primario y escinde un enlace peptídico de Arg. La triada catalítica consiste en His-57, Asp-102 y Ser-195. Asp-102 y His57 presentan conformaciones atípicas comparadas con otras serina proteasas (Narayana *et al.*, J. Mol. Biol. 235 (1994), 695-708). Se observa un enlace salino único entre Asp189 y Arg210 en el fondo del bolsillo S1 que elevó el bucle 214-218 y generó un bolsillo S1 profundo y estrecho (Jing *et al.*, J. Mol. Biol. 282 (1998) 1061-1081). Se ha mostrado por análisis mutacional que este bucle y varios otros restos alrededor del sitio activo son los

determinantes estructurales clave de la actividad esterolítica del Factor D (Kim *et al.*, J. Biol. Chem. 270 (1995) 24399-24405). Basándose en estos resultados, se ha propuesto que el Factor D puede experimentar un cambio conformacional tras la unión del Factor B unido a C3b, dando como resultado la expresión de la actividad proteolítica (Volanakis y Narayana, Protein Sci. 5 (1996) 553-564).

5 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en una secuencia de Factor D de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en cuenta ninguna sustitución conservativa como parte de la
10 identidad de secuencia. Puede conseguirse alineamiento para fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas maneras que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando software informativo públicamente disponible tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el alineamiento máximo sobre la longitud completa de las
15 secuencias que se comparan. Se calcula después la identidad de secuencia en relación con la secuencia más larga, es decir incluso si una secuencia más corta muestra 100 % de identidad de secuencia con una parte de una secuencia mayor, la identidad de secuencia general será menor del 100 %.

20 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácidos nucleicos" se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en una secuencia codificante de Factor D de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Puede conseguirse alineamiento para fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico de diversas maneras que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el alineamiento máximo sobre la longitud completa de las
25 secuencias que se comparan. Después se calcula la identidad de secuencia en relación con la secuencia mayor, es decir incluso si una secuencia más corta muestra 100 % de identidad de secuencia con una parte de una secuencia mayor, la identidad de secuencia general será menor del 100 %.

30 Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta de la forma o ambiente en el que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen por lo tanto de la molécula de ácido nucleico
35 como existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye moléculas de ácido nucleico contenidas en células que expresan habitualmente un polipéptido codificado en el que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de células naturales.

40 Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de Factor D "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico que codifica el Factor D. Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido del Factor D aislada está en una forma o ambiente distinto del que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido de Factor D aisladas se distinguen por lo tanto de la molécula o las moléculas de ácido nucleico codificantes como existen en células naturales. Sin embargo,
45 una molécula de ácido nucleico que codifica el Factor D aislado incluye moléculas de ácido nucleico que codifican el Factor D contenidas en células que habitualmente expresan el Factor D en las que, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de células naturales.

50 El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que sea capaz de neutralizar, bloquear, inhibir parcial o completamente, anular, reducir o interferir con una actividad biológica del Factor D. Los antagonistas del Factor D incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-Factor D y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, otros polipéptidos de unión, péptidos y moléculas pequeñas no peptídicas, que se unen con el Factor D y son capaces de neutralizar, bloquear, inhibir parcial o completamente, anular, reducir o interferir con las actividades del Factor D, tales como la capacidad del Factor D para participar en la patología de una afección ocular asociada
55 con el complemento.

Se define en el presente documento que una "molécula pequeña" tiene un peso molecular por debajo de aproximadamente 600, preferentemente por debajo de aproximadamente 1000 daltons.

60 "Activo" o "actividad" o "actividad biológica" en el contexto de un antagonista de Factor D de la presente invención es la capacidad para antagonizar (inhibir parcial o completamente) una actividad biológica del Factor D. Una actividad biológica preferida de un antagonista de Factor D es la capacidad para conseguir una mejora medible en el estado, por ejemplo patología, de una enfermedad o afección asociada con el Factor D, tal como, por ejemplo, una afección ocular asociada con el complemento. La actividad puede determinarse en ensayos *in vitro* o *in vivo*, incluyendo
65 ensayos de unión, usando un modelo animal relevante o ensayos clínicos humanos.

La expresión “afección ocular asociada con el complemento” se usa en el sentido más amplio e incluye todas las afecciones oculares cuya patología implica al complemento, incluyendo las rutas clásica y alternativa, y en particular la ruta alternativa del complemento. Las afecciones oculares asociadas con el complemento incluyen, sin limitación, enfermedades degenerativas maculares, tales como todos los estadios de degeneración macular relacionada con la edad (DME), incluyendo formas seca y húmeda (no exudativa y exudativa), neovascularización corooidal (NVC), uveítis, retinopatías diabéticas y otras relacionadas con la isquemia, y otras enfermedades neovasculares intraoculares, tales como edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, Oclusión de la Vena Retiniana Central (OVEC), neovascularización corneana y neovascularización retiniana. Un grupo preferido de afecciones oculares asociadas con el complemento incluye la degeneración macular relacionada con la edad (DME), incluyendo DME no exudativa (húmeda) y exudativa (seca o atrófica), neovascularización corooidal (NVC), retinopatía diabética (DR) y endoftalmitis.

El “tratamiento” es una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o alterar la patología de un trastorno. En consecuencia, el “tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Las personas que necesiten tratamiento incluyen las que ya tienen el trastorno así como en las que se debe prevenir el trastorno. En el tratamiento de una enfermedad relacionada con inmunidad, un agente terapéutico puede alterar directamente la magnitud de la respuesta de un competente de la respuesta inmunitaria, o hacer la enfermedad más susceptible al tratamiento por otros agentes terapéuticos, por ejemplo, antibióticos, antifúngicos, agentes antiinflamatorios, productos quimioterapéuticos, etc.

La “patología” de una enfermedad, tal como una afección ocular asociada con el complemento, incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, crecimiento celular anómalo o incontrolable (células neutrófilas, eosinófilas, monocíticas, linfocíticas, etc.), producción de anticuerpos, producción de autoanticuerpos, producción de complemento, interferencia con el funcionamiento normal de células vecinas, liberación de citocinas u otros productos secretores a niveles anómalos, supresión o agravamiento de cualquier respuesta inflamatoria o inmunológica, infiltración de células inflamatorias (neutrófilas, eosinófilas, monocíticas, linfocíticas, etc.) en espacios celulares, etc.

El término “mamífero” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo, sin limitación, seres humanos, primates superiores, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas tales como caballos, cerdos, vacas, perros, gatos y hurones, etc. En una realización preferida de la invención, el mamífero es un ser humano.

La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

La “cantidad terapéuticamente eficaz” es la cantidad de un “antagonista del Factor D” que se requiere para conseguir una mejora medible en el estado, por ejemplo patología, de la enfermedad o afección diana, tal como, por ejemplo, una afección ocular asociada con el complemento.

La expresión “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesario para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está “unido operativamente” cuando se sitúa en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente con ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente con una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente con una secuencia codificante si se sitúa de modo que facilite la traducción. En general, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores sean contiguos. El enlace se consigue mediante el ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, los adaptadores oligonucleotídicos sintéticos o enlazadores se usan de acuerdo con la práctica convencional.

La “rigurosidad” de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto en la materia, y en general es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y concentración salina. En general, las sondas más largas requieren temperaturas mayores para su hibridación apropiada, mientras que las sondas más cortas necesitan temperaturas menores. La hibridación depende en general de la capacidad del ADN desnaturizado para volver a hibridarse cuando están presentes cadenas complementarias en un ambiente por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, se concluye que las temperaturas relativas mayores tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que las temperaturas menores menos. Para detalles adicionales y explicación de la rigurosidad de las reacciones de

hibridación, véase, Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

Las "condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", como se define en el presente documento, pueden identificarse por las que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para lavado, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico 0,1 % a 50 °C; (2) emplear durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (v/v) con albúmina de suero bovino 0,1 %/Ficoll 0,1 %/polivinilpirrolidona 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42 °C; o (3) emplear formamida al 50%, SSC 5 x (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico 0,1%, solución de Denhardt 5 x, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS 0,1% y dextran sulfato 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en SSC 0,2 x (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50 % a 55 °C, seguido de un lavado de alta rigurosidad consistente en SSC 0,1 x que contiene EDTA a 55 °C.

Las "condiciones moderadamente rigurosas" pueden identificarse como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989 e incluyen el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es la incubación durante una noche a 37 °C en una solución que comprende: formamida al 20 %, SSC 5 x (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5 x, dextran sulfato 10 % y ADN de esperma de salmón cortado desnaturizado 20 mg/ml, seguido de lavado de los filtros en SSC 1 x a aproximadamente 37-50 °C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

La expresión "epítipo marcado" cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido de la invención fusionado con un "polipéptido marcador". El polipéptido marcador tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo contra el que puede realizarse un anticuerpo, pero es suficientemente corto de modo que no interfiera con la actividad del polipéptido con el que se fusiona. El polipéptido marcador también es preferentemente bastante único de modo que el anticuerpo no reacciona de forma cruzada sustancialmente con otros epítipos. Los polipéptidos marcadores adecuados generalmente tienen al menos seis restos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 restos de aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácidos).

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente, sin limitación, anticuerpos monoclonales anti-Factor-D individuales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizadores) y composiciones de anticuerpo anti-Factor D con especificidad poliepitópica. La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo es que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiera producción de anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.* (1975) Nature 256: 495, o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.* (1991) Nature 352: 624-628 y Marks *et al.* (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597, por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas es idéntico a u homólogo de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; y Morrison *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante)

tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de región marco conservada (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones *et al.* (1986) Nature 321: 522-525; Riechmann *et al.* (1988) Nature 332: 323-329; y Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596.

Un "anticuerpo dependiente de especie" es uno que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie de mamífero que la que tiene para un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de especie "se une específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (K_d) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} M y más preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-9} M) pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humana que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces o al menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos como se han definido anteriormente, pero preferentemente es un anticuerpo humanizado o humano.

Como se usa en el presente documento, "mutante de anticuerpo" o "variante de anticuerpo" se refiere a una variante de secuencia de aminoácidos del anticuerpo dependiente de especie en la que uno o más de los restos de aminoácidos de anticuerpo dependiente de especie se han modificado. Dichos mutantes tienen necesariamente menos del 100 % de identidad de secuencia o similitud con el anticuerpo dependiente de especie. En una realización preferida, el mutante de anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos o similitud con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo dependiente de especie, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 % y más preferentemente al menos 95 %. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir mismo resto) o similares (es decir resto de aminoácido del mismo grupo basado en propiedades de cadena lateral común, véase posteriormente) con los restos de anticuerpo dependiente de especie, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. No se interpretará que ninguna de las extensiones, deleciones o inserciones N terminales, C terminales o internas en la secuencia de anticuerpo fuera del dominio variable afecte a la identidad o similitud de secuencia.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95 % en peso del anticuerpo como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta su homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Como se usa en el presente documento, "dominio variable de anticuerpo" se refiere a las partes de las cadenas ligera y pesada de moléculas de anticuerpo que incluyen secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2, y CDR3), y regiones marco conservadas (FR). V_H se refiere al dominio variable de la cadena pesada. V_L se refiere al dominio variable de la cadena ligera. De acuerdo con los métodos usados en la presente invención, las posiciones de aminoácidos asignadas a CDR y FR pueden definirse de acuerdo con Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991)). La numeración de aminoácidos de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno también es de acuerdo con la de Kabat.

Como se usa en el presente documento, la expresión "regiones determinantes de complementariedad" (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) se refiere a los restos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo cuya presencia es necesaria para la unión a antígeno. Cada dominio variable normalmente tiene tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región determinante de complementariedad puede comprender restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" como se define por Kabat (es decir, aproximadamente los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35

- (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (es decir aproximadamente los restos) 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917). En algunos casos, una región determinante de complementariedad puede incluir aminoácidos tanto de una región CDR definida de acuerdo con Kabat como un bucle hipervariable. Por ejemplo, la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo 4D5 incluye los aminoácidos 26 a 35.
- Las "regiones marco conservadas" (en lo sucesivo en el presente documento FR) son los restos de dominio variable distintos de los restos de CDR. Cada dominio variable normalmente tiene cuatro FR identificadas como FR1, FR2, FR3 y FR4. Si las CDR se definen de acuerdo con Kabat, los restos de FR de cadena ligera se sitúan aproximadamente en los restos 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3) y 98-107 (LCFR4) y los restos de FR de cadena pesada se sitúan aproximadamente en los restos 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3) y 103-113 (HCFR4) en los restos de cadena pesada. Si las CDR comprenden restos de aminoácidos de bucles hipervariables, los restos de FR de cadena ligera se sitúan aproximadamente en los restos 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3) y 97-107 (LCFR4) en la cadena ligera y los restos de FR de cadena pesada se sitúan aproximadamente en los restos 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3) y 102-113 (HCFR4) en los restos de cadena pesada. En algunos casos, cuando la CDR comprende aminoácidos tanto de una CDR como se define por Kabat como los de un bucle hipervariable, los restos de FR se ajustarán en consecuencia. Por ejemplo, cuando CDRH1 incluye los aminoácidos H26-H35, los restos de FR1 de cadena pesada están en las posiciones 1-25 y los restos de FR2 están en las posiciones 36-49.
- Como se usa en el presente documento, "conjunto de codones" se refiere a un conjunto de diferentes secuencias de tripletes de nucleótidos usado para codificar los aminoácidos variantes deseados. Un conjunto de oligonucleótidos puede sintetizarse, por ejemplo, por síntesis de fase sólida, incluyendo secuencias que representan todas las combinaciones posibles de tripletes de nucleótidos proporcionados por el conjunto de codones y que codificarán el grupo deseado de aminoácidos. Una forma convencional de designación de codones es la del código IUB, que se conoce en la técnica y se describe en el presente documento. Un conjunto de codones normalmente se representa por 3 letras mayúsculas en cursiva, por ejemplo, *NNK*, *NNS*, *XYZ*, *DVK* y similares. Un "conjunto de codones no aleatorio", como se usa en el presente documento, se refiere por lo tanto a un conjunto de codones que codifica aminoácidos seleccionados que cumplirán parcialmente, preferentemente completamente, los criterios para la selección de aminoácidos como se describe en el presente documento. La síntesis de oligonucleótidos con "degradación" de nucleótidos seleccionada en ciertas posiciones se conoce bien en la técnica, por ejemplo el enfoque de TRIM (Knappek *et al.* (1999) J. Mol. Biol. 296: 57-86); Garrard y Henner (1993) Gene 128: 103). Dichos conjuntos de oligonucleótidos que tienen ciertos conjuntos de codones pueden sintetizarse usando sintetizadores de ácido nucleico comerciales (disponibles de, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA) o pueden obtenerse en el mercado (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizados que tienen un conjunto de codones particular incluirá normalmente una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferencias establecidas por el conjunto de codones dentro de la secuencia general. Los oligonucleótidos, como se usan de acuerdo con la invención, tienen secuencias que permiten la hibridación con un molde de ácido nucleico de dominio variable y también pueden incluir, pero no incluyen necesariamente, sitios de enzimas de restricción útiles para, por ejemplo, fines de clonación.
- La expresión "fragmento de anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio e incluye, sin limitación, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, (scFv)₂ dAb, y fragmentos de región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarias, minicuerpos, diacuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.
- Un fragmento "Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha, que puede ser de naturaleza covalente, por ejemplo, en scFv. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. De forma colectiva, las seis CDR o un subconjunto de las mismas confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse con el antígeno, aunque habitualmente a una afinidad menor que el sitio de unión completo.
- El fragmento "Fab" contiene un dominio variable y constante de la cadena ligera y un dominio variable y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ comprenden un par de fragmentos Fab que se unen covalentemente generalmente cerca de sus extremos carboxi terminal por cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen en la técnica otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.
- Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En general el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L, que permite que el scFv forme la estructura deseada

para unión a antígeno. Para una revisión de scFv; véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término “diacuerpos” se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H y V_L). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448.

La expresión “anticuerpos lineales” se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.* (1995 *Protein Eng*, 8(10):1057-1062). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos de Fd en tándem (V_H - C_H1 - V_H - C_H1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o mono-específicos.

Como se usa en el presente documento, “biblioteca” se refiere a una pluralidad de secuencias de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, polipéptidos de la invención) o los ácidos nucleicos que codifican estas secuencias, siendo las secuencias diferentes en la combinación de aminoácidos variantes que se introducen en estas secuencias de acuerdo con los métodos de la invención.

La “presentación de fagos” es una técnica por la que se presentan polipéptidos variantes como proteínas de fusión a al menos una parte de proteína de cubierta en la superficie de partículas de fago, por ejemplo, fago filamentoso. Una utilidad de la presentación de fagos está en el hecho de que pueden clasificarse rápida y eficazmente grandes bibliotecas de variantes proteicas aleatorias con respecto a las secuencias que se unen con un antígeno diana con alta afinidad. Se ha usado la presentación de bibliotecas de péptidos y proteínas en fagos para explorar millones de polipéptidos con respecto a los que tuvieran propiedades de unión específicas. Se han usado métodos de presentación de fagos polivalentes para presentar péptidos aleatorios pequeños y proteínas pequeñas mediante fusiones con el gen III o el gen VIII de fago filamentoso. Wells y Lowman (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 355-362, y referencias citadas en la misma. En una presentación de fago monovalente, se fusiona una biblioteca de proteínas o péptidos con un gen III o una parte del mismo, y se expresan a niveles bajos en presencia de la proteína del gen de tipo silvestre III de modo que las partículas de fago presenten una copia o ninguna de las proteínas de fusión. Los efectos de avididad se reducen en relación con el fago polivalente de modo que la clasificación se basa en la afinidad del ligando intrínseco, y se usan vectores fagémidos, que simplifica las manipulaciones de ADN. Lowman y Wells (1991) *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 3: 205-0216.

Un “fagémido” es un vector plasmídico que tiene un origen de replicación bacteriano, por ejemplo, ColE1, y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. El fagémido puede usarse en cualquier bacteriófago conocido, incluyendo bacteriófago filamentoso y bacteriófago lambda. El plásmido también contendrá generalmente un marcador seleccionable para resistencia a antibióticos. Los segmentos de ADN clonados en estos vectores pueden propagarse como plásmidos. Cuando se proporcionan células que albergan estos vectores con todos los genes necesarios para la producción de partículas de fago, el modo de replicación del plásmido cambia a replicación en círculo rodante para generar copias de una cadena del ADNc plasmídico y empaquetar partículas de fago. El fagémido puede formar partículas de fago infecciosas o no infecciosas. Este término incluye fagémidos que contienen un gen de proteína de cubierta de fago o fragmento del mismo unido con un gen de polipéptido heterólogo como una fusión génica de modo que el polipéptido heterólogo se presente en la superficie de la partícula de fago.

La expresión “vector de fago” significa una forma replicativa bicatenaria de un bacteriófago que contiene un gen heterólogo y capaz de replicación. El vector de fago tiene un origen de replicación de fago que permite la replicación del fago y la formación de partículas del fago. El fago es preferentemente un bacteriófago filamentoso, tal como un fago M13, f1, fd, Pf3 o un derivado del mismo, o un fago lambda, tal como lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, etc., o un derivado del mismo.

Como se usa en el presente documento, “posición accesible a disolvente” se refiere a una posición de un resto de aminoácido en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de origen o fragmento de unión a antígeno que se determina, basándose en su estructura, ensamblaje de estructuras y/o estructura modelada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, como potencialmente disponible para el acceso al disolvente y/o contacto con una molécula, tal como un antígeno específico de anticuerpo. Estas posiciones se encuentran normalmente en las CDR y en el exterior de la proteína. Las posiciones accesibles a disolvente de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, como se define en el presente documento, pueden determinarse usando cualquiera de varios algoritmos conocidos en la técnica. Preferentemente, se determinan posiciones accesibles a disolvente usando coordenadas de un modelo tridimensional de un anticuerpo, preferentemente usando un programa informático tal como el programa InsightII (Accelrys, San Diego, CA). También pueden determinarse posiciones accesibles a disolvente usando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Lee y Richards (1971) *J. Mol. Biol.* 55, 379 y Connolly (1983) *J. Appl. Cryst.* 16, 548). Puede realizarse determinación de posiciones accesibles a disolvente usando software adecuado para modelación de proteínas e información estructural tridimensional

obtenidas de un anticuerpo. El software que puede utilizarse para estos fines incluye software de Módulos de Biopolímeros SYBYL (Tripos Associates). En general y preferentemente, cuando un algoritmo (programa) requiere un parámetro de tamaño introducido por el usuario, el "tamaño" de una sonda que se usa en el cálculo se establece en aproximadamente 1,4 Angstrom o menor de radio. Además, la determinación de regiones accesibles a disolvente y métodos de área usando software para ordenadores personales se ha descrito en Pacios (1994) Comput. Chem. 18(4): 377-386.

II. Descripción detallada

El complemento desempeña un papel crucial en la defensa del cuerpo y, junto con otros componentes del sistema inmunitario, protegen al individuo de patógenos que invaden el cuerpo. Sin embargo, si no se activa o controla apropiadamente, el complemento también puede provocar lesión a los tejidos hospedadores. La activación inapropiada del complemento está implicada en la patogénesis de diversas enfermedades, denominadas enfermedades o trastornos asociados con el complemento, tales como enfermedades del complejo inmunitario y autoinmunitarias, y diversas afecciones inflamatorias, incluyendo el daño tisular inflamatorio mediado por complemento. La patología de las enfermedades asociadas con el complemento varía, y podría implicar la activación del complemento durante un periodo de tiempo largo o corto, la activación de la cascada completa, solamente una de las cascadas (por ejemplo ruta clásica o alternativa), solamente algunos componentes de la cascada, etc. En algunas enfermedades las actividades biológicas del complemento de fragmentos del complemento dan como resultado lesión tisular y enfermedad. En consecuencia, los inhibidores del complemento tienen alto potencial terapéutico. Los inhibidores selectivos de la ruta alternativa serían particularmente útiles, porque la eliminación de patógenos y otros organismos de la sangre mediante la ruta clásica permanecería intacta.

Los antagonistas del Factor D de la presente invención son útiles para la prevención y tratamiento de afecciones oculares asociadas con el complemento (todas las afecciones oculares y enfermedades cuya patología impliquen al complemento, incluyendo las rutas clásica y alternativa, y en particular la ruta alternativa del complemento), tales como, por ejemplo, enfermedades degenerativas maculares, tales como todos los estadios de la degeneración macular relacionada con la edad (DME), incluyendo forma seca y húmeda (no exudativa y exudativa), neovascularización coroidal (NVC), uveítis, retinopatías diabéticas y otras relacionadas con la isquemia, endoftalmítis y otras enfermedades neovasculares intraoculares, tales como edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, Oclusión de la Vena Retiniana Central (OVEC), neovascularización corneana y neovascularización retiniana. Un grupo preferido de afecciones oculares asociadas con el complemento incluye degeneración macular relacionada con la edad (DME), incluyendo DME no exudativa (húmeda) y exudativa (seca o atrófica), neovascularización coroidal (NVC), retinopatía diabética (DR) y endoftalmítis.

La DME es degeneración de la mácula relacionada con la edad, que es la causa principal de disfunción visual irreversible en individuos de más de 60 años. Existen dos tipos de DME, DME no exudativa (seca) y exudativa (húmeda). La forma seca, o no exudativa, implica cambios atróficos e hipertróficos en el epitelio pigmentario retiniano (RPE) que subyace a la retina central (mácula) así como depósitos (drusas) en el RPE. Los pacientes con DME no exudativa pueden progresar a la forma de DME húmeda, o exudativa, en la que se desarrollan vasos sanguíneos anómalos llamados membranas neovasculares coroidales (NVCM) bajo la retina, filtran fluido y sangre, y en última instancia provocan una cicatriz disciforme cegadora en y bajo la retina. La DME no exudativa, que es habitualmente un precursor de la DME exudativa, es más común. La presentación de DME no exudativa varía; pueden estar presentes drusas duras, drusas blandas, atrofia geográfica del RPE y agregación de pigmentos. Se depositan componentes del complemento en el RPE en la DME temprana y son constituyentes principales de las drusas.

La presente invención se refiere específicamente al tratamiento de DME de alto riesgo, incluyendo DME de categoría 3 y categoría 4. La DME de categoría 3 se caracteriza por la ausencia de DME avanzada en ambos ojos, teniendo al menos un ojo una agudeza visual de 20/32 o mejor con al menos una drusa grande (por ejemplo, 125 μm), drusas intermedias extensivas (como se mide por el área de drusas), o atrofia geográfica (GA) que no implica el centro de la mácula, o cualquier combinación de estas. La DME de categoría 3 (que aún se considera DME "seca") tiene un alto riesgo de conversión a neovascularización coroidal (NVC).

La DME de categoría 4 de alto riesgo (clasificada como DME "húmeda") se caracteriza por una agudeza visual de 20/32 o mejor y DME no avanzada (GA que implica el centro de la mácula o elementos de la neovascularización coroidal) en el ojo índice. El ojo compañero se caracteriza por DME avanzada, o agudeza visual menor de 20/32 atribuible a maculopatía de DME. Normalmente, la DME de alto riesgo, si no se trata, progresa rápidamente a neovascularización coroidal (NVC) a una tasa aproximadamente 10-30 veces mayor que la tasa de progresión para la DME de categoría 1 o 2 (no de alto riesgo).

Los antagonistas del Factor D tienen utilidad particular en la prevención de la progresión de DME (en particular, DME de categoría 3 o categoría 4) a NVC, y/o la prevención del desarrollo/progresión de DME o NVC en el ojo compañero no afectado o menos afectado. En este contexto, el término "prevención" se usa en el sentido más amplio para incluir el bloqueo completo o parcial y la ralentización de la progresión de la enfermedad así como el

retardo de la aparición de la forma más grave de la enfermedad. Los pacientes que están en alto riesgo de desarrollar o progresar a DME de alto riesgo (categoría 4) o CMV se benefician especialmente de este aspecto de la invención.

5 Se sabe que el polimorfismo del factor H del complemento (CFH) se asocia con el riesgo de que un individuo desarrolle DME y/o NVC. Las mutaciones en CFH pueden activar el complemento, lo que a su vez puede conducir a DME/NVC. Se ha indicado recientemente que el polimorfismo del factor H del complemento (CFH) representa el 50 % del riesgo atribuible de DME (Klein *et al.*, Science 308: 385-9 (2005)). Se descubrió que un haplotipo común en CFH (HF1/CFH) predispone a los individuos a la degeneración macular relacionada con la edad (Hageman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102(2): 7227-7232 (2005)). La DME se ha segregado como un rasgo dominante autosómico, mapeándose el locus de la enfermedad en el cromosoma 1q25-q31 entre los marcadores D1S466 y D1S413, con una puntuación lod máxima de aproximadamente 3,20 (Klein *et al.*, Arch Ophthalmol. 116(8): 1082-9 (1998); Majewski *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 73(3): 540-50 (2003); Seddon *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 73(4): 780-90 (2003); Weeks *et al.*, Am. J. Ophthalmol. 132(5): 682-92 (2001); Iyengar *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 74(1): 20-39 (2004)); cromosoma 2q3/2q32 entre los marcadores D12S1391 y D2S1384, con una puntuación lod máxima de 2,32/2,03 (Seddon *et al.*, mencionado anteriormente); 3p13, entre los marcadores D12S1300 y D12S1763, con una puntuación lod máxima de 2,19 (Majewski *et al.*, mencionado anteriormente; Schick *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 72(6): 1412-24 (2003)); 6q 14 entre los marcadores D6S1056 y DS249 con una puntuación lod máxima de 3,59/3,17 (Kniazeva *et al.*, Am. J. Ophthalmol. 130(2): 197-202 (2000)); 9q33, en el marcador D9S934, con una puntuación lod máxima de 2,06 (Mejwski *et al.*, mencionado anteriormente); 10q26 en el marcador D10S1230, con una puntuación lod máxima de 3,06 (Majewski *et al.*, mencionado anteriormente; Iyengar *et al.*, mencionado anteriormente; Kenealy *et al.*, Mol. Vis. 10: 57-61 (2004); 17q25 en el marcador D17S928, puntuación lod máxima de 3,16 (Weeks *et al.*, mencionado anteriormente); y 22q12 en el marcador D22S1045, puntuación lod máxima de 2,0 (Seddon *et al.*, mencionado anteriormente). En consecuencia, la exploración genética es una parte importante de la identificación de pacientes que son candidatos particularmente buenos para el tratamiento preventivo, incluyendo prevención de la progresión de la enfermedad a una forma más grave, tal como de DME a NVC.

1. Anticuerpos anti-Factor D

30 La invención del presente documento incluye la producción y el uso de anticuerpos anti-Factor D. Se describen métodos ejemplares para generar anticuerpos en más detalle en las siguientes secciones.

Se seleccionan anticuerpos anti-Factor D usando un antígeno de Factor D derivado de una especie de mamífero. Preferentemente, el antígeno es el Factor D humano. Sin embargo, también pueden usarse factores D de otras especies tales como Factor D murino como el antígeno diana. Los antígenos de Factor D de diversas especies de mamífero pueden aislarse de fuentes naturales. En otras realizaciones, el antígeno se produce de forma recombinante o se realiza usando otros métodos sintéticos conocidos en la técnica.

40 El anticuerpo seleccionado tendrá normalmente una afinidad de unión suficientemente fuerte por el antígeno de Factor D. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse con el Factor D humano con un valor de K_d de no más de aproximadamente 5 nM, preferentemente no más de aproximadamente 2 nM, y más preferentemente no más de aproximadamente 500 pM. Las afinidades de anticuerpo pueden determinarse por un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (tal como el ensayo de BIAcore como se describe en los Ejemplos); ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); y ensayos de competición (por ejemplo RIA), por ejemplo.

45 Además, el anticuerpo puede someterse a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, para evaluar su eficacia como un producto terapéutico. Dichos ensayos se conocen en la técnica y dependen del antígeno diana y uso pretendido para el anticuerpo. Los Ejemplos incluyen el ensayo de inhibición de HUVEC (como se describe en los Ejemplos posteriores); ensayos de inhibición del crecimiento de células tumorales (como se describe en el documento WO/89/06692, por ejemplo); ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad mediada por complemento (CDC) (Patente de Estados Unidos 5.500.362); y ensayos *in vitro* e *in vivo* descritos posteriormente para identificar antagonistas del Factor D.

55 Para explorar con respecto a anticuerpos que se unen con un epítipo particular en el antígeno de interés, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede realizarse un mapeo de epítopos, por ejemplo como se describe en Champe *et al.* (1995) J. Biol. Chem. 270: 1388-1394, para determinar si el anticuerpo se une con un epítipo de interés.

60 En una realización preferida, los anticuerpos anti-Factor D se seleccionan usando un enfoque de presentación de fagos único. El enfoque implica la generación de bibliotecas de fagos de anticuerpos sintéticas basándose en un único molde de armazón, diseño de suficientes diversidades dentro de los dominios variables, presentación de polipéptidos que tengan los dominios variables diversificados, selección de anticuerpos candidatos con alta afinidad por el antígeno del Factor D diana, y el aislamiento de los anticuerpos seleccionados.

65 Pueden encontrarse detalles de los métodos de presentación de fagos, por ejemplo, en el documento WO

03/102157 publicado el 11 de diciembre de 2003.

5 En un aspecto, las bibliotecas de anticuerpos pueden generarse mutando las posiciones accesibles al disolvente y/o altamente diversas en al menos una CDR de un dominio variable de anticuerpo. Algunas o todas las CDR pueden mutarse usando los métodos proporcionados en el presente documento. En algunas realizaciones, puede ser preferible generar diversas bibliotecas de anticuerpos mutando posiciones en CDRH1, CDRH2 y CDRH3 para formar una única biblioteca o mutando posiciones en CDRL3 y CDRH3 para formar una única biblioteca o mutando posiciones en CDRH3 y CDRH1, CDRH2 y CDRH3 para formar una única biblioteca.

10 Puede generarse una biblioteca de dominios variables de anticuerpo, por ejemplo, que tiene mutaciones en las posiciones accesibles al disolvente y/o altamente diversas de CDRH1, CDRH2 y CDRH3. Puede generarse otra biblioteca que tiene mutaciones en CDRL1, CDRL2 y CDRL3. Estas bibliotecas también pueden usarse juntas entre sí para generar agentes de unión de afinidades deseadas. Por ejemplo, después de uno o más ciclos de selección de bibliotecas de cadena pesada para unión con un antígeno diana, una biblioteca de cadena ligera puede reemplazarse en la población de agentes de unión de cadena pesada para ciclos adicionales de selección para aumentar la afinidad de los agentes de unión.

15 Preferentemente, se crea una biblioteca por sustitución de aminoácidos originales con aminoácidos variantes en la región CDRH3 de la región variable de la secuencia de cadena pesada. La biblioteca resultante puede contener una pluralidad de secuencias de anticuerpo, en la que la diversidad de secuencia es principalmente en la región CDRH3 de la secuencia de cadena pesada.

25 En un aspecto, la biblioteca se crea en el contexto de la secuencia del anticuerpo humanizado 4D5, o la secuencia de los aminoácidos de armazón de la secuencia del anticuerpo humanizado 4D5. Preferentemente, la biblioteca se crea por sustitución de al menos los restos 95-100a de la cadena pesada con los aminoácidos codificados por el conjunto de codones *DVK*, en el que el conjunto de codones *DVK* se usa para codificar un conjunto de aminoácidos variantes para cada una de estas posiciones. Un ejemplo de un conjunto de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia (*DVK*)₇. En algunas realizaciones, se crea una biblioteca por sustitución de los restos 95-100a con aminoácidos codificados por los conjuntos de codones tanto *DVK* como *NNK*. Un ejemplo de un conjunto de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia (*DVK*)₆(*NNK*). En otra realización, se crea una biblioteca por sustitución de al menos los restos 95-100a con aminoácidos codificados por los conjuntos de codones tanto *DVK* como *NNK*. Un ejemplo de un conjunto de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia (*DVK*)₅(*NNK*). Otro ejemplo de un conjunto de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia (*NNK*)₆. Otros ejemplos de secuencias de oligonucleótidos adecuadas pueden determinarse por un experto en la materia de acuerdo con los criterios descritos en el presente documento.

35 En otra realización, se utilizan diferentes diseños de CDRH3 para aislar agentes de unión de alta afinidad y para aislar agentes de unión para diversos epítomos. El intervalo de longitudes de CDRH3 generado en esta biblioteca es de 11 a 13 aminoácidos, aunque también pueden generarse longitudes diferentes de esta. La diversidad de H3 puede expandirse usando conjuntos de codones *NNK*, *DVK* y *NVK*, así como diversidad más limitada en el extremo N y/o C terminal.

40 También puede generarse diversidad en CDRH1 y CDRH2. Los diseños de las diversidades de CDR-H1 y H2 siguen la estrategia de dirigirse para imitar el repertorio de anticuerpos natural como se describe con modificación que centra la diversidad más estrechamente coincidente con la diversidad natural que el diseño previo.

45 Para diversidad de CDRH3, pueden construirse múltiples bibliotecas por separado con diferentes longitudes de H3 y después combinarse para seleccionar con respecto a agentes de unión para antígenos diana. Las múltiples bibliotecas pueden agruparse y seleccionarse usando selección de soporte sólido y métodos de selección en solución como se ha descrito previamente y posteriormente en el presente documento. Pueden emplearse múltiples estrategias de clasificación. Por ejemplo, una variación implica clasificación en diana unida a un sólido, seguido de clasificación con respecto a un marcador que puede estar presente en el polipéptido de fusión (por ejemplo, marcador anti-gD) y seguido de otra clasificación en diana unida a sólido. Como alternativa, las bibliotecas pueden clasificarse primero en diana unida a una superficie sólida, los agentes de unión eluidos se clasifican después usando unión en fase de solución con concentraciones decrecientes de antígeno diana. La utilización de combinaciones de diferentes métodos de clasificación posibilita la minimización de la selección de secuencias expresadas solamente a alto nivel y posibilita la selección de varios clones de alta afinidad diferentes.

50 Pueden aislarse agentes de unión de alta afinidad para el antígeno del Factor D diana a partir de las bibliotecas. La limitación de la diversidad en la región H1/H2 reduce la degradación aproximadamente 10^4 a 10^5 veces y permitir más diversidad de H3 posibilita más agentes de unión de alta afinidad. La utilización de bibliotecas con diferentes tipos de diversidad de CDRH3 (por ejemplo, utilizando *DVK* o *NVT*) posibilita el aislamiento de agentes de unión que pueden unirse con diferentes epítomos de un antígeno diana.

55 En otra realización, se genera una biblioteca o bibliotecas con diversidad en las regiones CDRH1, CDRH2 y CDRH3.

En esta realización, se genera diversidad en CDHR3 usando diversas longitudes de regiones H3 y usando principalmente conjuntos de codones XYZ y NNK o NNS. Las bibliotecas pueden formarse usando oligonucleótidos individuales y agruparse o pueden agruparse oligonucleótidos para formar un subconjunto de bibliotecas. Las bibliotecas de esta realización pueden clasificarse frente a diana unida a sólido. Los clones aislados de múltiples clasificaciones pueden explorarse con respecto a especificidad y afinidad usando ensayos de ELISA. Para especificidad, los clones pueden explorarse frente a los antígenos diana deseados así como otros antígenos no diana. Los agentes de unión para el antígeno NRP1 diana puede explorarse después con respecto a afinidad en ensayo de ELISA de competición de unión en solución o ensayo de competición puntual. Los agentes de unión de alta afinidad pueden aislarse de la biblioteca utilizando conjuntos de codones XYZ preparados como se ha descrito anteriormente. Estos agentes de unión pueden producirse fácilmente como anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno en alto rendimiento en cultivo celular.

En algunas realizaciones, puede ser deseable generar bibliotecas con una mayor diversidad de longitudes de la región CDRH3. Por ejemplo, puede ser deseable generar bibliotecas con regiones CDRH3 que varían de aproximadamente 7 a 19 aminoácidos.

Se producen fácilmente agentes de unión de alta afinidad aislados de las bibliotecas de estas realizaciones en cultivo celular bacteriano y eucariota en alto rendimiento. Los vectores pueden diseñarse para retirar fácilmente secuencias tales como marcadores gD, secuencia de componentes de proteína de cubierta viral y/o para añadir en la región constante secuencias para posibilitar la producción de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión a antígeno en alto rendimiento.

Puede combinarse una biblioteca con mutaciones en CDRH3 con una biblioteca que contiene versiones variantes de otras CDR, por ejemplo CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1 y/o CDRH2. Por lo tanto, por ejemplo, en una realización, una biblioteca de CDRH3 se combina con una biblioteca de CDRL3 creada en el contexto de la secuencia de anticuerpo 4D5 humanizado con aminoácidos variantes en las posiciones 28, 29, 30, 31 y/o 32 usando conjuntos de codones predeterminados. En otra realización, puede combinarse una biblioteca con mutaciones para la CDRH3 con una biblioteca que comprende dominios variables de cadena pesada de CDRH1 y/o CDRH2 variantes. En una realización, la biblioteca de CDRH1 se crea con la secuencia de anticuerpo humanizado 4D5 con aminoácidos variantes en las posiciones 28, 30, 31, 32 y 33. Puede crearse una biblioteca de CDRH2 con la secuencia del anticuerpo humanizado 4D5 con aminoácidos variantes en las posiciones 50, 52, 53, 54, 56 y 58 usando los conjuntos de codones predeterminados.

El anticuerpo anti-Factor D generado a partir de bibliotecas de fagos puede modificarse adicionalmente para generar mutantes de anticuerpo con propiedades físicas, químicas y/o biológicas mejoradas sobre el anticuerpo parental. Cuando el ensayo usado es un ensayo de actividad biológica, el mutante de anticuerpo preferentemente tiene una actividad biológica en el ensayo elegido que es al menos aproximadamente 10 veces mejor, preferentemente al menos aproximadamente 20 veces mejor, más preferentemente al menos aproximadamente 50 veces mejor y en ocasiones al menos aproximadamente 100 veces o 200 veces mejor, que la actividad biológica del anticuerpo parental en ese ensayo. Por ejemplo, un mutante de anticuerpo anti-Factor D preferentemente tiene una afinidad de unión por NRP que es al menos aproximadamente 10 veces más fuerte, preferentemente al menos aproximadamente 20 veces más fuerte, más preferentemente al menos aproximadamente 50 veces más fuerte y en ocasiones al menos aproximadamente 100 veces o 200 veces más fuerte, que la afinidad de unión de los anticuerpos parentales anti-Factor D, tales como cualquiera de los anticuerpos mostrados en la Figura 5, y en particular, el anticuerpo 20D12.

Para generar el anticuerpo mutante, se introducen una o más alteraciones de aminoácidos (por ejemplo sustituciones) en una o más de las regiones hipervariables del anticuerpo parental. Como alternativa, o además, pueden introducirse una o más alteraciones (por ejemplo sustituciones) de restos de región marco conservada en el anticuerpo parental cuando estas dan como resultado una mejora de la afinidad de unión del mutante de anticuerpo por el antígeno de la segunda especie de mamífero. Los ejemplos de restos de región marco conservada para modificar incluyen los que se unen de forma no covalente con el antígeno directamente (Amit *et al.* (1986) *Science* 233: 747-753); interaccionan con/efectúan la conformación de una CDR (Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917); y/o participan en la interfaz V_L - V_H (documento EP 239 400B1). En ciertas realizaciones, la modificación de uno de dichos restos de región marco conservada da como resultado una potenciación de la afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno de la segunda especie de mamífero. Por ejemplo, pueden alterarse de aproximadamente uno a aproximadamente cinco restos marco conservados en esta realización de la invención. En ocasiones, esto puede ser suficiente para producir un mutante de anticuerpo adecuado para su uso en ensayos preclínicos, incluso cuando no se ha alterado ninguno de los restos de región hipervariable. Normalmente, sin embargo, el mutante de anticuerpo comprenderá una alteración o alteraciones de región hipervariable adicionales.

Los restos de región hipervariable que se alteran pueden cambiarse aleatoriamente, especialmente cuando la afinidad de unión de partida del anticuerpo parental es tal que puedan explorarse fácilmente dichos mutantes de anticuerpo producidos de forma aleatoria.

Un procedimiento útil para generar dichos mutantes de anticuerpo se denomina "mutagénesis de exploración de

alanina" (Cunningham y Wells (1989) Science 244: 1081-1085). Aquí, se reemplazan uno o más de los restos de región hipervariable por restos de alanina o polialanina para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno de la segunda especie de mamífero. El resto o los restos de región hipervariable que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo mutaciones adicionales u otras en o para los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí misma esté predeterminada. Los mutantes de ala producidos de esta manera se exploran con respecto a su actividad biológica como se describe en el presente documento.

Normalmente se comenzaría con una sustitución conservativa tal como las mostradas posteriormente bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión), entonces se introducen más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la siguiente tabla, o como se describe adicionalmente posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y se exploran los productos. Las sustituciones preferidas se enumeran en la tabla a continuación.

Resto original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Se consiguen modificaciones aún más sustanciales en las propiedades biológicas de los anticuerpos seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) hidrófoba: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófila neutra: cys, ser, thr, asn, gln;
- (3) ácida: asp, glu;
- (4) básica: his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de cadena: gly, pro; y
- (6) aromática: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

En otra realización, los sitios seleccionados para modificación se maduran por afinidad usando presentación de fagos (véase anteriormente).

Se preparan moléculas de ácido nucleico que codifican mutantes de secuencia de aminoácidos por diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida), mutagénesis de PCR y mutagénesis de casete de una versión preparada previamente mutante o no mutante del anticuerpo parental. El método preferido para realizar mutantes es la mutagénesis dirigida (véase, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488).

En ciertas realizaciones, el mutante de anticuerpo tendrá solamente un único resto de región hipervariable sustituido. En otras realizaciones, se habrán sustituido dos o más de los restos de región hipervariable del anticuerpo parental, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente diez sustituciones de región hipervariable.

Habitualmente, el mutante de anticuerpo con propiedades biológicas mejoradas tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo parental, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85%, más preferentemente al menos 90% y más preferentemente al menos 95%. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir mismo resto) o similares (es decir restos de aminoácidos del mismo grupo basándose en propiedades de cadena lateral comunes, véase anteriormente) a los restos del anticuerpo parental, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. No se interpretará que ninguna de las extensiones, deleciones o inserciones N terminales, C terminales o internas en la secuencia del anticuerpo fuera del dominio variable afecten a la identidad o similitud de secuencia.

Después de la producción del mutante de anticuerpo, se determina la actividad biológica de esa molécula en relación con el anticuerpo parental. Como se ha observado anteriormente, esto puede implicar determinar la afinidad de unión y/u otras actividades biológicas del anticuerpo. En una realización preferida de la invención, se prepara un panel de mutantes de anticuerpo y se explora con respecto a la afinidad de unión por el antígeno tal como NPR1 o un fragmento del mismo. Uno o más de los mutantes de anticuerpos seleccionados de esta exploración inicial se someten opcionalmente a uno o más ensayos de actividad biológica adicionales para confirmar que el mutante o los mutantes del anticuerpo con afinidad de unión potenciada son de hecho útiles, por ejemplo, para estudios preclínicos.

El mutante o los mutantes de anticuerpo seleccionados de esta manera pueden someterse a modificaciones adicionales, con frecuencia dependiendo del uso pretendido del anticuerpo. Dichas modificaciones pueden implicar la alteración adicional de la secuencia de aminoácidos, fusión con el polipéptido o los polipéptidos heterólogos y/o modificaciones covalentes tales como las elaboradas posteriormente. Con respecto a alteraciones de secuencia de aminoácidos, se han elaborado anteriormente modificaciones ejemplares. Por ejemplo, cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del mutante de anticuerpo también puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el entrecruzamiento aberrante. Por el contrario, puede añadirse un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento de Fv). Otro tipo de mutante de aminoácido tiene un patrón de glucosilación alterado. Esto puede conseguirse suprimiendo uno o más restos de carbohidrato hallados en el anticuerpo y/o añadiendo uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glucosilación de anticuerpos es normalmente ligada a N o ligada a O. La ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato con la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de una de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxilo aminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Los anticuerpos anti-Factor D de la invención pueden producirse de forma recombinante, usando técnicas y materiales fácilmente obtenibles.

Para producción recombinante de un anticuerpo anti-Factor D, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla o sintetiza fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con ADN que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(i) Componente de secuencia señal

El anticuerpo de la presente invención puede producirse de forma recombinante no solamente directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N terminal de la proteína o el polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que se reconoce y se procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariontas que no reconocen y procesan la secuencia señal de anticuerpo nativo, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procarionta, seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o líderes de

enterotoxina II termoestable. Para secreción de levadura la secuencia señal nativa puede sustituirse por, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, líder de factor α (incluyendo líderes de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero así como líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN para dicha región precursora se liga en fase de lectura con ADN que codifica el anticuerpo.

(ii) *Componente de origen de replicación*

Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. En general, en vectores de clonación esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del hospedador, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias se conocen bien para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levadura y diversos orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. En general, el componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamíferos (el origen de SV40 puede usarse normalmente solamente porque contiene el promotor temprano).

(iii) *Componente de gen de selección*

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para bacilos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármaco y por tanto sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico de anticuerpo tal como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína-I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina decarboxilasa, etc.

Por ejemplo, se identifican en primer lugar células transformadas con el gen de selección de DHFR cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR.

Como alternativa, las células hospedadoras (particularmente hospedadores de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican anticuerpo, proteína de DHFR de tipo silvestre y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase Patente de Estados Unidos N° 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.* (1979) Nature 282: 39). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1. Jones (1977) Genetics 85: 12. La presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona después un ambiente eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. De forma similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan por plásmidos conocidos que aportan el gen *Leu2*.

Además, pueden usarse vectores derivados del plásmido circular de 1,6 μ m pKD1 para transformación de levaduras de *Kluyveromyces*. Como alternativa, se ha indicado un sistema de expresión para producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis*. Van den Berg (1990) Bio/Technology 8: 135. También se han desvelado vectores de expresión de múltiple copia estable para secreción de albúmina de suero humano recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces* Fleer *et al.* (1991). Bio/Technology 9: 968-975.

(iv) *Componente de promotor*

Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor que se reconoce por el organismo

hospedador y está unido operativamente con el ácido nucleico de anticuerpo. Los promotores adecuados para uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor *phoA*, β -lactamasa y sistemas de promotor de lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*), y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente con el ADN que codifica el anticuerpo.

Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia hallada 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan convenientemente en vectores de expresión eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuados para uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Se describen adicionalmente vectores y promotores adecuados para su uso en expresión de levadura en el documento EP 73.657. Los potenciadores de levadura también se usan provechosamente con promotores de levadura.

La transcripción de anticuerpo de vectores en células hospedadoras de mamífero se controlan, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y más preferentemente virus de Simio 40 (SV40) de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Se desvela un sistema para expresar ADN en hospedadores mamíferos usando el virus del papiloma bovino como un vector en la Patente de Estados Unidos Nº 4.419.446. Se describe una modificación de este sistema en la Patente de Estados Unidos Nº 4.601.978. Véase también Reyes *et al.* (1982) Nature 297: 598-601 en la expresión de ADNc de interferón β humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, puede usarse repetición terminal larga del virus del sarcoma de rous como el promotor.

(v) *Componente de elemento potenciador*

La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores se aumenta con frecuencia insertando una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen ahora muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv (1982) Nature 297: 17-18 acerca de elementos potenciadores para activación de promotores eucariotas. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante de anticuerpo, pero se localiza preferentemente en un sitio 5' del promotor.

(vi) *Componente de terminación de la transcripción*

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levadura, de hongos, de insectos, de plantas, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5', y ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

(vii) Selección y transformación de células hospedadoras

Son células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores las células procariotas, de levadura o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, Enterobacterias tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwunia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serruria*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P desvelado en el documento DD 266.710 publicado el 12 abril de 1989), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes.

Además de procariotas, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores codificantes de anticuerpo. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero común, es el usado más habitualmente entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, están disponibles habitualmente varios otros géneros, especies y cepas y son útiles en el presente documento tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Se derivan células hospedadoras adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovirales y variantes y células hospedadoras de insecto permisivas correspondientes de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Están públicamente disponibles diversas cepas bacterianas para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus pueden usarse como el virus en el presente documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También pueden utilizarse como hospedadores cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Son ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles la línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al.* (1977) J. Gen Virol. 36: 59); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216); células sertoli de ratón (TM4, Mather (1980) Biol. Reprod. 23: 243-251); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón de humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.* (1982) Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Se transforman células hospedadoras con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivar las células hospedadoras

Las células hospedadoras usadas para producir el anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en diversos medios. Medios disponibles en el mercado 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 cultivar las células hospedadoras. Además puede usarse cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.* (1979) Meth. Enz. 58: 44, Barnes *et al.* (1980) Anal. Biochem. 102: 255, Patentes de Estados Unidos Nº 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o Patente de Estados Unidos Re. 30.985 como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores del crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico, sales, tales como cloruro cálcico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que se conocerían por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las previamente usadas con la

célula hospedadora seleccionada para expresión, y resultarán evidentes para el experto habitual en la materia.

(ix) Purificación de anticuerpos

5 Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, los residuos en partículas, bien células hospedadoras o bien fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10: 163-167 describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, se descongela la pasta celular en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los residuos celulares pueden retirarse por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran primero en general usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpos preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Puede usarse proteína A para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas de $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.* (1983) *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.* (1986) *EMBO J.* 5: 1567-1575). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es con más frecuencia agarosa, pero están disponibles en otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que puede conseguirse con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para purificación. También están disponibles otras técnicas para purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio dependiendo del anticuerpo para recuperar.

Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferentemente realizado a concentraciones salinas bajas (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0,25 M).

2. Ensayos de exploración y modelos animales para identificar antagonistas del Factor D

40 Pueden evaluarse antagonistas del Factor D en diversos ensayos basados en células y modelos animales de enfermedades o trastornos asociados con el complemento.

Por lo tanto, por ejemplo, pueden obtenerse por ingeniería genética modelos animales recombinantes (transgénicos) introduciendo la parte codificante de los genes de interés en el genoma de animales de interés, usando técnicas convencionales para producir animales transgénicos. Los animales que pueden actuar como una diana para la manipulación transgénica incluyen, sin limitación, ratones, ratas, conejos, cobayas, ovejas, cabras, cerdos y primates no humanos, por ejemplo babuinos, chimpancés y otros monos. Las técnicas conocidas en este campo para introducir un transgén en dichos animales incluyen microinyección pronucleica (Hoppe y Wanger, Patente de Estados Unidos N° 4.873.191); transferencia génica mediada por retrovirus en líneas germinales (por ejemplo, Van der Putten *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6148-615 [1985]); dirección génica en células madre embrionarias (Thompson *et al.*, *Cell* 56, 313-321 [1989]); electroporación de embriones (Lo, *Mol. Cell. Biol.* 3, 1803-1814 [1983]); transferencia génica mediada por espermatozoide (Lavitrano *et al.*, *Cell* 57, 717-73 [1989]). Para una revisión, véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.736.866.

55 Para el fin de la presente invención, los animales transgénicos incluyen los que portan el transgén solamente en parte de sus células ("animales mosaico"). El transgén puede integrarse bien como un transgén individual, o bien en concatámeros, por ejemplo, tándem de cabeza a cabeza o de cabeza a cola. La introducción selectiva de un tipo celular particular también es posible siguiendo, por ejemplo, la técnica de Lasko *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 623-636 (1992).

60 La expresión del transgén en animales transgénicos puede controlarse por técnicas convencionales. Por ejemplo, puede usarse el análisis de transferencia de Southern o amplificación por PCR para verificar la integración del transgén. El nivel de expresión de ARNm puede después analizarse usando técnicas tales como hibridación *in situ*, análisis de transferencia de Northern, PCR o inmunohistoquímica.

65 Los animales pueden examinarse adicionalmente con respecto a señales de patología de enfermedad inmunitaria,

por ejemplo, por examen histológico para determinar la infiltración de células inmunitarias en tejidos específicos. También pueden realizarse experimentos de bloqueo en los que los animales transgénicos se tratan con un antagonista de Factor D candidato para determinar el alcance de los efectos en el complemento y la activación del complemento, incluyendo las rutas clásica y alternativa, o la proliferación de linfocitos T. En estos experimentos, se administran al animal anticuerpos de bloqueo que se unen con el polipéptido de la invención y se controla el efecto biológico de interés.

Como alternativa, pueden construirse animales “knock out” que tienen un gen defectuoso o alterado que codifica el Factor D, como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido del Factor D y ADN genómico alterado que codifica el mismo polipéptido introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, puede usarse ADNc que codifica el Factor D para clonar el ADN genómico que codifica el factor D de acuerdo con técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica el Factor D puede suprimirse o reemplazarse con otro gen, tal como un gen que codifica un marcado seleccionable que puede usarse para controlar la integración. Normalmente, se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante inalterado (en los extremos tanto 5’ como 3’) en el vector [véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51: 503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, por electroporación) y se seleccionan células en las que el ADN introducido ha recombinado de forma homóloga con el ADN endógeno [véase por ejemplo, Li *et al.*, *Cell*, 69: 915 (1992)]. Las células seleccionadas se inyectan después en un blastocisto de un animal (por ejemplo, un ratón o rata) para formar quimeras de agregación [véase, por ejemplo, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. Después puede implantarse un embrión quimérico en un animal de acogida hembra pseudoembarazada adecuado y llevarse al embrión al término para crear un animal “knock out”. La descendencia que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales puede identificarse por técnicas convencionales y usarse para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de forma homóloga. Los animales knockout pueden caracterizarse, por ejemplo, por su capacidad para defenderse contra ciertas afecciones patológicas y por su desarrollo de afecciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido del Factor D.

Por lo tanto, la actividad biológica de los antagonistas del Factor D potenciales puede estudiarse adicionalmente en ratones knock-out para el Factor D murino.

Un modelo animal de degeneración macular relacionado con la edad (DME) consiste en ratones con una mutación nula en genes *Ccl-2* o *Ccr-2*. Estos ratones desarrollan características clave de DME, incluyendo la acumulación de lipofusina en y drusas debajo del epitelio pigmentado retiniano (RPE), atrofia de fotorreceptores y neovascularización coroidal (NVC). Estas características se desarrollan más allá de los 6 meses de edad. Los antagonistas del Factor D candidatos pueden ensayarse con respecto a la formación de drusas, atrofia de los fotorreceptores y neovascularización coroidal.

3. Composiciones farmacéuticas

Los antagonistas del Factor D de la presente invención, incluyendo anticuerpos anti-Factor D y otras moléculas identificadas por los ensayos de exploración desvelados anteriormente, pueden administrarse para el tratamiento de afecciones oculares asociadas con el complemento en forma de composiciones farmacéuticas.

Se preparan formulaciones terapéuticas de un antagonista de Factor D de la invención, para almacenamiento mezclando la molécula activa que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington’s *Pharmaceutical Sciences* 16^a edición, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol, resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y *m*-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina del suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

También pueden usarse lipofecciones o liposomas para suministrar el polipéptido, anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, a células. Cuando se usen fragmentos de anticuerpo, se prefiere el fragmento más pequeño que se una específicamente con el dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas peptídicas que conserven la capacidad para unirse con la secuencia proteica diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse por tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7889-7893 [1993]).

Las moléculas activas también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coroidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones para usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos moldeados, por ejemplo películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido *L*-glutámico y γ -etil-*L*-glutamato, etilen-vinil-acetato no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etilen-vinil-acetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlaces S-S intermoleculares mediante intercambio de tio-disulfuro, puede conseguirse estabilización modificando restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

Los compuestos de la invención para prevención o tratamiento de una enfermedad o afección ocular se administran normalmente por inyección ocular, intraocular y/o intravítrea. También pueden usarse otros métodos de administración, que incluyen pero sin limitación, administración tópica, parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal e intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea.

Pueden prepararse formulaciones para administración ocular, intraocular o intravítrea por métodos y usando ingredientes conocidos en la técnica. Un requisito principal para el tratamiento eficaz es la penetración apropiada a través del ojo. A diferencia de enfermedades de la parte frontal del ojo, en las que los fármacos pueden suministrarse por vía tópica, las enfermedades retinianas requieren un enfoque más específico de sitio. Los colirios y las pomadas penetran pocas veces en el fondo del ojo, y la barrera hematoocular impide la penetración de fármacos administrados de forma sistémica al tejido ocular. En consecuencia, habitualmente el método elegido para el suministro de fármacos para tratar la enfermedad retiniana, tal como DME y NVC, es la inyección intravítrea directa. Las inyecciones intravítreas se repiten habitualmente a intervalos que dependen de la afección del paciente, y las propiedades y semivida del fármaco suministrado. Para penetración intraocular (por ejemplo intravítrea), se prefieren habitualmente moléculas de menor tamaño.

La eficacia del tratamiento de afecciones oculares asociadas con el complemento, tales como DME o NVC, puede medirse por diversos criterios de valoración usados habitualmente en la evaluación de las enfermedades intraoculares. Por ejemplo, puede evaluarse la pérdida de visión. La pérdida de visión puede evaluarse, pero sin limitación, por ejemplo, midiendo el cambio medio en la mejor agudeza visual de corrección (BCVA) de la línea basal hasta un punto temporal deseado (por ejemplo, en el que la BCVA se basa en el gráfico de la agudeza visual del estudio de la retinopatía diabética de tratamiento temprano (ETDRS) y evaluación a una distancia de ensayo de 4 metros), midiendo la proporción de sujetos que pierden menos de 15 letras de agudeza visual en un punto temporal deseado en comparación con la línea basal, midiendo la proporción de sujetos que obtienen más de o igual a 15 letras de agudeza visual en un punto temporal deseado en comparación con la línea basal, midiendo la proporción de sujetos con un equivalente de Snellen de agudeza visual de 20/2000 o peor en un punto temporal deseado, midiendo el cuestionario de funcionamiento visual del NEI, midiendo el tamaño del NVC y la cantidad de filtrado de NVC en un punto temporal deseado, por ejemplo, por la angiografía de fluoresceína, etc. Pueden realizarse evaluaciones oculares, por ejemplo, que incluyen, pero, por ejemplo, realizar un examen ocular, medir la presión intraocular, evaluar la agudeza visual, medir la presión de lámpara de hendidura, evaluar la inflamación intraocular, etc.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos solamente, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplos

Se usaron reactivos disponibles en el mercado indicados en los ejemplos de acuerdo con las instrucciones del fabricante a no ser que se indique de otro modo. La fuente de las células identificadas en los siguientes ejemplos, y en toda la memoria descriptiva, por números de referencia de ATCC es la Colección Americana de Cultivos Tipo 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

Ejemplo 110 Preparación y ensayo de anticuerpo anti-Factor DMétodos:15 Preparación de humor vítreo y membrana de Bruch para análisis de proteínas

Se descongelaron ojos de cadáveres con DME y no DME humanos y se retiró el segmento anterior junto con el humor vítreo, la retina y el RPE. El humor vítreo se recogió en microtubos, se congeló en hielo seco y se almacenó a -70 °C hasta su procesamiento posterior. La capa coroide de la membrana de Bruch se desprendió del semiglobo posterior (Crabb, J.W. *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A., 99: 14682-7 (2002)) y se aislaron muestras trepanadas de 4 mm o 6 mm de la región macular y central circundante para análisis posterior. Véase la tabla de sumario adjunta (Tabla 2) de las preparaciones de membrana de Bruch, edad, sexo, estadio de ADM, notas de disección y cantidades usadas para análisis proteómico. Una muestra trepanada, de 4 mm de diámetro, se usó para análisis de los niveles de proteína de Factor D del complemento. La muestra se sonicó durante 10 min en Diluyente de Ensayo (PBS / BSA al 0,5 % / Tween-20 al 0,5 %) y las fracciones solubles e insolubles se separaron por centrifugación durante 10 min a 5000 rpm. La fracción soluble se usó para los ensayos de ELISA.

Generación de anticuerpos monoclonales para el Factor D humano

Se generaron anticuerpos monoclonales para el factor D humano inyectando 2 µg del factor D (Comptech, Taylor, TX) en adyuvante de monofosforil lípido A/trehalosa dicorinomicolato (Corixa, Hamilton, MT) en las almohadillas plantares de ratones Balb/c 11 veces. Se fusionaron ganglios linfáticos poplíteos de ratones con células de mieloma P3X63Ag.U.1. Se exploraron células de hibridoma contra el factor D murino con respecto a afinidad de unión. Las líneas celulares productoras de anticuerpo se clonaron por dilución limitante.

35 Ensayos de hemólisis

Para determinar la actividad de la ruta alternativa, se lavaron eritrocitos de conejo (Er, Colorado Serum) 3x en GVB y se resuspendieron a 2×10^9 /ml. Los inhibidores (50 µl) y 20 µl de suspensión de Er se mezclaron 1:1 con GVB/EGTA 0,1 M / MgCl₂ 0,1 M. Se inició la actividad del complemento mediante la adición de suero humano desprovisto de Glq (Quidel; 30 µl diluido 1:3 en GVB). Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 200 µl de GVB/EDTA 10 mM para detener la reacción y las muestras se centrifugaron durante 5 min a 500 g. La hemólisis se determinó en 200 µl de sobrenadante midiendo la absorbancia a 412 nm. Los datos se expresaron como % de hemólisis inducida en ausencia del inhibidor. Para determinar el efecto del anticuerpo del Factor D en la ruta clásica del complemento, se siguió un procedimiento similar excepto que Er se reemplazó con eritrocitos de oveja recubiertos con IgM (E-IgM, Comp Tech) y el ensayo se realizó en suero humano deficiente en factor B en GVB++.

ELISA de Factor D humano

Se diluyó anticuerpo policlonal (pAb9) de cabra anti-Factor D de complemento humano (R&D Systems, Minneapolis, MN) hasta 1 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se usó para recubrir placas de ELISA (384 pocillos, placas de alta unión, Greiner Bio One a través de VWR International, Bridgepoint, Nueva Jersey) durante una incubación de una noche a 4 °C. Después de lavar 3 veces con tampón de lavado (PBS / Tween-20 0,05 %), las placas se bloquearon con PBS / albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5 % durante 1 a 2 horas. Esta y todas las otras incubaciones se realizaron a temperatura ambiente en un agitador orbital. Se diluyeron muestras de lisado de humor vítreo humano y membrana de Bruch usando Diluyente de Ensayo (PBS / BSA 0,5 % / Tween-20 0,05 %). Usando el mismo tampón, se prepararon las diluciones en serie de la curva patrón (15,6 pg/ml – 1.000 pg/ml) del factor D (Complement Technology, Inc., Tyler, Texas). Se descongelaron las muestras de control congeladas pre-diluidas para cuantificar en las regiones alta, media y baja de la curva patrón. Después de la etapa de bloqueo, las placas se lavaron y las muestras, patrones y controles se añadieron y se incubaron durante 2 horas. Las placas se lavaron, y se diluyó el anticuerpo monoclonal anti-Factor D humano biotinilado 9G7.1.16 a 62,5 ng/ml y se añadió a las placas durante una incubación de 1 a 2 horas. Se diluyó peroxidasa de rábano rusticano-estreptavidina (SA-HRP) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 1/10.000 en diluyente de Ensayo y se añadió a las placas lavadas. Después de una incubación de 30 minutos y una etapa de lavado final, se añadió tetrametil bencidina (TMB) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) y se reveló el color durante 5 a 7 minutos. Finalmente, la

reacción se detuvo añadiendo ácido fosfórico 1 M. Se obtuvo la densidad óptica usando un lector de microplacas (450 nm, referencia de 650 nm) y se calcularon las concentraciones de muestra de ajustes de 4 parámetros de las curvas patrón. Las concentraciones cuantificables mínimas del factor D en muestras de lisado de membrana de Bruch y humor vítreo humano, fueron de 780 pg/ml (dilución mínima 1/50) y 156 pg/ml (dilución mínima 1/10), respectivamente.

Imunohistoquímica

Se congelaron muestras de membrana de Bruch en compuesto OCT, y se cortaron secciones de 7 µm en un criomicrotomo. Inmunotinción. Se fijaron secciones en Acetona durante 5 minutos después de seccionar y se almacenaron a -80 °C hasta que estuvieron listas para su tinción. Los portaobjetos congelados se aclararon en PBS 2 veces, seguido de 2 aclarados con Solución Salina Tamponada con Fosfato que contenía Tween 0,1 % (TBST). Se bloqueó avidina y biotina endógena con el Kit de Bloqueo de Biotina y Avidina de Vector (SP-2001) a temperatura ambiente siguiendo las directrices del fabricante. Las secciones se aclararon en TBST, 2 cambios, 5 minutos cada uno y se bloquearon inmunoglobulinas endógenas con suero de caballo al 10 % en BSA/PBS al 3 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con anticuerpo anti-Factor D humano (9G7.1.16) diluido a 10 µg/ml en suero de caballo al 10 % durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se usó IgG2a de Ratón sin tratamiento previo a 10 µg/ml (Pharmingen) como control negativo. Después de aclarar en TBST, 2 cambios, 5 minutos cada uno, se incubaron las secciones con anticuerpo anti-ratón de caballo biotinilado (Vector) diluido a 2,5 µg/ml (1:200) en suero de caballo durante 30 minutos. Las secciones se aclararon en TBST, 2 cambios, 5 minutos cada uno y se incubaron con Reactivo Vectastain ABC-AP Elite durante 30 minutos a temperatura ambiente, se aclararon en TBST (2 cambios, 5 minutos cada uno) y se incubaron en solución Vector Red recién preparada. Vector Red se preparó de la siguiente manera: para Tris HCl 200 mM, diluir Tris HCl 1 M 1:5 en dH₂O (1 parte de Tris HCl y 4 partes de dH₂O). Mezclar 1 gota de Levamisol en cada 5 ml de solución 200 mM de Tris HCl recién preparado. Mezclar 2 gotas de reactivos 1, 2 y 3 del kit de Vector Red individualmente en cada 5 ml de solución de Tris HCl Levamisol 200 mM. Usar en un periodo de 5-10 minutos desde la adición del Reactivo 3 del kit de Vector Red. Las secciones se aclararon en H₂O y se contratiñeron con hematoxilina de Mayer sumergiendo en hematoxilina durante 10-15 inmersiones (20-30 segundos), se aclararon con agua y azul, y se aclararon bien en agua corriente durante 5 minutos para retirar por lavado el reactivo de coloración azul. Las secciones se montaron con solución de Montaje Crystal y se dejaron secar durante una noche. Los portaobjetos cubiertos con montaje Crystal seco se sumergieron en Xilenos y se cubrieron con cubreobjetos usando medio de montaje permamount.

Clonación de la cadena pesada y ligera de 20D12

Se extrajo ARN total de células de hibridoma productoras del 20D12 monoclonal anti-Factor D humano de ratón, usando el Mini Kit RNeasy (Qiagen, Alemania). Los dominios ligero variable (VL) y pesado variable (VH) se amplificaron usando RT-PCR con los siguientes cebadores degradados:

Directo de cadena ligera (LC):

5'GATCGATATCGTRATGACHCARTCTCA3' (SEC ID N°: 4)

Inverso de cadena ligera:

5'TTTDAKYTCCAGCTTGGTACC3' (SEC ID N°: 5)

Directo de cadena pesada (HC): 5'GATCCGTACGCTCAGGTYCARYTGCARCARTCTGG3' (SEC ID N°: 6)

Inverso de cadena pesada: 5'ACAGTGGGCCCTTGGTGGAGGCTGMRGAGACDGTGASHRDRGT3' (SEC ID N°: 7)

Los cebadores directos fueron específicos para la secuencia de aminoácidos N terminal de la región VL y VH. Respectivamente, los cebadores inversos de LC y HC se diseñaron para hibridar con una región en el dominio constante ligero (CL) y constante pesado 1 (CH1), que está altamente conservado entre especies.

Se clonó VL amplificado en un vector de expresión de células de mamífero pRK (Shields *et al.*, J Biol Chem 2000; 276: 6591-604), que contenía el dominio constante kappa humano. Se insertó VH amplificada en un vector de expresión de células de mamífero pRK que codificaba el dominio constante IgG1 humano de longitud completa. Por lo tanto, se cambió el formato de 20D112 a una quimera IgG1 de ratón-ser humano.

Se considera que la memoria descriptiva escrita anterior es suficiente para permitir a un experto en la materia practicar la invención. La presente invención no se limita en alcance por la construcción depositada, ya que se pretenden que la realización depositada sea una ilustración individual de ciertos aspectos de la invención.

El depósito de material en el presente documento no constituye una admisión de que la descripción escrita en el presente documento sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni debe interpretarse como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones

específicas que representa.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> GENENTECH, INC.
HASS, PHILLIP
JIANPING, YIN
KATSCHKE, KENNETH JR.
10 STEFFEK, MICAH
WIESMANN, CHRIS
VAN LOOKEREN CAMPAGNE, MENNO

<120> PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE AFECCIONES OCULARES ASOCIADAS CON EL
15 COMPLEMENTO

<130> GNE-0244 PCT

<140> Aún no asignado
20 <141> Con la presente

<150> 60/939.791
<151> 23-05-2007

<160> 7
25

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1
30 <211> 233
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 1

ES 2 533 242 T3

Met₁ Gly Trp Ser Cys₅ Ile Ile Leu Phe Leu₁₀ Val Ala Thr Ala Thr Gly₁₅
 Val His Ser Asp₂₀ Ile Val Met Thr Gln₂₅ Ser Gln Lys Phe Met₃₀ Ser Thr
 Ser Val Gly₃₅ Asp Arg Val Ser Val₄₀ Thr Cys Lys Ala Ser₄₅ Gln Asn Val
 Asp Thr Asp Val Ala Trp Phe₅₅ Gln Gln Lys Pro Gly₆₀ Gln Ser Pro Arg
 Gly₆₅ Leu Ile Tyr Ser Ala₇₀ Ser Ser Arg Tyr Ser₇₅ Gly Val Pro Asp Arg₈₀
 Phe Thr Gly Ser Gly₈₅ Ser Gly Thr Asp Phe₉₀ Thr Leu Thr Ile Ser₉₅ Asn
 Val Gln Ser Glu₁₀₀ Asp Leu Ala Glu Tyr₁₀₅ Phe Cys Gln Gln Tyr₁₁₀ Asn Asn
 Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly₁₂₀ Thr Lys Val Glu Ile₁₂₅ Lys Arg Thr
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe₁₃₅ Ile Phe Pro Pro Ser₁₄₀ Asp Glu Gln Leu
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser₁₅₀ Val Val Cys Leu Leu₁₅₅ Asn Asn Phe Tyr Pro₁₆₀
 Arg Glu Ala Lys Val₁₆₅ Gln Trp Lys Val Asp₁₇₀ Asn Ala Leu Gln Ser Gly₁₇₅
 Asn Ser Gln Glu₁₈₀ Ser Val Thr Glu Gln₁₈₅ Asp Ser Lys Asp Ser₁₉₀ Thr Tyr
 Ser Leu Ser₁₉₅ Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr₂₀₅ Glu Lys His
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val₂₁₅ Thr His Gln Gly Leu₂₂₀ Ser Ser Pro Val
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 2
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 2

5

ES 2 533 242 T3

Met₁ Gly Trp Ser Cys₅ Ile Ile Leu Phe Leu₁₀ Val Ala Thr Ala Thr₁₅ Gly
 Ala Tyr Ala Gln₂₀ Val Gln Leu Gln₂₅ Ser Gly Ala Glu Leu₃₀ Val Lys
 Pro Gly Ala₃₅ Ser Val Lys Leu Ser₄₀ Cys Lys Ala Ser Gly₄₅ Tyr Thr Phe
 Thr Ser₅₀ Tyr Tyr Met Tyr Trp₅₅ Val Lys Glu Arg Pro₆₀ Gly Gln Gly Leu
 Glu₆₅ Trp Ile Gly Glu Ile₇₀ Asn Pro Thr Asn Gly₇₅ Gly Thr Asn Phe Asn₈₀
 Glu Lys Phe Lys Ser₈₅ Lys Ala Thr Leu Thr₉₀ Val Asp Thr Ser Ser₉₅ Asn
 Thr Ala Tyr Met₁₀₀ Gln Leu Ser Ser Leu₁₀₅ Thr Ser Glu Asp Ser₁₁₀ Ala Val
 Tyr Tyr Cys₁₁₅ Ala Arg Glu Gly₁₂₀ Gly Phe Ala Tyr Trp Gly₁₂₅ Gln Gly Thr
 Leu Val₁₃₀ Thr Val Ser Ala Ala₁₃₅ Ser Thr Lys Gly Pro₁₄₀ Ser Val Phe Pro
 Leu₁₄₅ Ala Pro Ser Ser Lys₁₅₀ Ser Thr Ser Gly Gly₁₅₅ Thr Ala Ala Leu Gly₁₆₀
 Cys Leu Val Lys Asp₁₆₅ Tyr Phe Pro Glu Pro₁₇₀ Val Thr Val Ser Trp₁₇₅ Asn
 Ser Gly Ala Leu₁₈₀ Thr Ser Gly Val His₁₈₅ Thr Phe Pro Ala Val₁₉₀ Leu Gln
 Ser Ser Gly₁₉₅ Leu Tyr Ser Leu Ser₂₀₀ Ser Val Val Thr Val₂₀₅ Pro Ser Ser
 Ser Leu₂₁₀ Gly Thr Gln Thr Tyr₂₁₅ Ile Cys Asn Val Asn₂₂₀ His Lys Pro Ser
 Asn Thr Lys Val Asp Lys₂₃₀ Lys Val Glu Pro Lys₂₃₅ Ser Cys Asp Lys Thr₂₄₀
 His Thr Cys Pro₂₄₅ Cys Pro Ala Pro Glu₂₅₀ Leu Leu Gly Gly₂₅₅ Pro Ser
 Val Phe Leu Phe₂₆₀ Pro Pro Lys Pro Lys₂₆₅ Asp Thr Leu Met Ile₂₇₀ Ser Arg
 Thr Pro Glu₂₇₅ Val Thr Cys Val Val₂₈₀ Val Asp Val Ser His₂₈₅ Glu Asp Pro
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

ES 2 533 242 T3

290 295 300
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 325 330 335
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 340 345 350
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 355 360 365
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 370 375 380
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 3
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3

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

10

Pro Gly Thr Leu Cys Asp Val Ala Gly Trp Gly Val Val Thr His Ala
 145 150 155 160
 Gly Arg Arg Pro Asp Val Leu His Gln Leu Arg Val Ser Ile Met Asn
 165 170 175
 Arg Thr Thr Cys Asn Leu Arg Thr Tyr His Asp Gly Val Val Thr Ile
 180 185 190
 Asn Met Met Cys Ala Glu Ser Asn Arg Arg Asp Thr Cys Arg Gly Asp
 195 200 205
 Ser Gly Ser Pro Leu Val Cys Gly Asp Ala Val Glu Gly Val Val Thr
 210 215 220
 Trp Gly Ser Arg Val Cys Gly Asn Gly Lys Lys Pro Gly Val Tyr Thr
 225 230 235 240
 Arg Val Ser Ser Tyr Arg Met Trp Ile Glu Asn Ile Thr Asn Gly Asn
 245 250 255

Met Thr Ser

5 <210> 4
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

10 <400> 4
 gatcgatatc gtrtgachc artctca 27
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

20 <400> 5
 ttttdakytcc agcttggtac c 21
 <210> 6
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

30 <400> 6
 gatccgtacg ctcaggttyca rytgcarcar tctgg 35
 <210> 7
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

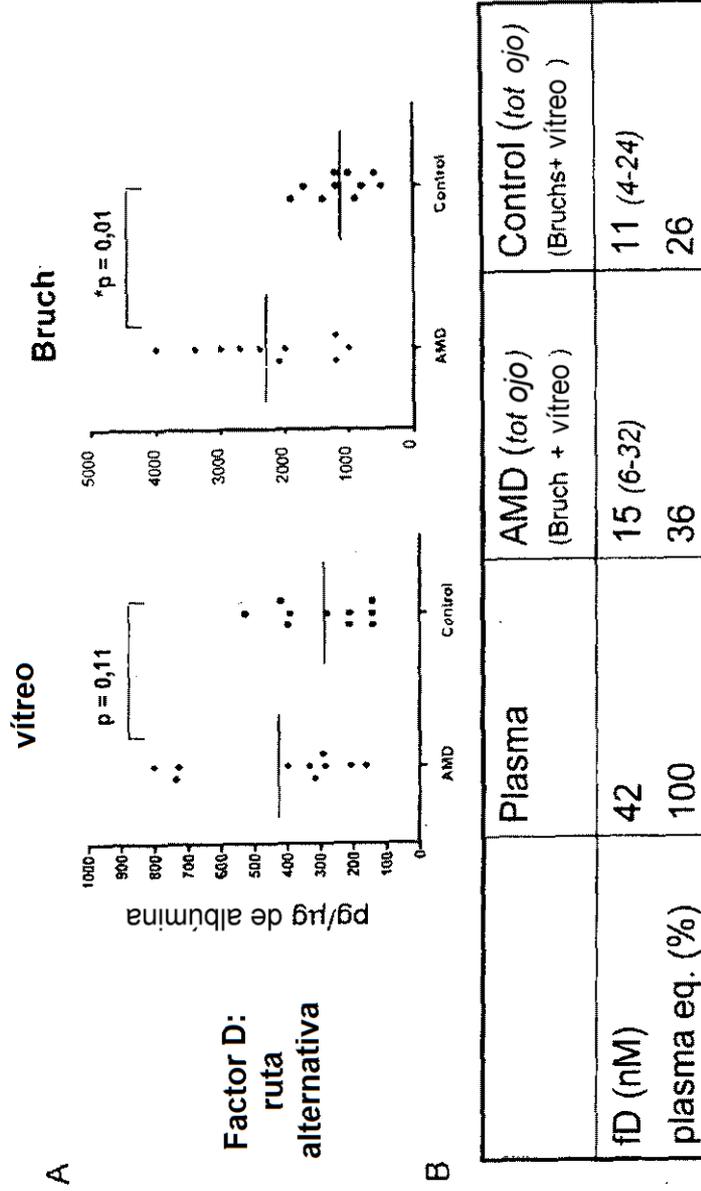
35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

40 <400> 7
 acagtgggcc cttggtggag gctgmrgaga cdgtgashrd rgt 43

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo antagonista anti-Factor D o un fragmento de unión a antígeno del mismo para uso en un método para la prevención o el tratamiento de una afección ocular asociada con el complemento en un ser humano, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno son:
- 10 (i) anticuerpo 20D12 que tiene las secuencias de cadena ligera y pesada mostradas en SEC ID N° 1 y 2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; o
- (ii) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que compite en un ensayo de bloqueo cruzado con el anticuerpo de (i) por la unión con el epítipo con el que se une el anticuerpo de (i) y que se une con el sitio activo del Factor D y/o se une con un epítipo que incluye restos de sitios activos del Factor D.
- 15 2. El anticuerpo antagonista anti-Factor D o el fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que es una variante del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno de (i) que tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia con las secuencias de dominio variable del mismo.
- 20 3. El anticuerpo antagonista anti-Factor D o el fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprenden las secuencias de CDR de cadena pesada y ligera (definidas de acuerdo con Kabat) del anticuerpo de (i).
- 25 4. El anticuerpo antagonista anti-Factor D o el fragmento de unión a antígeno para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico o fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 30 5. El fragmento de anticuerpo de unión a antígeno antagonista anti-Factor D para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que se selecciona del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, (scFv)₂, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios, minicuerpos, diacuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.
- 35 6. El fragmento de anticuerpo de unión a antígeno antagonista anti-Factor D para uso de acuerdo con la reivindicación 5, que es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, scFv o (scFv)₂.
7. El anticuerpo antagonista anti-Factor D o el fragmento de unión a antígeno para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que se unen con el Factor D humano con un valor de K_d de no más de 5 nM.
- 40 8. El anticuerpo antagonista anti-Factor D o el fragmento de unión a antígeno para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la afección ocular asociada con el complemento se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad (DME), neovascularización coroïdal (NVC), uveítis, retinopatías diabéticas y otras relacionadas con la isquemia, edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, Oclusión de la Vena Retiniana Central (OVEC), neovascularización corneana y neovascularización retiniana.
- 45 9. El anticuerpo antagonista anti-Factor D o el fragmento de unión a antígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha afección ocular asociada con el complemento es DME seca.
- 50 10. El anticuerpo antagonista anti-Factor D o el fragmento de unión a antígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha afección ocular asociada con el complemento es DME húmeda.
11. El uso de un anticuerpo antagonista anti-Factor D o de un fragmento de unión a antígeno del mismo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección ocular asociada con el complemento.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la afección ocular asociada con el complemento es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.

Expresión de factor D aumentada en membrana de Bruch de ojos con DME



Factor D:
ruta
alternativa

Figura 1

El factor D está presente en drusa, Bruch
y coroide en un donante de DME

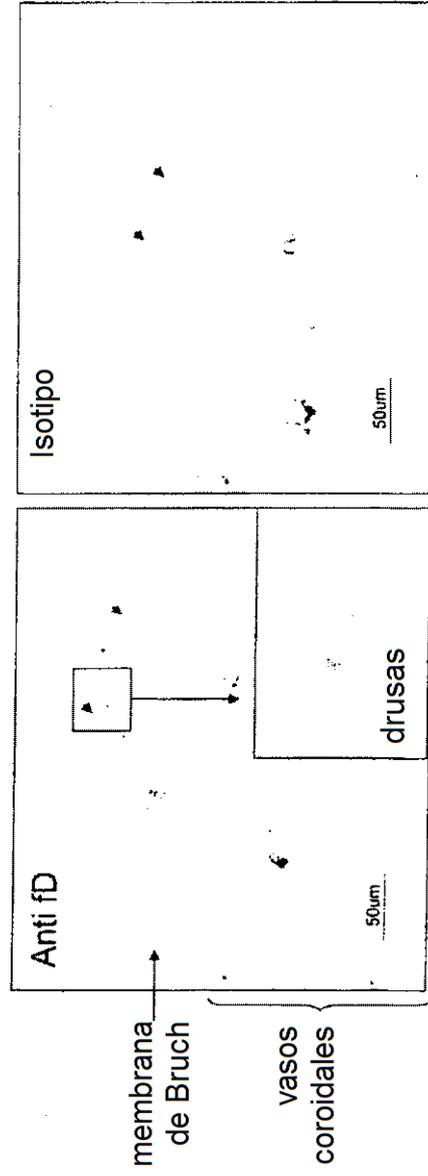
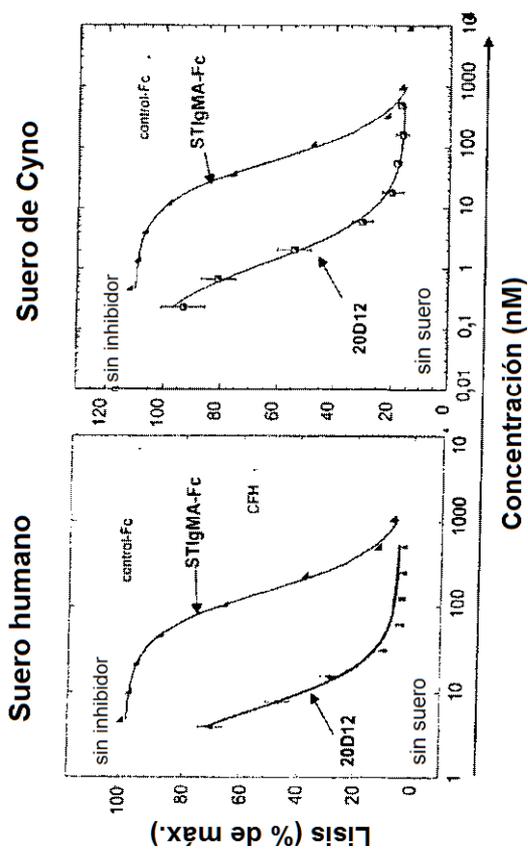


Figura 2

Caracterización del clon de anticuerpo de factor D 20D12

ES 2 533 242 T3

Resultados del ensayo de hemólisis de AP



epítipo	CI50 (nM)	Relación*	CI90 (nM)
20D12 B	1,3	0,02	9,3

* Relación CI50 α fD/STIgMA-Fc

Figura 3

Secuencia del anticuerpo 20D12

Secuencia de cadena ligera de 20D12

MGWSCIIILFLVATATGVHSDIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVDTID
VAVFQQKPGQSPRGLIYSASSRYSQVDPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDL
AEYFCQQYNNYPLTFGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTSKADY
EKHVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de cadena pesada de 20D12

MGWSCIIILFLVATATGAYAQVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSY
YMYWVKERPQGLEWIGEINPTNGGTFNNEKFKSKATLTVDTSSNTAYMQ
LSSLTSEDSAVVYCARREGGFAYWGGGLVTVSAASTKGPSVFPPLAPSSKS
ISGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHY
TQKLSLSLSPGK

Figura 4

Sumario del mapeo de epítomos y resultados del ensayo de potencia

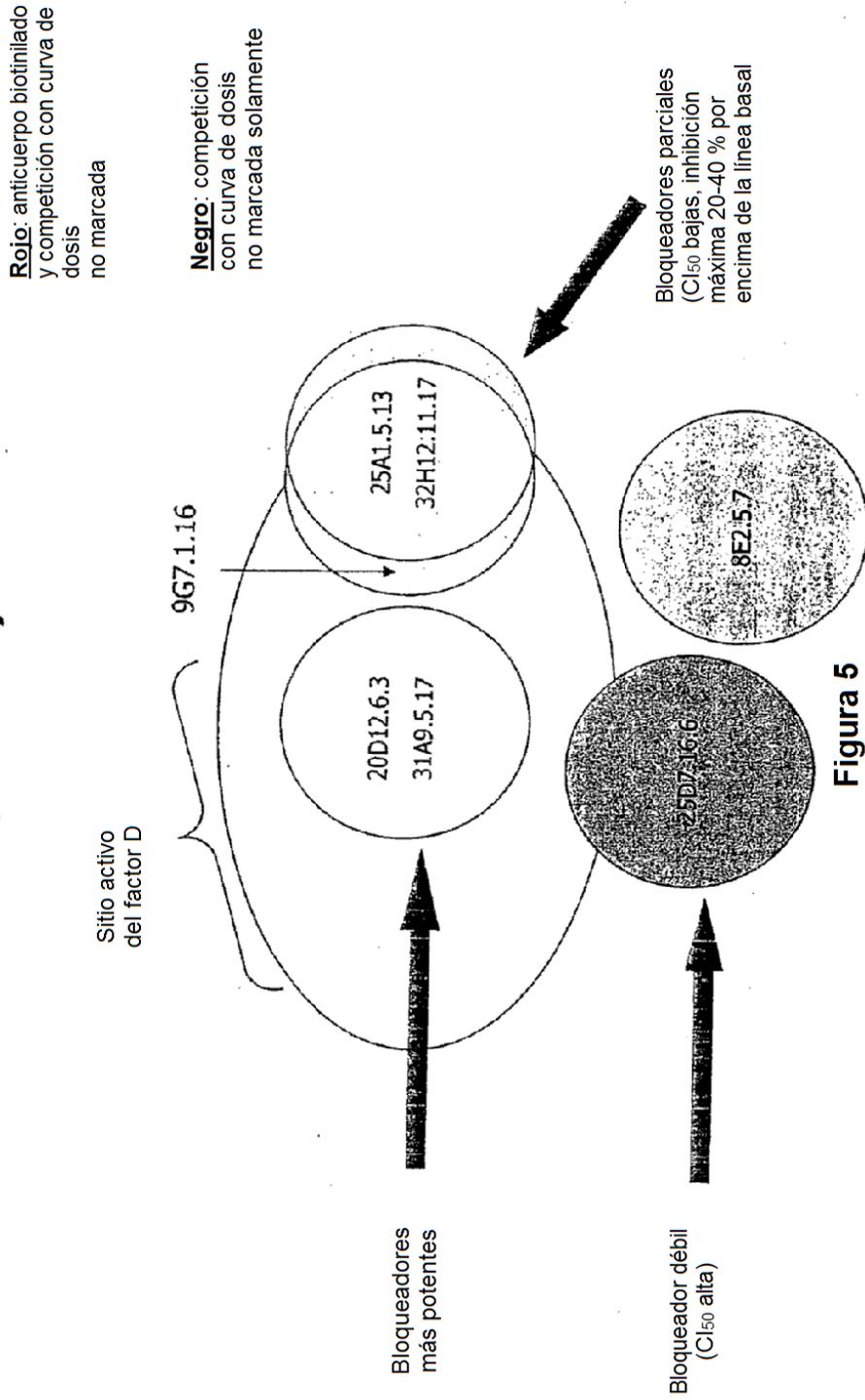


Figura 6

Factor D del complemento humano (NP_038487.1)

```
I MHSSVYFVAL VILGAAVCAA QPRGRILGGQ EAAAHARPYM
 41 ASVQVNGTHV CGGTLLEQW VLSAAHCMDG VTDDDSVQVL
 81 LGAHLSLAPF PYKRWYDVQS VVPHPGSRPD SLEDDLILFK
121 LSQNASLGPH VRPLPLQYED KEVEPGTLCV VAGWGVVTHA
161 GRRPDVLHQL RVSIMNRTTC NLRTYHDGTV TINMMCAESN
201 RRDTCRGDSG SPLVCGDAVE GVVTWGSRVC GNGKKPGVYT
 241 RVSSYRMWIE NITNGNMTS
```

Análisis de componentes del complemento en DME

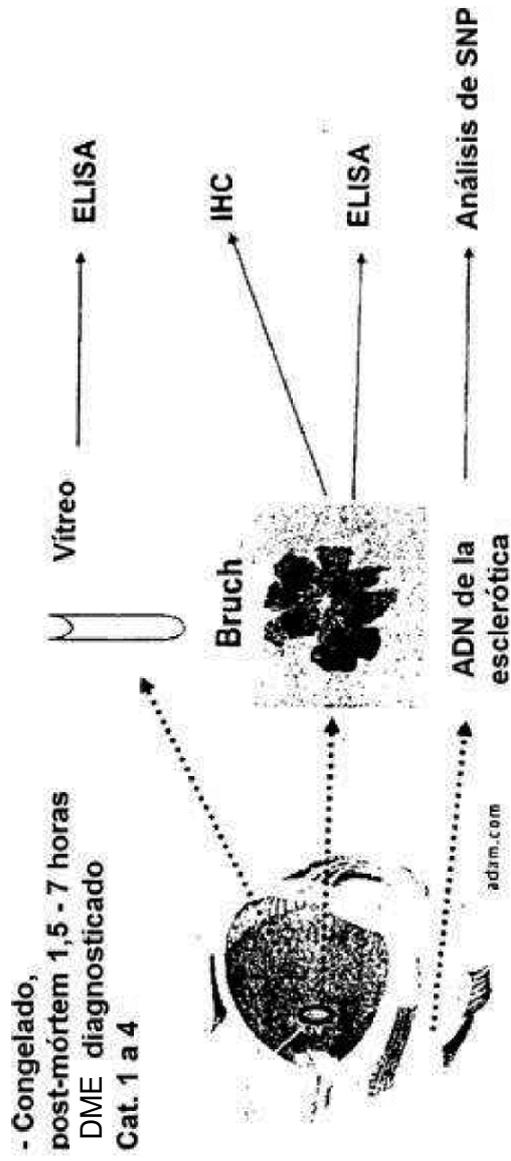


Tabla 1

Tejidos donantes usados en los estudios

Genentech N°	Edad	Sexo	Estado de DME	Notas de disección
1	76	F	3	Cicatriz de la fovea, pocas drusas maculares FS
1A	78	F		Sin drusas evidentes
2	85	M	4	Atrofia geográfica GA
2A	85	F		Sin drusas evidentes
3	87	F	4	Cicatriz fibrovascular en la fovea FS
3A	87	F		Sin drusas evidentes
4	76	M	4	Atrofia geográfica GA
4A	74	M		Dos drusas pequeñas presentes
5	81	F	3+	Drusas maculares moderadas MD
5A	81	M		Sin drusas evidentes
6	84	F	3	Numerosas drusas maculares MD
6A	86	M		Sin drusas evidentes
7	83	F	4	Cicatriz fibrovascular en la fovea FS
7A	83	M		Sin drusas evidentes
8	72	M	4	Cicatriz de la fovea, drusas maculares moderadas FS
8A	71	F		Sin drusas evidentes
9	81	F	4	Cicatriz de la fovea, drusas maculares moderadas FS
9A	83	M		Sin drusas evidentes
10	77	M	3	Numerosas drusas maculares MD
10A	78	M		Sin drusas evidentes

- Atrofia geográfica
- Cicatriz de la fovea
- DME de estado 3

Tabla 2