

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 202**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2006 E 12172001 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2500030**

54 Título: **Uso de inhibidores de la vía del complemento para tratar enfermedades oculares**

30 Prioridad:

04.11.2005 US 733763 P

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

16.11.2015

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

FUNG, SEK CHUNG y
YAO, ZHENGBIN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 551 202 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

Uso de inhibidores de la vía del complemento para tratar enfermedades oculares

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere a la inhibición de la vía del complemento, particularmente Factor D, en pacientes que padecen afecciones oculares relacionadas y enfermedades asociadas con la activación del complemento tal como la degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética.

Antecedentes de la invención

- 10 La degeneración macular es una expresión clínica que se utiliza para describir una familia de enfermedades que se caracterizan por una pérdida progresiva de la visión central asociada con anomalías de la membrana de Bruch, la coroides, la retina neural y/o el epitelio pigmentario de la retina. En el centro de la retina se encuentra la mácula lútea, que es aproximadamente 1/3 a 1/2 cm de diámetro. La mácula proporciona la visión detallada, en particular en el centro (la fovea), dado que los conos son más altos en densidad. Los vasos sanguíneos, células ganglionares, la capa nuclear interna y las células, y las capas plexiformes están desplazadas hacia un lado (en lugar de reposando sobre), permitiendo de este modo a la luz un camino más directo a los conos. Debajo de la retina se encuentra el
- 15 coroides, una colección de vasos sanguíneos incrustados dentro de un tejido fibroso, y el epitelio pigmentado (PE), que se superpone a la capa de la coroides. Los vasos sanguíneos coroides proporcionan nutrición a la retina (en particular sus células visuales). La coroides y el PE se encuentran en la parte posterior del ojo.

- 20 Las células de la retina del epitelio pigmentario (RPE), que componen el PE, producen, almacenan y transportan una diversidad de factores que son responsables de la función normal y la supervivencia de los fotorreceptores. Estas células multifuncionales transportan metabolitos a los fotorreceptores de su suministro de sangre, la corio capilaris del ojo. Células de la RPE también funcionan como macrófagos, fagocitando las puntas de los segmentos externos de bastones y conos, que se producen en el curso normal de la fisiología celular. Diversos iones, proteínas y agua se mueven entre las células de la RPE y el espacio interfotorreceptor, y estas moléculas afectan, en última instancia, al metabolismo y a la viabilidad de los fotorreceptores.

- 25 La degeneración macular relacionada con la edad (AMD), la degeneración macular más frecuente, se asocia con la pérdida progresiva de la agudeza visual en la parte central del campo visual, cambios en la visión del color y adaptación y sensibilidad a la oscuridad anormal. Se han descrito dos principales manifestaciones clínicas de AMD tal como la forma seca o atrófica, y la forma húmeda o exudativa. La forma seca se asocia con la muerte celular atrófica de la retina o mácula central, que es necesaria para la visión fina utilizada para actividades como leer,
- 30 conducir o reconocer caras. Alrededor del 10-20% de estos pacientes con AMD seca progresan a la segunda forma de AMD, conocido como la AMD húmeda.

- 35 La AMD húmeda (neovascular / exudativa) es provocada por un crecimiento anormal de los vasos sanguíneos detrás de la retina por debajo de la mácula y la fuga vascular, dando como resultado el desplazamiento de la retina, hemorragia y formación de cicatrices. Esto resulta en un deterioro de la visión a lo largo de un periodo de meses a años. Sin embargo, los pacientes pueden sufrir una rápida pérdida de visión. Todos los casos de AMD húmeda se originan a partir de la AMD seca avanzada. La forma húmeda representa el 85% de la ceguera debido a AMD. En la AMD húmeda, como los vasos sanguíneos dejan escapar fluido y sangre, se forma tejido cicatricial que destruye la retina central.

- 40 Los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de ambas formas son la edad y la deposición de las drusas, depósitos extracelulares anormales, detrás del epitelio pigmentario de la retina. Las drusas provocan un estiramiento lateral de la monocapa de RPE y el desplazamiento físico de la RPE de su suministro vascular inmediato, el coriocapilar. Este desplazamiento crea una barrera física que pueda impedir metabolito normal y la difusión de residuos entre el coriocapilar y la retina. Las drusas son los depósitos distintivos asociados con AMD. La biogénesis de drusas implica una disfunción de la RPE, una digestión alterada de los segmentos externos de los
- 45 fotorreceptores y la acumulación de subsiguientes desechos. Las drusas contienen activadores del complemento, inhibidores, fragmentos del complemento específico de la activación, y componentes de la vía terminal, incluyendo el complejo de ataque a la membrana (MAC o C5b-9), lo que sugiere que la concentración focal de estos materiales puede producir un poderoso estímulo quimiotáctico para los leucocitos que actúan a través de una cascada del complemento (Killingsworth, et al., (2001) Exp Eye Res 73, 887-96). Estudios recientes han implicado la inflamación local y la activación de la cascada del complemento en su formación (Bok D. Proc Natl Acad Sci (USA). 2005; 102: 7053-4; Hageman GS, et al. Prog Retin Res Eye. 2001; 20: 705-32; Anderson DH, et al. Am J Ophthalmol. 2002; 134: 411-31. Johnson LV, et al. Exp Eye Res. 2001; 73: 887-96).
- 50

- 55 La AMD húmeda se asocia con la neovascularización coroidea (CNV) y es un proceso biológico complejo. La patogénesis de la formación de nuevos vasos coroidea es poco conocida, pero se piensa que es importante utilizar factores tales como inflamación, isquemia y la producción local de factores angiogénicos. Aunque se ha sugerido que la inflamación juega un papel, el papel de complemento no ha sido explorado. Un estudio preliminar de la CNV se ha demostrado que es provocada por la activación del complemento en un modelo de ratón (Bora PS, J Immunol. 2005; 174: 491-497).

El sistema del complemento es un componente crucial de la inmunidad innata contra la infección microbiana y comprende un grupo de proteínas que normalmente están presentes en el suero en un estado inactivo. Estas proteínas están organizadas en tres vías de activación: la clásica, la lectina y las vías alternativas (V.M. Holers, En *Clinical Immunology: Principles and Practice*, comp. R.R. Rich, Mosby Press; 1996, 363-391). Las moléculas en la superficie de los microbios pueden activar estas vías que resultan en la formación de complejos de proteasa conocidos como C3-convertasas. La vía clásica es una cascada dependiente de calcio/magnesio, que normalmente se activa por la formación de complejos de antígeno-anticuerpo. También se puede activar de una manera independiente del anticuerpo por la unión de la proteína C reactiva complejada con ligando y por muchos agentes patógenos, incluyendo bacterias gram-negativas. La vía alternativa es una cascada dependiente de magnesio que es activada por deposición y activación de C3 sobre determinadas superficies sensibles (p. ej., polisacáridos de la pared celular de levaduras y bacterias y determinados materiales biopoliméricos).

La vía alternativa participa en la amplificación de la actividad tanto de la vía clásica como de la vía de la lectina (Suankratay, C., *ibid*; Farriers, T.C. et al., *Mol. Immunol.* 27: 1155-1161 (1990)). La activación de la vía del complemento genera fragmentos biológicamente activos de proteínas del complemento, p. ej., anafilotoxinas C3a, C4a y C5a y C5b y complejos de ataque a la membrana (MAC) C5b-9, que median en las respuestas inflamatorias a través de la implicación de la quimiotaxis de leucocitos, la activación de macrófagos, neutrófilos, plaquetas, mastocitos y células endoteliales, aumento de la permeabilidad vascular, citolisis y lesión del tejido.

El Factor D puede ser una diana adecuada para la inhibición de esta amplificación de las vías del complemento, debido a que su concentración plasmática en seres humanos es muy baja (1,8 µg/ml), y se ha demostrado que es la enzima limitante de la activación de la vía alternativa del complemento (P.H. Lesavre y H.J. Müller-Eberhard *J. Exp. Med.*, 1978; 148: 1498-1510; J.E. Volanakis et al., *New Eng. J. Med.*, 1985; 312: 395-401). La inhibición de la activación del complemento ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de varias indicaciones de enfermedades utilizando modelos animales y en estudios *ex vivo*, p. ej., lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis (Y. Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1996, 93: 8563 a 8568). El documento WO 99/42133 se refiere a inhibidores de factor D que se unen a factor D y bloquean la actividad funcional de factor D en la activación del complemento. La inhibición incluye moléculas de anticuerpos, así como homólogos, análogos y formas modificadas o derivadas de las mismas, incluidos fragmentos de inmunoglobulina tales como Fab, (Fab')₂ y Fv, moléculas pequeñas, incluidos péptidos, oligonucleótidos, péptido miméticos y compuestos orgánicos. Se generó un anticuerpo monoclonal que se unía a factor D y que bloqueaba su capacidad de activar el complemento, y se designó 166-32. El hibridoma que produce este anticuerpo se depositó en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, bajo el Número de Acceso HB-12476.

Utilizando el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) el análisis de los pacientes con AMD, se encontró que una variante genética de Factor H (Y402H) se asocia altamente con una incidencia incrementada de AMD (Zarepari S, Branham KEH, Li M, et al. *Am J Hum Genet.* 2005; 77: 149-53; Haines JL, et al. *Sci* 2005; 208: 419-21). Personas que son homocigotos o heterocigotos para esta mutación puntual del gen del Factor H pueden representar el 50% de los casos de AMD. Factor H es el inhibidor soluble clave de la vía alternativa del complemento (Rodríguez de Córdoba S, et al. *Mol Immunol* 2004; 41: 355-67). Se une a C3b y, por lo tanto, acelera la descomposición de la vía alternativa C3-convertasa (C3bBb) y actúa como un co-factor para la inactivación proteolítica de C3b mediada por el Factor I. Los estudios de tinción histoquímica demuestran que hay una distribución similar de Factor H y MAC en la interfaz RPE-coroides.

Cantidades significativas de MAC depositado en esta interfaz que se encuentra en pacientes con AMD indican que el haplotipo Factor H (Y402H) puede tener función inhibitoria del complemento atenuada. Se especula que el Factor H (Y402H) puede tener una afinidad de unión inferior para C3b. Por lo tanto, no es tan eficaz como la del Factor H de tipo salvaje en la inhibición de la activación de la vía alternativa del complemento. Esto pone a las células del RPE y coroides en riesgo constante de ataque del complemento mediado por la vía alternativa.

Se ha demostrado que la falta de Factor H en el plasma provoca una activación incontrolada de la vía alternativa con el consumo de C3 y, con frecuencia, otros componentes terminales del complemento tales como C5. En consonancia con este hallazgo, es conocido que los niveles plasmáticos de Factor H disminuyen el tabaquismo, un factor de riesgo conocido para AMD (Esparza-Gordillo J, et al. *Inmunogenetics.* 2004; 56: 77-82).

Actualmente, no existe una terapia médica probada para la AMD seca, y no hay tratamientos disponibles para la degeneración macular seca avanzada. En casos seleccionados de la AMD húmeda, una técnica conocida como fotocoagulación con láser puede ser eficaz para el sellado de los vasos sanguíneos que gotean o sangran. Desafortunadamente, la fotocoagulación con láser no suele restablecer la visión perdida, sino que simplemente se ralentiza y, en algunos casos, evita una pérdida adicional. Recientemente, la terapia fotodinámica ha demostrado ser eficaz en detener el crecimiento anormal de vasos sanguíneos en aproximadamente un tercio de los pacientes con AMD húmeda cuando se trata a tiempo. En la terapia fotodinámica Visdyne (PDT), se inyecta un colorante en el ojo del paciente, se acumula en la zona de fuga de los vasos en la retina y, cuando se expone a un láser de baja potencia, reacciona sellando los vasos con fugas. Además de estas dos técnicas de láser, se están desarrollando varias terapias anti-angiogénesis dirigidas al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) para el tratamiento de la AMD húmeda. Sin embargo, sólo el 10% de los pacientes tratados muestran una mejora de la visión.

A la vista de estos inadecuados tratamientos para la AMD húmeda y la falta total de tratamientos disponibles para la degeneración macular seca avanzada, existe una clara necesidad del desarrollo de nuevos tratamientos para esta enfermedad grave. La invención de los autores de la misma proporciona un nuevo enfoque para el tratamiento de esta grave enfermedad.

5 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a inhibidores del complemento para uso en un método para el tratamiento de afecciones o enfermedades oculares relacionadas tales como la degeneración macular asociada a la edad (AMD), la retinopatía diabética, angiogénesis ocular (tal como la neovascularización ocular que afecta a la coroides, la córnea o el tejido de la retina), y otras afecciones oculares que implican la activación del complemento. El tratamiento de AMD incluye tanto las formas seca como húmeda de AMD.

Los inhibidores del complemento de la presente invención incluyen, pero no se limitan a los que inhiben la vía alternativa del complemento tales como el Factor D, properdina, Factor B, Factor Ba y Factor Bb, y la vía clásica del complemento tales como C3a, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9 y C5b-9. La presente invención también incluye el uso de inhibidores del complemento en combinación con otros agentes tales como agentes anti-angiogénicos y agentes anti-inflamatorios tales como esteroides.

Otra realización de la presente invención se refiere al uso de inhibidores de C5aR y C3aR tales como anticuerpos y fragmentos derivados y construcciones de dominio único, así como compuestos de moléculas pequeñas.

Otra realización de la presente invención se refiere al uso de CR1 recombinante soluble (TP10) y sus proteínas derivadas; al uso de la inhibición de moléculas de C3 (tales como compstatina, un peptidomimético que se une e inhibe la activación de C3); ARNs que bloquean la síntesis de C3, C5, FD, el factor P, factor B.

Estos inhibidores pueden ser, pero no se limitan a pequeños compuestos químicos de la molécula, nucleótidos, péptidos, proteínas, peptidomiméticos y anticuerpos.

Otra realización de la presente invención incluye el uso de Factor H humano purificado a partir de sangre humana o Factor H humano recombinante administrado a los pacientes por vía intraocular o por cualquier otra vía clínicamente eficaz.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen inmunoglobulinas enteras, scFv, Fab, Fab', Fv, F(ab')₂, o dAb. Anticuerpos de dominio comprenden un dominio VH o un dominio VL.

Una realización de la presente invención es el uso de un anticuerpo monoclonal que se une al factor D y bloquea su capacidad para activar la vía alternativa del complemento. Tales anticuerpos se describen en los documentos WO 01/70818 y US 20020081293 tal como un anticuerpo monoclonal 166-32 producido a partir del hibridoma depositado en la ATCC y designado HB12476. La presente invención también incluye anticuerpos que se unen específicamente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 166-32. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden incluir también los anticuerpos humanizados de solicitud en tramitación.

Una realización de la presente invención es el uso de un anticuerpo monoclonal que se une al componente C5a del complemento. Tales anticuerpos incluyen el anticuerpo 137-26 producido a partir del hibridoma depositado en la ATCC y designado PTA-3650, y cualquier anticuerpo que se une específicamente al mismo epítipo que 137-26.

De acuerdo con la presente invención, el inhibidor de la vía del complemento se puede administrar por (a) administración parenteral; (b) implante de liberación sostenida biocompatible o biodegradable; (c) la implantación de una bomba de infusión; o (d) la administración local tal como la administración subconjuntival o por administración intravítrea. El inhibidor del complemento también se puede administrar por administración parenteral seleccionada de administración oral, administración enteral y administración tópica. La administración tópica puede incluir una disolución de lavado de ojos, una pomada para los ojos, un protector de ojos o un colirio en solución.

Además, el inhibidor del complemento de la presente invención se puede administrar en combinación con un compuesto inmunomodulador o inmunosupresor.

Otra realización de la presente invención se refiere a la administración de construcciones de ácido nucleico que son capaces de expresar los inhibidores de la vía del complemento para la terapia génica.

Otra realización de la presente invención incluye un método para la detección de inhibidores del complemento que son útiles en el tratamiento de AMD, que comprende el uso de un modelo de AMD en ratones deficientes en CCL-2 o CCR-2 senescentes. Estos ratones manifiestan cambios histopatológicos similares a los encontradas en AMDs seca y húmeda humanas. Estos ratones pueden ser tratados con inhibidores del complemento o factor H por vía intravítrea. El examen histológico se puede realizar para determinar la protección contra el desarrollo de AMD en los ratones tratados con los agentes a ensayar.

Descripción detallada de la invención

Tal como se utiliza en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singulares "un", "una", y "el", "la" incluyen una referencia al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, p. ej., la referencia a "una célula huésped" incluye una pluralidad de tales células huésped.

- 5 A menos que se defina lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos y cualesquiera acrónimos utilizados en esta memoria tienen los mismos significados que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica en el campo de la invención. Aunque cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden utilizar en la práctica de la presente invención, ejemplos de métodos, dispositivos y materiales se describen en esta memoria.
- 10 Sin embargo, nada en esta memoria debe ser interpretado como una admisión de que la invención no tiene derecho a preceder a dicha divulgación en virtud de la invención anterior.

Definiciones

- 15 La expresión "variante de secuencia de aminoácidos" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren hasta cierto punto de un polipéptido de secuencia nativa. Ordinariamente, las variantes de secuencia de aminoácidos poseerán al menos aproximadamente un 70% de homología, o al menos aproximadamente un 80%, o al menos aproximadamente un 90% de homología con el polipéptido nativo. Las variantes de secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, delecciones y/o inserciones en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa.

- 20 El término "identidad" u "homología" se define como el porcentaje de residuos aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de una secuencia correspondiente con la que se compara, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario para lograr el máximo porcentaje de identidad para la secuencia completa, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Ni extensiones ni inserciones N- o C-terminales se entenderán como la reducción de identidad u homología. Métodos y programas de ordenador para el alineamiento son bien conocidos en la técnica. La identidad de secuencia se puede
- 25 calcular fácilmente por métodos conocidos, incluyendo pero no limitados a los descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., comp., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Information and Genome Projects, Smith, D.W., comp., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., comps., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis Primer in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., comps., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, 30 H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Métodos para determinar la identidad están diseñados para dar la mayor coincidencia entre las secuencias sometidas a ensayo. Los métodos de programas informáticos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F., et al., J Molec. Biol. 215: 403-410 (1990). El programa BLAST X está
- 30 disponible al público de NCBI y otras fuentes (BLASTManual, Altschul, S., et al, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El algoritmo de Smith Waterman bien conocido también se puede usar para determinar la identidad.

- 35 El término "anticuerpo" en esta memoria se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos bi-específicos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

- 40 El término "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada uno de los anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como el obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de
- 45 acuerdo con la presente invención pueden hacerse por el método del hibridoma descrito por vez primera por Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de bancos de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson et al, Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks et al, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

- 50 Los anticuerpos monoclonales de esta memoria incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpo correspondiente, mientras que el resto de la o las cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias
- 55

correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Patente de EE.UU. Nº 4.816.567; y Morrison et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)).

5 Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto que comprende la región de unión a antígeno o variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpo.

10 Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante de la cadena ligera (C_L) y los dominios constantes de la cadena pesada, C_H1, C_H2 y C_H3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencias nativas (p. ej. dominios constantes de secuencias nativas humanas) o la secuencia de aminoácidos variante de las mismas. El anticuerpo intacto puede tener una o más funciones efectoras.

15 "Funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de la secuencia nativa o región Fc variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen la unión de C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación a la baja de los receptores de la superficie celular (p. ej., receptor de células B; BCR), etc.

20 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos pueden asignarse a diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden ser divididas en "subclases" (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

25 "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" (ADCC) se refiere a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (p. ej., células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar en la ADCC, células NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas. Para evaluar la actividad de la ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo
30 ADCC in vitro, tal como el descrito en la patente de EE.UU. Nº 5.500.362 o 5.821.337. Células efectoras útiles para ensayos de este tipo incluyen células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, p. ej., en un modelo animal. Varios de estos modelos están disponibles.

35 El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada uno de los anticuerpos particulares por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables, en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Estas regiones hipervariables también se denominan regiones determinantes de la complementariedad o CDRs. Las porciones más
40 altamente conservadas de los dominios variables se denominan las regiones marco (FRs). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FRs, adoptando en gran medida una configuración de lámina β, conectados por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de la lámina β. Las regiones hipervariables en cada una de las cadenas se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FRs y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Servicio de Salud Pública, 5ª Ed. Instituto Nacional de la Salud, Bethesda, Md. (1991)).

45 La expresión "región hipervariable", cuando se utiliza en esta memoria, se refiere a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende generalmente residuos aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (p. ej., residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Servicio de Salud Pública, 5ª Ed. Instituto Nacional de la Salud, Bethesda, Md. (1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (p. ej., residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). "Región de marco" o
55 residuos "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen en esta memoria.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre

refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de unión a antígeno y todavía es capaz de reticular el antígeno.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en esta memoria para Fab' en la que el o los residuos cisteína de los dominios constantes portan al menos un grupo tiol libre. Fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basado en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un antígeno completo de reconocimiento y el sitio de unión al antígeno. Esta región consiste en un dímero de una cadena pesada y una cadena ligera de dominio variable en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada uno de los dominios variables interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H - V_L . Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión.

"Fv de cadena sencilla" o "fragmentos de anticuerpos scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende, además, un enlazador polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de scFv, véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore comps., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994). Fragmentos scFv de anticuerpo anti-ErbB2 se describen en el documento WO93/16185; la patente de EE.UU. N° 5.571.894; y la patente de EE.UU. N° 5.587.458.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, que comprenden un dominio pesado variable (V_H) conectado a un dominio ligero variable (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H - V_L). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados 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., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

Un "anticuerpo de dominio único" es sinónimo de "dAb" y se refiere a un polipéptido de la región variable de inmunoglobulina en donde la unión al antígeno se efectúa por un único dominio de la región variable. Un "anticuerpo de dominio único", tal como se utiliza en esta memoria, incluye i) un anticuerpo que comprende la cadena pesada del dominio variable (V_H), o fragmento de unión a antígeno del mismo, que forma un sitio de unión a antígeno de forma independiente de cualquier otro dominio variable, ii) un anticuerpo que comprende una cadena ligera de dominio variable (V_L), o fragmento de unión a antígeno del mismo, que forma un sitio de unión a antígeno de forma independiente de cualquier otro dominio variable, iii) un anticuerpo que comprende un polipéptido de dominio V_H vinculado a otro V_H o un polipéptido de dominio V_L (p. ej., V_H - V_H o V_H - V_L), en el que cada uno de los dominios V forma un sitio de unión a antígeno de forma independiente de cualquier otro dominio variable, y iv) un anticuerpo que comprende polipéptido de dominio V_L enlazado a otro polipéptido de dominio V_L (V_L - V_L), en donde cada uno de los dominios V forma un sitio de unión al antígeno de forma independiente de cualquier otro dominio variable. Tal como se utiliza en esta memoria, el dominio V_L se refiere tanto a las formas kappa como lambda de las cadenas ligeras.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej., de roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que las regiones hipervariables se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana tales como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, la región marco (FR) de residuos de inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo humano o en el anticuerpo no humano. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Ejemplos de tecnología de

humanización se pueden encontrar en, p. ej., Queen et al. patentes de EE.UU. N° 5.585.089, 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370, que se incorporan en esta memoria como referencia.

Generación de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención pueden generarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender anticuerpos policlonales. Métodos de preparar anticuerpos policlonales son conocidos por el experto en la técnica (Harlow, et al, Antibodies: a Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed (1988)).

Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser generados mediante la administración de un inmunógeno que comprende el antígeno de interés a diversos animales huéspedes, incluyendo, pero no limitados a, conejos, ratones, ratas, etc., para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales específicos para el antígeno. La administración del inmunógeno puede implicar una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Se pueden utilizar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie del huésped, e incluyen, pero no se limitan a, medio de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa bocallave, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Ejemplos adicionales de adyuvantes que pueden emplearse incluyen el adyuvante MPL-TDM (monofosforil-lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). Los protocolos de inmunización son bien conocidos en la técnica y pueden realizarse por cualquier método que provoque una respuesta inmune en el huésped animal elegido. Los adyuvantes también son bien conocidos en la técnica.

Típicamente, el inmunógeno (con o sin adyuvante) es inyectado en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales, o por vía intramuscular o a través de IV. El inmunógeno puede incluir un polipéptido antigénico, una proteína de fusión o variantes de los mismos. Dependiendo de la naturaleza de los polipéptidos (es decir, porcentaje de hidrofobicidad, porcentaje de hidrofiliidad, estabilidad, carga neta, punto isoeléctrico, etc.), puede ser útil conjugar el inmunógeno a una proteína conocida por ser inmunogénica en el mamífero que se inmuniza. Una conjugación de este tipo incluye la conjugación química derivatizando grupos funcionales químicos activos tanto para el inmunógeno como para la proteína inmunogénica a ser conjugada de tal manera que se forma un enlace covalente, o a través de la metodología basada en proteínas de fusión, u otros métodos conocidos por el experto en la materia. Ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a, hemocianina de lapa bocallave, ovoalbúmina, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, inhibidor de tripsina de soja y los péptidos T helper promiscuos. Pueden utilizarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica tal como se describe anteriormente.

Los anticuerpos útiles en la presente invención comprenden anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando la tecnología de hibridoma tal como la descrita por Kohler y Milstein, Nature, 256: 495 (1975) y la patente de EE.UU. N° 4.376.110, por Harlow, et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988), por Hammerling, et al, Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas (Elsevier, N.Y., (1981)), u otros métodos conocidos por el experto. Otros ejemplos de métodos que se pueden emplear para producir anticuerpos monoclonales incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kosbor et al, 1983, Immunology Today 4:72; Cole et al, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030), y la técnica de hibridoma de HBV (Cole et al, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce los anticuerpos de esta invención puede cultivarse in vitro o in vivo.

Utilizando técnicas típicas de hibridoma, un huésped tal como un ratón, un ratón humanizado, un ratón con un sistema inmunitario humano, hámster, conejo, camello o cualquier otro animal huésped apropiado, es típicamente inmunizado con un inmunógeno para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al antígeno de interés. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar in vitro con el antígeno.

Generalmente, en la producción de hibridomas productores de anticuerpos, se utilizan linfocitos de sangre periférica ("PBLs") si se desean células de origen humano, o se utilizan células de bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos se fusionan después con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986), págs. 59-103). Líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino o humano. Típicamente, se emplea una línea celular de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan la expresión estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif., y la American Type Culture Collection, Manassas, Va. Líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón también se pueden utilizar para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol. 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) págs. 51-63).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede entonces someterse a ensayo en cuanto a la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el inmunógeno. La especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina, p. ej., mediante inmunoprecipitación o mediante ensayo de unión in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Tales técnicas se conocen en la técnica y dentro de la habilidad del experto. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse por análisis de Scatchard (Munson et al., Anal. Biochem., 107: 220 (1980)).

Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procesos de dilución limitante y crecer mediante métodos estándares (Goding, supra). Medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio de Dulbecco modificado por Eagle y RPMI-1640. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, p. ej., proteína A-sefara, cromatografía de hidroxipatito, cromatografía de exclusión en gel, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Existe una diversidad de métodos en la técnica para la producción de anticuerpos monoclonales y, por tanto, la invención no se limita a su única producción en hibridomas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden hacerse por métodos de ADN recombinante tales como los descritos en la patente de EE.UU. N° 4.816.567. En este contexto, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo derivado de un solo clon eucariótico, de fago o procariótico. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente utilizando procesos convencionales (p. ej., utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos, o cadenas de seres humanos, humanizadas o de otras fuentes). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN podría colocarse en vectores de expresión, que luego se transforman en células huésped tales como células NS0, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de EE.UU. N° 4.816.567; Morrison et al, supra) o mediante unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulina. Un polipéptido no inmunoglobulina de este tipo puede sustituirse con los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse con los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Métodos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc para evitar que se reticule la cadena pesada. Alternativamente, los residuos cisteína relevantes se sustituyen con otro residuo aminoácido o se suprimen para prevenir el entrecruzamiento.

Fragmentos de anticuerpos que reconocen epítopos específicos pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención pueden ser producidos por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

Para algunos usos, incluyendo el uso in vivo de anticuerpos en seres humanos y en ensayos de detección in vitro, puede ser preferible utilizar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo se derivan de diferentes especies animales tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oi et al, BioTechniques 4: 214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125: 191-202; patentes de EE.UU. N°s. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos generados en una especie no humana que se unen al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de las especies no humanas y regiones marco (FR) de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los residuos estructurales

en las regiones marco humanas se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., mediante modelado de las interacciones de la CDR y los residuos estructurales para identificar residuos marco importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos estructurales inusuales en posiciones particulares. (Véase, p. ej., Queen et al, patente de EE.UU. N° 5.585.089; Riechmann et al, Nature 332: 323 (1988). Los anticuerpos pueden humanizarse usando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; Patentes de EE.UU. N°s. 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), recubrimiento o revestimiento (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28 (4/5): 489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6): 805-814 (1994); Roguska et al, PNAS 91: 969-973 (1994)) y mezcla aleatoria de cadenas (patente de EE.UU. N° 5.565.332).

Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos residuos aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente residuos "importados" que, por lo general, se toman de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988), mediante la sustitución de CDRs o secuencias de CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de EE.UU. N° 4.816.567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posibles algunos residuos de FR se sustituyen de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos se pueden hacer por una diversidad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bancos de anticuerpos derivados de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse también las patentes de EE.UU. N°s. 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741. Las técnicas de Cole et al., y Boerder et al., también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Riss, (1985); y Boerner et al., J. Immunol, 147 (1): 86-95, (1991)).

Los anticuerpos humanos también pueden ser anticuerpos de un solo dominio que tienen un dominio VH o VL que funciona de forma independiente de cualquier otro dominio variable. Estos anticuerpos se seleccionan típicamente a partir de bancos de anticuerpos expresados en fagos. Estos anticuerpos y métodos para aislar tales anticuerpos se describen en las patentes de EE.UU. N° 6.595.142; 6.248.516; y solicitudes US20040110941 y US20030130496.

Los anticuerpos humanos también pueden producirse utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana pueden introducirse al azar o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, la región variable humana, la región constante y la región diversidad se pueden introducir en células madre embrionarias de ratón además de los genes de cadena pesada y ligera humanos. Los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de ratón pueden hacerse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la delección homocigota de la región JH impide la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y micro-inyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos son luego criados para producir descendencia homocigota que expresa anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con un antígeno seleccionado, p. ej., todo o una porción de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener de los ratones transgénicos inmunizados utilizando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de células B, y posteriormente se someten a cambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, utilizando una técnica de este tipo, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para la producción de anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos, véanse, p. ej., las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; patente europea N° 0 598 877; patentes de EE.UU. N°s. 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598. Además, compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.), Genpharm (San José, California) y Medarex, Inc. (Princeton, N.J.) se pueden encargar de proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente.

También MAbs humanos podrían hacerse mediante la inmunización de ratones a los que se han trasplantado leucocitos humanos de sangre periférica, esplenocitos o médulas óseas (p. ej., las técnicas de trioma de XTL). Anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado pueden generarse utilizando una

técnica denominada "selección guiada". En este enfoque un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, p. ej., un anticuerpo de ratón, se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Jespers et al., *Bio/technology* 12: 899-903 (1988)).

Además, anticuerpos para los polipéptidos de la invención pueden, a su vez, utilizarse para generar anticuerpos anti-idiotipo que "imitan" a polipéptidos de la invención utilizando técnicas bien conocidas para los expertos en la técnica. (Véase, p. ej., Greenspan y Bona, *FASEB J.* 7 (5): 437-444; (1989) y Nissinoff, *J. Immunol.* 147 (8): 2429-2438 (1991)). Por ejemplo, los anticuerpos que se unen a e inhiben competitivamente la multimerización del polipéptido y/o la unión de un polipéptido de la invención a un ligando se pueden utilizar para generar anti-idiotipos que "imitan" la multimerización del polipéptido y/o dominio de unión y, como consecuencia, se unen y neutralizan polipéptido y/o su ligando. Tales neutralizantes anti-idiotipos o fragmentos Fab de tales anti-idiotipos pueden utilizarse en regímenes terapéuticos para neutralizar el ligando del polipéptido. Por ejemplo, tales anticuerpos anti-idiotípicos pueden utilizarse para unir un polipéptido de la invención y/o para unir sus ligandos/receptores, y de ese modo bloquear su actividad biológica.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En la presente invención, una de las especificidades de unión puede ser dirigida hacia Factor D, la otra puede ser para cualquier otro antígeno, y preferentemente para una proteína de la superficie celular, receptor, subunidad de receptor, antígeno específico de tejido, proteína derivada de forma viral, proteína de la envuelta codificada de forma viral, proteína derivada de bacterias o proteína de la superficie bacteriana, etc. Los anticuerpos biespecíficos también pueden comprender dos o más anticuerpos de un solo dominio.

Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos son bien conocidos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de inmunoglobulina de cadena pesada/cadena ligera, en donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se logra generalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. Procesos similares se describen en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

Dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Puede tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y son co-transformados en un organismo huésped adecuado. Para detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Meth. Enzym.* 121: 210 (1986).

Los anticuerpos heteroconjugados también se contemplan por la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos han sido propuestos, por ejemplo, para fijar como objetivo células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de EE.UU. Nº 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse in vitro utilizando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéster. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo y los descritos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. Nº. 4.676.980. Además, se pueden generar anticuerpos de un solo dominio a IL-13. Ejemplos de esta tecnología se han descrito en el documento WO9425591 para los anticuerpos derivados de cadena pesada de Camelidae Ig, así como en el documento US20030130496 que describen el aislamiento de anticuerpos de dominio único totalmente humanos a partir de bancos de fagos.

Generación de anticuerpos monoclonales (mabs)

En una realización de la invención, los anticuerpos monoclonales tales como anti-Factor D, pueden ser creados por inmunización de roedores (p. ej., ratones, ratas, hámsters y cobayas), ya sea con Factor D nativo purificado a partir de plasma humano u orina, o Factor D recombinante o sus fragmentos expresados por cualquiera de los sistemas eucariotas o procariotas. Para la inmunización se pueden utilizar otros animales, por ejemplo, primates no humanos, ratones transgénicos que expresan inmunoglobulinas humanas y ratones inmunodeficientes combinados severos (SCID) trasplantados con linfocitos B humanos. Los hibridomas pueden ser generados por procesos convencionales fusionando linfocitos B de los animales inmunizados con células de mieloma (p. ej., Sp2/0 y NS0), tal como se describe por G. Köhler y C. Milstein (*Nature*, 1975: 256: 495-497).

Además, los anticuerpos monoclonales pueden ser generados mediante rastreo de bancos de Fv o Fab de cadena sencilla recombinantes de linfocitos B humanos en sistemas de expresión de fagos. La especificidad de los MAbs

para un antígeno dado puede ser testada mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunotransferencia Western u otras técnicas inmunoquímicas. La actividad inhibidora de los anticuerpos sobre la activación del complemento puede ser evaluada por ensayos hemolíticos utilizando glóbulos rojos (RBCs) de conejo no sensibilizado o cobaya para la vía alternativa, y utilizando RBCs de pollo u oveja sensibilizados para la vía clásica. Los hibridomas en los pocillos positivos se clonan por dilución limitante. Los anticuerpos se purifican para la caracterización de la especificidad para el antígeno, tales como el factor D, mediante ensayos bien conocidos en la técnica.

También se pueden crear moléculas de unión de una sola cadena peptídica, en las que se conectan las regiones Fv de cadena pesada y ligera. Anticuerpos de cadena sencilla ("scFv") y el método de su construcción se describen en la Patente de EE.UU. N°. 4.946.778. Alternativamente, el Fab puede construirse y expresarse por medios similares (M.J Evans et al., J. Immunol. Meth., 1995; 184: 123-138). Todos los anticuerpos total y parcialmente humanos son menos inmunogénicos que los MAbs totalmente murinos, y los fragmentos y anticuerpos de cadena sencilla son también menos inmunogénicos. Es menos probable que todos estos tipos de anticuerpos, por lo tanto, evoquen una respuesta inmune o alérgica. Por consiguiente, son más adecuados para la administración in vivo en seres humanos que los anticuerpos totalmente animales, especialmente cuando es necesaria una administración repetida o a largo plazo. Además, el tamaño más pequeño del fragmento de anticuerpo puede ayudar a mejorar la biodisponibilidad de tejido, lo que puede ser crítico para una mejor acumulación de dosis en indicaciones de enfermedades agudas.

En una realización preferida de la invención, se utiliza terapéuticamente un Fab quimérico, que tiene regiones variables de animales (ratón) y regiones constantes humanas. El Fab se prefiere, porque es más pequeño que una inmunoglobulina completa y puede proporcionar una mejor permeación de tejido; como molécula monovalente, hay menos posibilidades de una formación de inmunocomplejos y agregados; y se puede producir en un sistema microbiano, que puede ser más fácilmente aumentado que un sistema de mamífero.

Aplicaciones de los inhibidores de la vía del complemento

Los inhibidores del complemento, tales como anticuerpos y sus fragmentos de unión, pueden ser administrados a los sujetos en una formulación farmacéutica apropiada por una diversidad de vías, incluyendo, pero no limitadas a, infusión intravenosa, inyección intravenosa en bolo y las vías intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, subcutánea, intranasal, intratraqueal, intraespinal, intracraneal y oral. Tal administración les permite unirse al antígeno endógeno, tal como el factor D y, por lo tanto, inhibir la generación de anafilotoxinas C3b, C3a y C5a, y C5b-9.

La dosis preferida estimada de este tipo de anticuerpos y moléculas está entre 10 y 500 µg/ml de suero. La dosificación real se puede determinar en ensayos clínicos siguiendo la metodología convencional para determinar dosificaciones óptimas, es decir, administrando diversas dosis y determinando cual es la más eficaz.

Los inhibidores de la vía del complemento pueden funcionar para inhibir la activación del complemento in vivo y/o la vía alternativa del complemento y las manifestaciones inflamatorias que la acompañan tales como el reclutamiento y la activación de macrófagos, neutrófilos, plaquetas y mastocitos, edema y daño tisular. Estos inhibidores pueden utilizarse para el tratamiento de enfermedades o afecciones que están mediadas por la activación excesiva o incontrolada del sistema del complemento.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser mono-específicos, bi-específicos, tri-específicos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multi-específicos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un antígeno seleccionado o pueden ser específicos tanto para el antígeno, así como para un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véase, p. ej., las publicaciones PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., J. Immunol. 147: 60-69 (1991); patentes de EE.UU.. N°s 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; Kostelny et al., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992).

Anticuerpos útiles en la presente invención pueden describirse o especificarse en términos del o de los epítopos o parte o partes de un componente de la vía del complemento, tales como el factor D, que reconocen o se unen específicamente. El o los epítopos o parte o partes de polipéptido pueden especificarse tal como se describe en esta memoria, p. ej., mediante las posiciones N-terminales y C-terminales, por el tamaño en residuos aminoácidos contiguos.

Anticuerpos útiles en la presente invención también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Los anticuerpos que se unen a polipéptidos componente de la vía del complemento, que tienen al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55% y al menos 50% de identidad (según se calcula utilizando métodos conocidos en la técnica y descritos en esta memoria) para IL-13 también se incluyen en la presente invención. Los anticuerpos anti-Factor D también se pueden unir con una KD de menos de aproximadamente 10⁻⁷ M, menos de aproximadamente 10⁻⁶ M o menos de aproximadamente 10⁻⁵ M a otras proteínas tales como anticuerpos Factor D de especies distintas de aquellas contra las que el anticuerpo anti-Factor D está dirigido.

Vectores y células huésped

En otro aspecto, la presente invención proporciona construcciones de vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos de la presente invención y una célula huésped que comprende un vector de este tipo. Técnicas estándares para la clonación y la transformación se pueden utilizar en la preparación de líneas celulares que expresan los anticuerpos de la presente invención.

Vectores de expresión recombinantes que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar utilizando técnicas bien conocidas. Los vectores de expresión incluyen una secuencia de nucleótidos operativamente enlazada a las secuencias de nucleótidos reguladoras de la transcripción o traducción adecuadas tales como las derivadas de genes de mamíferos, microbianos, virales o de insectos. Ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores transcripcionales, operadores, potenciadores, sitios de unión ribosomal de ARNm y/u otras secuencias apropiadas que controlan el inicio y la terminación de la transcripción y traducción. Secuencias de nucleótidos están "operativamente enlazadas" cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente con la secuencia de nucleótidos para el polipéptido apropiado. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos promotora está enlazada operativamente a, p. ej., la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo si la secuencia de nucleótidos promotora controla la transcripción de la secuencia de nucleótidos apropiada.

Además, las secuencias que codifican péptidos señal apropiados que no están asociadas de forma natural con las secuencias de anticuerpo de cadena pesada y/o ligera se pueden incorporar en vectores de expresión. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos para un péptido señal (líder secretor) puede fusionarse en marco a la secuencia del polipéptido, de modo que el anticuerpo se secreta al espacio periplásmico o en el medio. Un péptido señal que es funcional en las células huésped pretendidas potencia la secreción extracelular del anticuerpo apropiado. El péptido señal se puede escindir del polipéptido después de la secreción de anticuerpo de la célula. Ejemplos de este tipo de señales secretoras son bien conocidos e incluyen, p. ej., los descritos en los documentos US5698435; US5698417 y US6204023.

Células huésped útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias (p. ej., *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o vectores de expresión de ADN de cósmido que contienen secuencias codificadoras de anticuerpos; levadura (p. ej., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificadoras de anticuerpos; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., baculovirus) que contienen secuencias codificadoras de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (p. ej., plásmido Ti) que contienen secuencias codificadoras de anticuerpos; o sistemas de células de mamíferos (p. ej., células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (p. ej., promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (p. ej., el promotor tardío de adenovirus; el promotor del virus vacuna 7.5K).

El vector puede ser un vector de plásmido, un vector de fago de cadena sencilla o doble o un vector viral de ARN o ADN de cadena sencilla o doble. Vectores de este tipo pueden introducirse en células como polinucleótidos mediante técnicas bien conocidas para introducir ADN y ARN en las células. Los vectores, en el caso de vectores de fagos y virales también pueden introducirse en células tales como virus empaquetados o encapsulados mediante técnicas bien conocidas para infección y transducción. Los vectores virales pueden ser competentes en la replicación o defectuosos en la replicación. En este último caso, la propagación viral generalmente se producirá sólo en células huésped de complementación. Sistemas de traducción libres de células también pueden emplearse para producir la proteína utilizando ARNs derivados de las presentes construcciones de ADN. Vectores de este tipo pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, p. ej., la publicación PCT WO 86/05807; la publicación PCT WO 89/01036; y la Patente de EE.UU. N° 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en dicho vector de expresión de toda la cadena pesada o ligera.

Procariotas útiles como células huésped en la presente invención incluyen organismos gram-negativos o gram-positivos tales como *E. coli* y *B. subtilis*. Vectores de expresión para uso en células huésped procariotas generalmente comprenden uno o más genes marcadores seleccionables fenotípicos. Un gen marcador seleccionable fenotípico es, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos o que suministra un requerimiento autotrófico. Ejemplos de vectores de expresión útiles para células huésped procariotas incluyen los derivados de plásmidos disponibles comercialmente tales como la serie de vectores pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), pGEM1 (Promega Biotec, Madison, Wisconsin, EE.UU.) y pET (Novagen, Madison, Wisconsin, EE.UU.) y pRSET (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, EE.UU.) (Studier, F.W., J. Mol. Biol. 219: 37 (1991); Schoepfer, R. Gene 124: 83 (1993)). Secuencias de promotores comúnmente utilizadas para los vectores de expresión de células huésped recombinantes procariotas incluyen T7 (Rosenberg, et al. Gene 56,125-135 (1987)), β -lactamasa (penicilinas), sistema promotor de lactosa (Chang et al., Nature 275: 615, (1978); y Goeddel et al., Nature 281: 544, (1979)), sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8: 4057, (1980)), y el promotor *tac* (Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Levaduras útiles en la presente invención incluyen las del género *Saccharomyces*, *Pichia*, *Actinomycetes* y *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura contendrán, a menudo, un origen de secuencia de replicación de un plásmido de levadura 2 μ , una secuencia de replicación autónoma (ARS), una región del promotor, secuencias para poliadenilación, secuencias para la terminación de la transcripción y un gen marcador seleccionable. Secuencias de promotor adecuadas para vectores de levadura incluyen, entre otros, promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255: 2073, (1980)) u otras enzimas glucolíticas (Holland et al., Biochem 17: 4900, (1978)) 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 vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levaduras se describen adicionalmente en Fleer et al., Gene, 107: 285-195 (1991). Otros promotores y vectores adecuados para los protocolos de levadura y transformación de levadura son bien conocidos en la técnica. Protocolos de transformación de levaduras son bien conocidos. Uno de tales protocolos se describe por Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 75: 1929 (1978). el protocolo de Hinnen selecciona transformantes Trp+ en un medio selectivo.

Sistemas de cultivo de células huésped de mamíferos o insectos también se pueden emplear para expresar anticuerpos recombinantes, p. ej., sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas. En un sistema de insectos, el virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) se puede utilizar como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificadora de anticuerpos puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de poliedrina) del virus y se coloca bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de poliedrina).

Se pueden usar células NS0 o de ovario de hámster chino (CHO) para la expresión en mamíferos de los anticuerpos de la presente invención. Las secuencias de control de la transcripción y la traducción para los vectores de expresión de células huésped de mamíferos se pueden extraer de genomas virales. Secuencias de promotor y secuencias de potenciador comúnmente utilizadas se derivan de virus del poliovirus, Adenovirus 2, Virus de Simio 40 (SV40) y citomegalovirus humano (CMV). Secuencias de ADN derivadas del genoma viral SV40 se pueden utilizar para proporcionar otros elementos genéticos para la expresión de una secuencia génica estructural en una célula de mamífero huésped, p. ej., origen SV40, promotor temprano y tardío, potenciador, corte y empalme, y sitios de poliadenilación. Los promotores virales tempranos y tardíos son particularmente útiles, ya que ambos se obtienen fácilmente de un genoma viral tal como un fragmento que también puede contener un origen de replicación viral. Ejemplos de vectores de expresión para uso en células huésped de mamífero están disponibles comercialmente.

Polinucleótidos que codifican anticuerpos

La invención proporciona, además, polinucleótidos o ácidos nucleicos, p. ej., ADN, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de la invención y fragmentos del mismo. Polinucleótidos a modo de ejemplo incluyen los que codifican cadenas de anticuerpo que comprenden una o más de las secuencias de aminoácidos descritas en esta memoria. La invención también abarca polinucleótidos que se hibridan en condiciones de hibridación rigurosas o de baja rigurosidad a polinucleótidos que codifican un anticuerpo de la presente invención.

Los polinucleótidos pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos puede determinarse, por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, un polinucleótido que codifica el anticuerpo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (p. ej., tal como se describe en Kutmeier et al, BioTechniques 17: 242 (1994)) que, en síntesis, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, reasociación y ligamiento de esos oligonucleótidos, y después amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

Alternativamente, un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede generarse a partir de ácido nucleico a partir de una fuente adecuada. Si no está disponible un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular, pero la secuencia de la molécula de anticuerpo es conocida, un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina puede sintetizarse químicamente u obtenerse de una fuente adecuada (p. ej., un banco de ADNc de anticuerpo, o un banco de ADNc generado a partir de, o ácido nucleico, preferiblemente ARN poli A+, aislado de cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo de la invención) mediante amplificación por PCR utilizando cebadores sintéticos hibridables a los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación utilizando una sonda de oligonucleótido específica para la secuencia génica particular para identificar, p. ej., un clon de ADNc de un banco de ADNc que codifica el anticuerpo. Ácidos nucleicos amplificados generados mediante PCR pueden entonces ser clonados en vectores de clonación replicables utilizando cualquier método bien conocido en la técnica.

Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo puede manipularse utilizando métodos bien conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, p. ej., técnicas de ADN recombinantes, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., y Ausubel et al., comps., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., para generar anticuerpos que tengan una

secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y/o cadena ligera puede ser inspeccionada para identificar las secuencias de las CDRs por métodos bien conocidos, p. ej., mediante comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de la secuencia. Utilizando técnicas rutinarias de ADN recombinante, una o más de las CDRs pueden insertarse dentro de las regiones marco, p. ej., en regiones marco humanas para humanizar un anticuerpo no humano tal como se describe supra. Las regiones marco pueden ser regiones de origen natural o marco de consenso y regiones marco preferiblemente humanas (véase, p. ej., Chothia et al., J. Mol. Biol. 278: 457-479 (1998) para obtener una lista de las regiones marco humanas). Preferiblemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones marco y CDRs codifica un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de la invención. Preferiblemente, como se discutió supra, una o más sustituciones de aminoácidos pueden hacerse dentro de las regiones marco y, preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión del anticuerpo a su antígeno. Adicionalmente, métodos de este tipo pueden ser utilizarse para hacer sustituciones de aminoácidos o deleciones de uno o más residuos cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenario para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracatenarios. Otras alteraciones en el polinucleótido son abarcadas por la presente invención y dentro de la experiencia de la técnica.

Además, pueden utilizarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855 (1984); Neuberger et al., Nature 312: 604-608 (1984); Takeda et al, Nature 314: 452-454 (1985)) mediante genes de corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Tal como se ha descrito anteriormente, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales tales como los que tienen una región variable derivada de un MAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana, p. ej., anticuerpos humanizados.

Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente de EE.UU. Nº 4.946.778; Bird, Science 242: 423-42. (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988); y Ward et al, Nature 334: 544-54 (1989)) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla. Anticuerpos de cadena sencilla se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente aminoácido, resultando un polipéptido de cadena sencilla. También pueden utilizarse técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en E. coli (Skerra et al, Science 242: 1038-1041 (1988)).

Métodos de producir anticuerpos

Los anticuerpos de la invención pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o, preferiblemente, por técnicas de expresión recombinantes.

La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o fragmento, derivado o análogo del mismo, (p. ej., una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención o un anticuerpo de cadena sencilla de la invención), requiere la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo o un fragmento del anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo, el vector para la producción del anticuerpo puede ser producido mediante tecnología de ADN recombinante. Se construye un vector de expresión que contiene secuencias de codificación de anticuerpos y señales de control de la transcripción y la traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinación genética in vivo.

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan entonces mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. En un aspecto de la invención, los vectores que codifican tanto las cadenas pesadas como ligeras pueden ser co-expresados en la célula huésped para la expresión de toda la molécula de inmunoglobulina, como se detalla a continuación.

Se puede utilizar una diversidad de sistemas de vectores de expresión en el huésped para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención tal como se describe anteriormente. Tales sistemas de expresión en el huésped representan vehículos, mediante los cuales las secuencias codificantes de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando son transformadas o transfectadas con las secuencias codificadoras de nucleótidos apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención in situ. Células bacterianas tales como E. coli, y células eucariotas se utilizan comúnmente para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante, especialmente para la expresión de moléculas completas de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), en unión con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking et al., Gene 45:101 (1986); Cockett et al, Bio/Technology 8: 2 (1990)).

- Además, se puede escoger una cepa de células huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. Tales modificaciones (p. ej., glicosilación) y procesamiento (p. ej., escisión) de productos proteicos puede ser importante para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento post-traducción y la modificación de proteínas y productos génicos. Líneas celulares o sistemas huésped apropiados se pueden elegir para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Para este fin, se pueden utilizar células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, la glicosilación y la fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células CHO, COS, 293, 3T3 o de mieloma.
- Para la producción de proteínas recombinantes a largo plazo, de alto rendimiento, se prefiere una expresión estable. Por ejemplo, líneas celulares que expresan establemente la molécula de anticuerpo pueden modificarse por ingeniería genética. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (p. ej., promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN extraño, las células tratadas mediante ingeniería genética pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido y, a continuación, cambiarse a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método se puede utilizar ventajosamente para tratar mediante ingeniería genética líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo. Tales líneas celulares tratadas mediante ingeniería genética pueden ser particularmente útiles en el rastreo y la evaluación de compuestos que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.
- Se puede utilizar un cierto número de sistemas de selección, incluyendo, pero no limitado a la timidina quinasa del virus herpes simplex (Wigler et al, Cell 11:223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)), y genes de adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al, Cell 22: 817 (1980)) se pueden emplear en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. También, la resistencia antimetabolito se puede utilizar como la base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Wu y Wu, Biotherapy 3: 87-95 (1991)); e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al, Gene 30: 147 (1984)). Métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante pueden aplicarse rutinariamente para seleccionar el clon recombinante deseado, y métodos de este tipo se describen, por ejemplo, en Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (comps.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150: 1 (1981).
- Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse mediante amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, "The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells" (DNA Cloning, Vol.3. Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema vector que expresa el anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada se asocia con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3: 257 (1983)).
- La célula huésped puede ser co-transfectada con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de la cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede utilizarse un único vector que codifica, y es capaz de expresar, los polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe ser colocada antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, Nature 322: 52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2197 (1980)). Las secuencias codificadoras para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.
- Una vez que una molécula de anticuerpo de la invención ha sido producida por un animal, ha sido sintetizada químicamente o expresada de forma recombinante, la misma puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, particularmente mediante afinidad por el antígeno específico después de proteína A, y cromatografía de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogos descritas en esta memoria o de otra manera conocida en la técnica, para facilitar la purificación.
- La presente invención abarca anticuerpos fusionados de forma recombinante o conjugados químicamente (incluyendo tanto conjugaciones covalentes como no covalentes) a un polipéptido. Anticuerpos fusionados o

conjugados de la presente invención se pueden utilizar para la facilidad en la purificación. Véase, p. ej., Harbor et al, supra, y la publicación PCT WO 93/21232; documento EP 439.095; Naramura et al., Immunol. Lett. 39: 91-99 (1994); patente de EE.UU. Nº 5.474.981; Gillies et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 1428-1432 (1992); Fell et al., J. Immunol. 146: 2446-2452 (1991).

- 5 Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención pueden fusionarse con secuencias marcadoras, tal como un péptido, para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido hexa-histidina tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Tal como se describe en Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824 (1989), por ejemplo, la
10 hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson et al, Cell 37: 767 (1984)) y la etiqueta "flag".

Usos diagnósticos para anticuerpos

- 15 Los anticuerpos de la invención incluyen derivados que están modificados, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de manera que la unión covalente no interfiere con la unión al antígeno. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que han sido modificados, p. ej., por biotilación, HRP, o cualquier otro resto detectable.

- 20 Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar para, por ejemplo, pero no limitados a, detectar Factor D, incluyendo métodos de diagnóstico tanto in vitro como in vivo. Por ejemplo, los anticuerpos tienen uso en inmunoensayos para medir cualitativa y cuantitativamente los niveles de Factor D en muestras biológicas obtenidas de los ojos de los sujetos que padecen afecciones o enfermedades oculares. Típicamente, se describen inmunoensayos en, p. ej., Harlow et al, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988.).

- 25 Tal como se comenta con mayor detalle a continuación, los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar solos o en combinación con otras composiciones. Los anticuerpos pueden además fusionarse de forma recombinante a un polipéptido heterólogo en el extremo N o C, o pueden conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones de manera covalente y no covalente) a polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden fusionarse de forma recombinante a o conjugarse con moléculas útiles tales como marcadores en ensayos de detección.

- 30 La presente invención abarca, además, el uso de anticuerpos o fragmentos de los mismos conjugados con un agente de diagnóstico para la detección de los niveles de componentes de la vía del complemento en el ojo de un individuo afectado. Los anticuerpos pueden utilizarse diagnósticamente, por ejemplo, para controlar el desarrollo o el progreso de una afección ocular o enfermedad como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, p. ej., determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse mediante acoplamiento del
35 anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones utilizando diversas tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente al anticuerpo (o fragmento del mismo) o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) utilizando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. Nº 4.741.900 para
40 iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen 125I, 131I, 111In o -
45 99Tc.

- 50 Los anticuerpos también pueden unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nilón, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno.

- Anticuerpos marcados, y derivados y análogos de los mismos, que se unen específicamente al Factor D se pueden utilizar para fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar o controlar enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas con la expresión y/o actividad aberrante de Factor D. La invención proporciona la detección de la
55 expresión aberrante de Factor D, que comprende (a) ensayar la expresión del factor D en células o fluido corporal de un individuo utilizando uno o más anticuerpos de la presente invención específicos para Factor D y (b) comparar el nivel de la expresión génica con un nivel de expresión génica estándar, con lo cual un aumento o disminución en el nivel de expresión del factor D ensayado en comparación con el nivel de expresión estándar es indicativo de la expresión aberrante.

Los anticuerpos pueden utilizarse para detectar la presencia y/o niveles de Factor D en una muestra, p. ej., fluido ocular. El método de detección puede comprender poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-Factor D y determinar la cantidad de anticuerpo que se une a la muestra.

- 5 La invención proporciona un ensayo de diagnóstico para el diagnóstico de un trastorno, que comprende (a) ensayar la expresión del Factor D en células o fluido corporal de un individuo utilizando uno o más anticuerpos de la presente invención y (b) comparar el nivel de la expresión génica con un nivel de expresión génica estándar, con lo cual un aumento o disminución en el nivel de expresión génica ensayado en comparación con el nivel de expresión estándar es indicativo de un trastorno particular.

- 10 Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para ensayar niveles de proteína en una muestra biológica utilizando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos por los expertos en la técnica (p. ej., véase Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101: 976-985 (1985); Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 105: 3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión génica de proteínas incluyen inmunoensayos tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Marcadores de ensayo de anticuerpos adecuados son conocidos en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos tales como glucosa oxidasa;
- 15 radioisótopos tales como yodo (¹²⁵I, ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹¹²In) y tecnecio (⁹⁹Tc); marcadores luminiscentes tales como luminol; y marcadores fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

- 20 Un aspecto de la invención es la detección y el diagnóstico de una enfermedad o trastorno asociado con la activación del complemento en los ojos de un sujeto, preferiblemente un mamífero y lo más preferiblemente un ser humano. En una realización, el diagnóstico comprende: a) tomar una muestra del ojo de un paciente; b) medir el nivel de componentes del complemento, tal como C3a o C3b o C5a.

El nivel de fondo puede determinarse mediante diversos métodos que incluyen, comparar la cantidad de molécula marcada detectada con un valor estándar determinado previamente para un sistema particular.

- 25 En una realización, el seguimiento de la enfermedad o trastorno se lleva a cabo repitiendo el método para diagnosticar la enfermedad o la enfermedad, por ejemplo, un mes después del diagnóstico inicial, seis meses después del diagnóstico inicial, un año después del diagnóstico inicial, etc.

Usos terapéuticos de los inhibidores de la vía del complemento

- 30 Inhibidores de la vía del complemento se pueden administrar a un sujeto que padece una enfermedad ocular como la degeneración macular relacionada con la edad. Un anticuerpo, con o sin un resto terapéutico conjugado a él, se puede utilizar como agente terapéutico. La presente invención está dirigida al uso de inhibidores de la vía del complemento, en particular los anticuerpos, que comprende administrar dichos inhibidores a un animal, un mamífero o un ser humano, para tratar una enfermedad, trastorno o afección ocular, que implica la activación de la vía del complemento. El animal o sujeto puede ser un animal en necesidad de un tratamiento particular tal como un animal al que se ha diagnosticado un trastorno particular, p. ej., uno relativo al complemento. Los anticuerpos dirigidos
- 35 contra el Factor D son útiles para inhibir la vía alternativa del complemento y, de este modo, inhibir trastornos o afecciones relacionados con la vía del complemento. En particular, la presente invención se refiere al tratamiento de la AMD, retinopatía diabética y la neovascularización coroidea. Por ejemplo, mediante la administración de una dosis terapéuticamente aceptable de un anticuerpo, o anticuerpos, de la presente invención, o un cóctel de los presentes anticuerpos, o en combinación con otras moléculas de diferentes fuentes, los efectos de la activación de
- 40 componentes de la vía del complemento pueden ser reducidos o eliminados en el mamífero tratado.

- Los compuestos terapéuticos de la invención incluyen, pero no se limitan a los anticuerpos de la invención (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos tal como se describe en esta memoria) y ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de la invención tal como se describe a continuación (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos y anticuerpos anti-idiotipo tal como se describe en este documento). Los
- 45 anticuerpos de la invención pueden utilizarse para tratar, inhibir o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con una expresión aberrante y/o actividad de la vía del complemento, en particular la vía alternativa, y en particular Factor D. El tratamiento y/o la prevención de enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la expresión y/o actividad aberrante de Factor D incluye, pero no se limita a, el alivio de al menos uno de los síntomas asociados con esas enfermedades, trastornos o afecciones. Los anticuerpos de la invención pueden proporcionarse
- 50 en composiciones farmacéuticamente aceptables tal como se conoce en la técnica o como se describe en esta memoria.

- La cantidad del anticuerpo que será eficaz en el tratamiento, inhibición y prevención de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o activación de la vía del complemento aberrante puede determinarse por técnicas clínicas estándares. El anticuerpo se puede administrar en regímenes de tratamiento consistentes con la
- 55 enfermedad, p. ej., una sola o unas pocas dosis a lo largo de uno a varios días para mejorar un estado patológico o dosis periódicas durante un tiempo prolongado para prevenir enfermedades o afecciones oculares.

Además, los ensayos in vitro se pueden emplear opcionalmente para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración, y

la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. Dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo in vitro o de modelos animales.

5 Para los anticuerpos, la dosificación administrada a un paciente es típicamente de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosificación administrada a un paciente es de entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg de peso corporal del paciente, más preferiblemente de 1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal del paciente. Generalmente, los anticuerpos humanos tienen una semivida más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmune a los polipéptidos extraños. Por lo tanto, a menudo son posibles dosis más bajas de anticuerpos humanos y una administración menos frecuente. Además, la dosis y frecuencia de administración de anticuerpos de la invención pueden reducirse potenciando la captación y penetración tisular (p. ej., en el cerebro) de los anticuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación. En un aspecto preferido, el anticuerpo se purifica sustancialmente (p. ej., está sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados).

15 Se conocen diversos sistemas de entrega y se pueden utilizar para administrar un anticuerpo de la presente invención, incluyendo la inyección, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor (véase, p. ej., Wu et al., J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral o de otro tipo, etc.

20 El anticuerpo se puede administrar al mamífero de cualquier manera aceptable. Métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, por inhalación y oral. Sin embargo, para el propósito de la presente invención, la vía de administración preferida es intraocular.

25 La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los anticuerpos terapéuticos o composiciones de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluyendo la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular se puede facilitar mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un recipiente Ommaya.

30 En otra realización, el anticuerpo puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, Science 249: 1527-1533 (1990); Treat et al, en Liposomes in the Therapy of Infections Disease and Cancer, López-Berestein y Fidler (comps.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); López-Berestein, ibid, págs. 317-327; véase en general ibid.).

35 En aún otra realización, el anticuerpo se puede suministrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede utilizar una bomba (véase Langer, supra; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Ing. 14: 201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88: 507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321: 574 (1989)). En otra realización, se pueden utilizar materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (comps.), CRC Pres., Boca Ratón, Florida. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drugs Product Design and Performance, Smolen y Ball (comps.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, J., Macromol. Sci. Rev.

Macromol. Chem. 23:61 (1983); véase también Levy et al, Science 228: 190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25: 351 (1989); Howard et al., J. Neurosurg. 71: 105 (1989)). En todavía otra realización, un sistema de liberación controlada puede ser colocado en la proximidad de la diana terapéutica.

40 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas útiles en el presente método. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo y un soporte fisiológicamente aceptable. En una realización específica, la expresión "fisiológicamente aceptable" significa aprobado por una Agencia Reguladora del Gobierno Federal o Estatal o listado en la Farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "soporte" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales soportes fisiológicos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un soporte preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Disoluciones salinas y disoluciones de dextrosa y glicerol acuosas también pueden emplearse como soportes líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tampón de pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir soportes estándares tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de soportes adecuados se describen en "Remington Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martín. Tales composiciones contendrán una cantidad

eficaz del anticuerpo, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

En una realización, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado anhidro en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o un sobre que indique la cantidad de agente activo. Cuando la composición se ha de administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua de calidad farmacéutica estéril o solución salina. Cuando la composición se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

La invención también proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociado con un recipiente o recipientes puede existir una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, nota que refleje la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para la administración humana.

Además, los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse con diversas moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionucleótidos o toxinas. Véase, p. ej., las publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la patente de EE.UU. N° 5.314.995; y el documento EP 396.387. Un anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse a un resto terapéutico tal como una citotoxina, p. ej., un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ion metálico radiactivo, p. ej., emisores alfa tales como, por ejemplo, ²¹³Bi. Un agente de citotoxina o citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracina-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p. ej., daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)), y agentes anti-mitóticos (p. ej., vincristina y vinblastina).

Técnicas para conjugar un resto terapéutico de este tipo con anticuerpos son bien conocidas, véase, p. ej., Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (comps.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson et al. (comps.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (comps.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (comps.), págs. 303-16 (Academic Press, 1985), y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62: 119-58 (1982). Alternativamente, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo. (Véase, p. ej., Segal en la patente de EE.UU. N° 4.676.980).

Los conjugados de la invención pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica dada, el agente terapéutico o resto de fármaco no debe ser interpretado como limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de la difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, p. ej., TNF- α , TNF- β , AIM I (véase, la Publicación Internacional N° WO 97/33899), AIM II (véase, la Publicación Internacional N° WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi et al., Int. Immunol., 6: 1567-1574 (1994)), VEGF (véase la Publicación Internacional N° WO 99/23105), un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, p. ej., angiostatina o endostatina; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), Factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos ("GM-CSF"), Factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros Factores de crecimiento.

Terapia génica basada en anticuerpos

En un otro aspecto de la invención, los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos, se administran para tratar, inhibir o prevenir una enfermedad o trastorno

asociado con la expresión aberrante y/o activación de la vía del complemento por medio de la terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada por la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su proteína codificada que media en un efecto terapéutico. Cualquiera de los métodos de terapia génica disponibles se puede utilizar de acuerdo con la presente invención. Métodos a modo de ejemplo se describen a continuación.

Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 12: 488-505 (1993); Wu y Wu, *Biotherapy* 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260: 926-932 (1993); y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217 (1993); May, *TIBTECH* 11 (5): 155-215 (1993).

En un aspecto, el compuesto comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo, siendo parte dichas secuencias de ácidos nucleicos de vectores de expresión que expresan el anticuerpo o fragmentos o proteínas quiméricas o cadenas pesadas o ligeras del mismo en un huésped adecuado. En particular, tales secuencias de ácidos nucleicos tienen promotores operativamente enlazados a la región codificadora de anticuerpos, siendo dicho promotor inducible o constitutiva y, opcionalmente, específico para el tejido.

En otra realización particular, se utilizan moléculas de ácidos nucleicos en las que las secuencias codificadoras del anticuerpo y cualesquiera otras secuencias deseadas están flanqueadas por regiones que fomentan la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando de este modo la expresión intracromosómica del anticuerpo que codifica ácidos nucleicos (Koller y Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8932-8935 (1989); Zijlstra et al, *Nature* 342: 435-438 (1989)). En realizaciones específicas, la molécula de anticuerpo expresada es un anticuerpo de cadena sencilla; alternativamente, las secuencias de ácidos nucleicos incluyen secuencias que codifican tanto las cadenas pesadas como ligeras, o fragmentos de las mismas, del anticuerpo.

El suministro de los ácidos nucleicos a un paciente puede ser directo, en cuyo caso el paciente es expuesto directamente al ácido nucleico o a vectores portadores de ácidos nucleicos, o indirecto, en cuyo caso, las células se transforman primero con los ácidos nucleicos *in vitro* y luego son trasplantadas al paciente. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

En una realización específica, las secuencias de ácidos nucleicos se administran directamente *in vivo*, en donde se expresan para producir el producto codificado. Esto se puede lograr por cualquiera de numerosos métodos conocidos en la técnica, p. ej., mediante la construcción de los mismos como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y la administración de modo que se conviertan en intracelulares, p. ej., mediante infección utilizando vectores retrovirales defectuosos o atenuados u otros vectores virales (véase la Patente de EE.UU. Nº. 4.980.286.), o mediante inyección directa de ADN desnudo, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (p. ej., una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o mediante la administración de los mismos en unión a un péptido que se sabe que penetra en el núcleo, administrándolo en unión a un ligando sometido a endocitosis mediada por receptor (véase, p. ej., Wu y Wu, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432 (1987)) (que puede ser utilizado para fijar como objetivo tipos celulares que expresan específicamente los receptores), etc.

En otra realización, se pueden formar complejos de ligando de ácido nucleico en donde el ligando comprende un péptido viral fusogénico para alterar endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosomal. En aún otra realización, el ácido nucleico puede dirigirse *in vivo* para la captación y expresión específica de células, al fijar como objetivo un receptor específico (véanse, p. ej., las publicaciones PCT WO 92/06180; WO 92/22635; WO 92/20316; WO 93/14188, WO 93/20221). Alternativamente, el ácido nucleico puede ser introducido intracelularmente e incorporado dentro del ADN de la célula huésped para la expresión, por recombinación homóloga (Koller y Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8932-8935 (1989); Zijlstra et al, *Nature* 342: 435-438 (1989)).

En una realización específica, se utilizan vectores virales que contengan secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, se puede utilizar un vector retroviral (véase Miller et al., *Meth. Enzymol.* 217: 581-599 (1993)). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el correcto empaquetamiento del genoma viral y la integración en el ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo a ser utilizado en la terapia génica se clonan en uno o más vectores, lo que facilita la entrega del gen en un paciente. Más detalles acerca de los vectores retrovirales se pueden encontrar en Boesen et al, *Biotherapy* 6: 291-302 (1994), que describe el uso de un vector retroviral para suministrar el gen *mdrl* a las células madre hematopoyéticas con el fin de hacer las células madre más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes et al, *J. Clin. Invest.* 93: 644-651 (1994); Kiem et al, *Blood* 83: 1467-1473 (1994); Salmones y Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4: 129-141 (1993); y Grossman y Wilson, *Curr. Opin. Gen. and Dev.* 3: 110-114 (1993).

Los adenovirus también se pueden utilizar en la presente invención. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos en la presente invención para suministrar anticuerpos para el epitelio respiratorio. Los adenovirus infectan de forma natural el epitelio respiratorio. Otros objetivos para los sistemas de suministro basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y el músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no se dividen. Kozarsky y Wilson, *Curr. Opin. Gen. Dev.* 3: 499-503 (1993).

presentan una revisión de la terapia génica basada en adenovirus. Bout et al, Human Gene Therapy 5: 3-10 (1994) demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes al epitelio respiratorio de monos rhesus. Otros ejemplos del uso de adenovirus en terapia génica pueden encontrarse en Rosenfeld et al, Science 252: 431-434 (1991); Rosenfeld et al, Cell 68: 143-155 (1992); Mastrangeli et al., J. Clin. Invest. 91: 225-234 (1993); Publicación PCT WO 94/12649; y Wang, et al., Gene Therapy 2: 775-783 (1995). También se han propuesto virus adeno-asociados (AAV) para uso en terapia génica (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289-300 (1993); patentes de EE.UU. N°s. 5.436.146; 6.632.670; 6.642.051).

Otro enfoque para la terapia génica implica transferir un gen a las células en cultivo tisular por métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio, o infección viral. Habitualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Las células se colocan entonces bajo selección para aislar aquellas células que han captado y expresan el gen transferido. Esas células se entregan a un paciente.

En esta realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Una introducción de este tipo puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago que contiene las secuencias de ácidos nucleicos, fusión celular, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. En la técnica son conocidas numerosas técnicas para la introducción de genes extraños en células (véase, p. ej., Loeffler y Behr, Meth. Enzymol. 217: 599-618 (1993); Cohen et al., Meth. Enzymol. 217: 618-644 (1993); Cline, Pharmac. Ther. 29: 69-92m (1985) y puede ser utilizadas de acuerdo con la presente invención, siempre que no se interrumpan las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células receptoras. La técnica debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que el ácido nucleico sea expresable por la célula y preferiblemente heredable y expresable por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes se pueden suministrar a un paciente por diversos métodos conocidos en la técnica. Células de la sangre recombinantes (p. ej., células madre o progenitoras hematopoyéticas) se administran preferiblemente por vía intravenosa. La cantidad de células previstas para uso depende del efecto deseado, estado del paciente, etc., y puede ser determinada por un experto en la técnica.

Células en las que un ácido nucleico se puede introducir para fines de terapia génica abarcan cualquier tipo de célula deseado, disponible, e incluyen pero no se limitan a células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células de la sangre tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, p. ej., tal como se obtienen de la médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

En una realización, la célula utilizada para la terapia génica es autóloga para el paciente. Secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la presente invención se introducen en las células de tal manera que son expresables por las células o su progenie, y las células recombinantes se administran luego *in vivo* para el efecto terapéutico. En una realización específica, se derivan o se utilizan células progenitoras. Cualquier célula madre y/o progenitora que pueda aislarse y mantenerse *in vitro* puede ser potencialmente utilizada de acuerdo con esta realización de la presente invención (véase, p. ej., la Publicación PCT WO 94/08598; Stemple y Anderson, Cell 71: 973-985 (1992); Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A: 229 (1980); y Pittelkow y Scott, Mayo Clinic Proc. 61: 771 (1986)).

Modulación de la expresión del componente de la vía del complemento por ARNsi

ARNsis han demostrado ser útiles como herramienta en estudios de modulación de la expresión génica donde los antagonistas tradicionales, tales como pequeñas moléculas o anticuerpos, pueden ser menos eficaces. (Shi Y., Trends in Genetics 19 (1): 9-12 (2003)). ARNs de doble cadena, sintetizados *in vitro*, que son de 21 a 23 nucleótidos de longitud pueden actuar como ARNs de interferencia (ARNis) y pueden inhibir específicamente la expresión génica (Fire A., Trends in Genetics 391, 806-810 (1999)). Estos ARNs actúan por mediación de la degradación de sus ARNs diana. Puesto que son de menos de 30 nucleótidos de longitud, no desencadenan un mecanismo de defensa antiviral de la célula. Tales mecanismos incluyen la producción de interferón, y una interrupción general de la síntesis de proteínas de la célula huésped. Prácticamente, los ARNsis pueden ser sintetizados y luego clonados en vectores de ADN. Tales vectores se pueden transfectar y se hacen para que expresen el ARNsi en niveles altos. El alto nivel de expresión de ARNsi se utiliza para "inactivar" o reducir significativamente la cantidad de proteína producida en una célula y, por lo tanto, es útil en experimentos en los que se cree que la sobre-expresión de una proteína está vinculada a un trastorno como el cáncer. ARNsis son antagonistas útiles para complementar proteínas de la vía mediante la limitación de la producción celular del antígeno y para inhibir la activación de la cascada del complemento.

Peptidomiméticos y pequeñas moléculas

Es bien conocido por los expertos normales en la técnica que es posible reemplazar los péptidos por peptidomiméticos. Los peptidomiméticos son generalmente preferibles como agentes terapéuticos a péptidos debido

a su biodisponibilidad mejorada y a la relativa falta de ataque de las enzimas proteolíticas. Se pueden utilizar técnicas de modelado molecular para diseñar un peptidomimético que imite la estructura de los péptidos del complemento relacionados descritos en esta memoria. Por consiguiente, la presente invención también proporciona peptidomiméticos y otros compuestos de plomo que pueden ser identificados en base a los datos obtenidos a partir del análisis estructural de la proteína de la vía del complemento. Un análogo potencial de Factor D puede ser examinado a través del uso de modelos de ordenador utilizando un programa de acoplamiento tal como GRAM, DOCK o AUTODOCK. Este proceso puede incluir un ajuste de ordenador de análogos potenciales de Factor D. Los programas de ordenador también se pueden emplear para estimar la atracción, repulsión y el impedimento estérico de un análogo a un potencial sitio de unión. Generalmente, cuanto más apretado sea el ajuste (p. ej., cuanto menor sea el impedimento estérico y/o cuanto mayor sea la fuerza de atracción) más potente será fármaco potencial, ya que estas propiedades son consistentes con una constante de unión más fuerte. Además, cuanto mayor sea la especificidad en el diseño de un fármaco potencial, más probable será que el fármaco no interfiera con otras propiedades del sistema de expresión. Esto reducirá al mínimo los posibles efectos secundarios no deseados debido a las interacciones con otras proteínas.

Inicialmente un potencial análogo de factor D se podría obtener mediante el rastreo de un banco aleatorio de péptidos producido por un bacteriófago recombinante, por ejemplo, o un banco químico. Un ligando análogo seleccionado de esta manera podría entonces ser modificado de manera sistemática por los programas de modelado por ordenador hasta que se identifiquen uno o más ligandos potenciales prometedores.

Un modelado por ordenador de este tipo permite la selección de un número finito de modificaciones químicas racionales, en oposición a la innumerable cantidad de modificaciones químicas esencialmente aleatorias que se podrían hacer, y de la que cualquiera podría conducir a un fármaco útil. Por lo tanto, mediante el uso de la estructura tridimensional descrita en esta memoria y del modelado por ordenador, un gran número de compuestos se rastrea rápidamente y se pueden determinar unos pocos candidatos probables sin la síntesis laboriosa de un número incalculable de compuestos.

Una vez que se identifica un potencial análogo de factor D, éste se puede seleccionar ya sea a partir de un banco de productos químicos comercialmente disponibles de la mayoría de las grandes compañías químicas grandes incluyendo Merck, GlaxoWellcome, Bristol Meyers Squib, Monsanto/Searle, Eli Lilly, Novartis y Pharmacia Upjohn o, alternativamente, el potencial ligando se sintetiza de novo. Tal como se mencionó anteriormente, la síntesis de novo de un o incluso un grupo relativamente pequeño de compuestos específicos es razonable en la técnica de diseño de fármacos.

Alternativamente, en base a las estructuras moleculares de las regiones variables de los anticuerpos anti-Factor D, se podría utilizar el modelado molecular y el diseño molecular racional para generar y detectar pequeñas moléculas que imitan las estructuras moleculares de la región de unión de los anticuerpos e inhibir las actividades de Factor D. Estas pequeñas moléculas pueden ser péptidos, peptidomiméticos, oligonucleótidos o compuestos orgánicos.

Ejemplo

Eficacia de Anticuerpo en una neovascularización coroidea (CNV) inducida por láser como un modelo de AMD húmeda

La eficacia de las inyecciones intraoculares de un anticuerpo se puede someter a ensayo en un modelo de CNV de lesión por láser tal como se describe anteriormente por Krzystolik MG et al. (Arco Ophthalm. 2002; 120: 338-346). Este modelo puede ser utilizado para someter a ensayo la eficacia de cualquier fármaco candidato para la prevención y/o mejora de AMD. Este modelo de CNV inducida por láser utiliza láser de argón verde para inducir la CNV en la mácula de mono. Existe una buena correlación entre el número de lesiones de la CNV con fugas angiográficas significativas.

Hay dos fases de los estudios: Fase 1, la fase de prevención, implica el inicio del tratamiento con anticuerpos antes de la inducción por láser de la CNV y 1 semana después de la exposición al láser para inhibir la formación de CNV, que aparece típicamente de 2 a 3 semanas después de la lesión por láser. Fase 2, la fase de tratamiento, se inició el día 42 (3 semanas después de la lesión con láser), cuando se esperarían lesiones de la CNV en los ojos de control de la fase 1. La fase 2 evalúa el efecto del tratamiento sobre la atenuación de la extensión y la permeabilidad de las lesiones de CNV existentes.

Diez monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) se utilizan típicamente en un estudio de este tipo. Los monos se anestesiaron para todos los procedimientos con inyecciones intramusculares de, p. ej., hidrocloreto de ketamina (20 mg/kg); maleato de acepromazina (0,125 mg/kg); y sulfato de atropina (0,125 mg/kg). Se puede administrar una anestesia suplementaria de 5 a 6 mg/kg de hidrocloreto de ketamina, según sea necesario. Además, para la anestesia tópica se utiliza típicamente 0,5% de hidrocloreto de proparacaína. Antes de la enucleación se puede administrar una anestesia complementaria, con solución intravenosa de pentobarbital sódico (5 mg/kg). Los animales fueron sacrificados después de la experimentación.

Tratamiento con anticuerpos

El anticuerpo a ensayar se administra en un tampón fisiológico a una concentración de aproximadamente, p. ej., 10 µg/µL. Al ojo de control se le inyecta un vehículo que consiste en todos los componentes excepto el anticuerpo a ensayar. Inyecciones intraoculares de alrededor de, por ejemplo, 50 µL por ojo, ya sea con el anticuerpo o el vehículo se realiza en cada ojo, respectivamente, a través de la para plana utilizando una aguja de calibre 30 y una jeringa de tuberculina después de instilar una anestesia tópica y disolución de yodo povidona al 5%. El anticuerpo se retira de un vial a través de un filtro de 5 µm, y una nueva aguja (afilada) de calibre 30 se utiliza para la inyección intraocular. Después de la inyección, una pomada oftálmica bactericida como bacitracina se instila en los fondos del saco. Los sitios de inyección se varían típicamente para evitar el trauma a la esclerótica.

- 5 En la fase 1, el ojo derecho o izquierdo de cada uno de los animales se asignaron aleatoriamente para recibir inyecciones intraoculares de anticuerpos a una dosis de alrededor de, por ejemplo, 500 µg (50 µL por ojo), y este ojo se denomina el ojo prevención. La dosis utilizada puede determinarse sobre la base de un estudio de seguridad y toxicología antes de este estudio de eficacia, o por otros medios apropiados clínicamente. El otro ojo se asigna a recibir inyecciones intraoculares de vehículo y se denomina el ojo de control. Los dos ojos de cada uno de los animales reciben típicamente dos inyecciones intraoculares, ya sea con el anticuerpo a ensayar o el vehículo solo los días 0 y 14 antes del tratamiento con láser. El día 21, todos los ojos se someten a una fotocoagulación con láser de argón verde para inducir lesiones de la CNV. El día 28, una semana después de la inducción por láser, el ojo prevención recibe otra inyección de anticuerpo y el ojo de control recibe vehículo. La fase 2 del estudio comienza el día 42 o 3 semanas después de la inducción por láser, cuando se espera que se haya desarrollado una CNV. Tras la angiografía con fluoresceína el día 42, los dos ojos de cada uno de los animales recibirá inyecciones intraoculares de anticuerpos a una dosis de alrededor de, por ejemplo, 500 g (50 µL por ojo), y esto se repite el día 56.

Inducción de cnv experimental

- 25 Las membranas de la CNV se inducen en la mácula de monos cynomolgus con quemaduras por láser de argón verde (Coherent Argon Dye Laser 920; Coherent Medical Laser, Palo Alto, Calif.) utilizando una lámpara de hendidura y una lente de contacto de fondo plano. Nueve lesiones se colocan simétricamente en la mácula de cada uno de los ojos por un cirujano enmascarado. Las variables de láser incluyen un tamaño del punto de 50 a 100 µm, 0,1 segundos de duración y la potencia que oscila entre 350 y 700 mW. La potencia utilizada se determina por la capacidad del láser para producir una ampolla y una pequeña hemorragia bajo la potencia elegida. Si no se observa hemorragia, un punto de láser adicional será colocado adyacente al primer lugar siguiendo el mismo proceso láser. 30 Fotografías en color y angiografía con fluoresceína se utilizan normalmente para detectar y medir el alcance y la permeabilidad de la CNV. Sin embargo, se puede utilizar cualquier método capaz de medir la CNV inducida por láser y sus efectos asociados.

Exámenes oculares

- 35 Los ojos de los animales se comprueban en cuanto al defecto pupilar aferente y luego se dilatan con hidrocloreto de fenilefrina al 2,5% y tropicamida al 0,8%. Los dos ojos se examinan mediante biomicroscopía con lámpara de hendidura y oftalmoscopia indirecta los días 0, 14, 28, 42 y 56 (antes de la inyección de anticuerpos); los días 1, 15, 29, 43 y 57 (después de la inyección); el día 21 (antes del láser); los días 35 y 49 (días intermedios); y el día 63 (enucleación y muerte).

Fotografía en color y angiografía con fluoresceína

- 40 La fotografía del fondo se realiza normalmente en todos los animales en los mismos días que el examen ocular. Las fotografías pueden ser obtenidas con una cámara de fondo de ojo (Canon Fundus CF-60Z, Canon USA Inc, Lake Success, NY) y película de 35 mm, pero se puede utilizar cualquier dispositivo fotográfico.

- 45 Se puede utilizar el Sistema de Angiografía Imagenet Digital (Topcon 501 A y sistema Imagenet; Topcon America Corp, Paramus, NJ) para la angiografía con fluoresceína. Típicamente se obtienen fotografías libres de color rojo de ambos ojos seguido por la angiografía con fluoresceína utilizando 0,1 mL/ kg de peso corporal de fluoresceína sódica al 10% (Akorn Inc, Abita Springs, La) a una velocidad de 1 mL/s. Después de la inyección de fluoresceína, se obtiene una rápida serie de imágenes en el primer minuto del polo posterior, primero del ojo derecho y después del ojo izquierdo. Pares adicionales de imágenes se obtienen típicamente en aproximadamente 1 a 2 y 5 minutos. Entre 2 y 5 minutos, se toman de cada uno de los ojos dos imágenes de los campos de la periferia media (temporal y nasal). La angiografía con fluoresceína se realiza al inicio del estudio (día 0) y los días 7, 14, 29, 42, 49, 57 y 63.

Análisis de datos oftálmicos

- 55 Fotografías y angiografías se evalúan para la evidencia de fugas angiográficas, hemorragias o cualquier otra anomalía. Las hemorragias del fondo de ojo se clasifican sobre la base de un sistema de clasificación con hemorragias de la retina que implica menos de 3 áreas de disco se definen como de grado 1, hemorragias entre las zonas 3 y 6 de disco se definen como de grado 2 y hemorragias de más de 6 áreas de disco se definen como de grado 3. También se evalúa la asociación de hemorragias con membranas de la CNV o el sitio de inducción láser.

Un sangrado clínicamente significativo se define como cualquier hemorragia del fondo de ojo mayor que o igual a un área de 6 discos.

La inflamación ocular también se evaluó mediante una biomicroscopía con lámpara de hendidura. Células de la cámara anterior y vítreas se cuentan con una lámpara de hendidura de 2 mm a una gran ampliación y se clasifican utilizando el esquema de la Academia Americana de Oftalmología. Las lesiones de la CNV se califican mediante la revisión de las angiografías con fluoresceína realizadas los días 35, 42, 49, 56 y 63 por examinadores experimentados, típicamente dos, quienes clasifican mediante opinión de consenso. Las lesiones de la CNV se clasifican de acuerdo con el siguiente esquema, utilizando angiografías estandarizadas para la comparación. Lesiones de grado 1 no tienen hiperfluorescencia. Lesiones de grado 2 exhiben hiperfluorescencia sin fugas. Lesiones de grado 3 muestran hiperfluorescencia en las imágenes de principios o mediados de tránsito y fugas tardías. Lesiones de grado 4 muestran una hiperfluorescencia brillante en el tránsito y fugas tardías más allá de las áreas tratadas. Lesiones de grado 4 se definen como clínicamente significativas.

El análisis estadístico se puede realizar utilizando los Datos del Panel Agregados en la Población con Ecuaciones de Estimación Generalizadas y la relación de tasas de incidencia (IRR). La tasa de incidencia se define habitualmente como el número de lesiones de grado 4 que se producen durante un intervalo dado, dividido por el número total de lesiones inducidas. En la fase 1, la IRR se refiere a la relación de la tasa de incidencia de lesiones de grado 4 en los ojos de prevención a la tasa de incidencia en los ojos de control. Una IRR de 1 significa que no hay diferencia entre las tasas de incidencia. Un número mucho más pequeño que 1 indica una reducción en la incidencia de lesiones de grado 4 en el grupo de prevención frente al grupo de control. En la fase 2, se compara la incidencia de lesiones de grado 4 en los ojos de control frente a los ojos de tratamiento. Esto significa que la incidencia de lesiones de grado 4 se compara a lo largo del tiempo en el conjunto de ojos que se asignan primero al grupo control, pero los días 42 y 56 se tratan con anticuerpos y se convierten en los ojos de tratamiento.

Rastreo de agentes de útiles en el tratamiento de amd

El estudio y tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) pueden llevarse a cabo utilizando un nuevo modelo animal, que comprende ratones deficientes ya sea en proteína quimiotáctica de monocitos-1 (Ccl-2, también conocida como MCP-1) o su receptor 2 de quimioquinas C-C cognatas (Ccr-2) (Ambati, J. et al. Nat Med. noviembre de 2003; 9 (11): 1390-7. Epub 19 de octubre de 2003). Estos ratones desarrollan características cardinales de AMD, incluyendo acumulación de lipofusina en y drusas debajo del epitelio pigmentado de la retina (RPE), la atrofia de los fotorreceptores y la neovascularización coroidea (NVC).

El tratamiento de estos ratones con un agente deseado puede permitir la evaluación de la eficacia de un agente por su eficacia en el tratamiento de AMD.

Realizaciones preferidas:

1. Un método para prevenir o mejorar una enfermedad ocular en un sujeto, que comprende la etapa de administrar un inhibidor de la vía del complemento a un sujeto en necesidad de tal administración.

2. El método del punto 1, en el que la vía del complemento es la vía alternativa del complemento.

3. El método de acuerdo con el punto 1, en el que la enfermedad ocular se selecciona del grupo que consiste en degeneración de la retina, retinopatía diabética y angiogénesis ocular.

4. El método de acuerdo con el punto 3, en el que el sujeto requiere la inhibición de la neovascularización ocular que afecta a la coroides, el epitelio pigmentado de la retina o tejido de la retina.

5. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1-4, en el que el inhibidor de la vía del complemento es un anticuerpo, una proteína, un péptido, un peptidomimético o una molécula pequeña.

6. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1-4, en el que el inhibidor de la vía del complemento es Factor H o un péptido funcional de la misma.

7. El método de acuerdo con el punto 1, en el que el inhibidor de la vía del complemento es un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo.

8. El método de acuerdo con el punto 7, en el que el inhibidor del complemento es un fragmento de anticuerpo que comprende un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o un Fv de cadena sencilla.

9. El método de acuerdo con el punto 7, en el que el inhibidor del complemento es un anticuerpo de dominio único.

10. El método de acuerdo con el punto 7, en el que el inhibidor del complemento es un anticuerpo monoclonal.

11. El método de acuerdo con el punto 7, en el que el inhibidor del complemento es un anticuerpo quimérico, desimmunizado, humanizado, humano o primatizado.

12. El método de acuerdo con el punto 7, en el que el anticuerpo se une específicamente a un componente de la vía alternativa del complemento.
13. El método de acuerdo con el punto 12, en el que el anticuerpo se une específicamente al factor D, properdina, Factor B, Factor Ba o Factor Bb.
- 5 14. El método de acuerdo con el punto 13, en el que el anticuerpo se une específicamente al factor D.
15. El método de acuerdo con el punto 14, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal 166-32 producido a partir del hibridoma depositado en la ATCC y designado HB12476.
16. El método de acuerdo con el punto 14, en el que el anticuerpo se une específicamente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 166-32 producido a partir del hibridoma depositado en la ATCC y designado HB12746.
- 10 17. El método de acuerdo con el punto 14, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado 166-32 producido a partir del hibridoma depositado en la ATCC y designado HB12746.
18. El método de acuerdo con el punto 7, en el que el anticuerpo se une específicamente a un componente de la vía clásica o del complemento de lectina.
- 15 19. El método de acuerdo con el punto 18, en el que el anticuerpo se une específicamente a C2, C2a, C3a, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9 o C5b-9.
20. El método de acuerdo con el punto 18, en el que el anticuerpo se une específicamente al componente C5a del complemento.
21. El método de acuerdo con el punto 20, en el que el anticuerpo es 137-26 producido a partir del hibridoma depositado en la ATCC y designado PTA-3650.
- 20 22. El método de acuerdo con el punto 20, en el que el anticuerpo se une al mismo epítipo que 137-26 producido a partir del hibridoma depositado en la ATCC y designado PT-3650.
23. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1-22, en el que el inhibidor de la vía del complemento se administra por (a) administración parenteral, administración oral, administración enteral o administración tópica (b) implante de liberación sostenida bioerosionable o biocompatible; (c) la implantación de una bomba de infusión; o (d) la administración local tal como la administración intravítrea o administración subconjuntival.
- 25 24. El método de acuerdo con el punto 23, en el que la administración tópica es una disolución de lavado de ojos, una pomada para los ojos, un protector de ojos o un colirio en solución.
25. El método de acuerdo con el punto 23, que comprende, además, la etapa de administrar un compuesto inmunomodulador o inmunosupresor a dicho sujeto.
- 30 26. Un método para inhibir la activación de la vía alternativa del complemento en un sujeto que tiene una enfermedad ocular, que comprende administrar un ARNsi específico para una proteína de la vía del complemento.
27. Un método para inhibir la activación de la vía alternativa del complemento en un paciente que tiene una enfermedad ocular, que comprende administrar un ácido nucleico que codifica un inhibidor de la vía del complemento.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un inhibidor del complemento para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad ocular asociada con la activación del complemento de un sujeto, en donde el inhibidor del complemento es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a Factor D.
2. El inhibidor del complemento para uso de la reivindicación 1, en donde el fragmento de unión a antígeno comprende un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, un Fv de cadena sencilla, diacuerpo o un anticuerpo de dominio sencillo.
- 10 3. El inhibidor del complemento para uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo desinmunizado, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo primatizado o un anticuerpo humano.
4. El inhibidor del complemento para uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo está conjugado con un resto terapéutico.
5. El inhibidor del complemento para uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 166-32 producido a partir del hibridoma depositado ante la ATCC y designado HB 12476.
- 15 6. El inhibidor del complemento para uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une específicamente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 166-32, y en donde el anticuerpo monoclonal 166-32 se produce a partir del hibridoma depositado ante la ATCC y designado HB 12476.
- 20 7. El inhibidor del complemento para uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, derivado del anticuerpo monoclonal 166-32, y en donde el anticuerpo monoclonal 166-32 se produce a partir del hibridoma depositado ante la ATCC y designado HB 12476.
8. Una composición farmacéutica que comprende el inhibidor del complemento según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un diluyente o soporte farmacéuticamente aceptable, en donde la composición es para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad ocular asociada con la activación del complemento en un sujeto.
- 25 9. La composición para uso de la reivindicación 8, que es una forma de administración intraocular, una forma de administración intravítrea, una forma de administración subconjuntival, una forma de administración parenteral, una forma de administración intradérmica, una forma de administración intramuscular, una forma de administración intraperitoneal, una forma de administración intravenosa, una forma de administración subcutánea, una forma de administración intranasal, una forma de administración oral, una forma de administración enteral, una forma de administración tópica, una forma de administración intratecal, una forma de administración intraventricular, una forma epidural, una forma de inhalación, un implante de liberación sostenida biocompatible o bioerosionable o una bomba de infusión implantada.
- 30 10. La composición para uso de la reivindicación 8, que es una disolución de lavado de ojos, una pomada para los ojos, un protector de ojos o un colirio en solución.
- 35 11. La composición para uso de la reivindicación 8, que comprende, además, o es para la administración con un compuesto inmunomodulador, un compuesto inmunosupresor, un compuesto anti-inflamatorio o un compuesto anti-angiogénico.
12. La composición para uso de la reivindicación 8, que comprende, además, o es para la administración con un esteroide.
- 40 13. La composición para uso de la reivindicación 8, en donde el inhibidor del complemento está en una cantidad entre 0,1 mg/kg y 100 mg/kg del peso corporal del sujeto.
14. Un inhibidor del complemento para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad ocular asociada con la activación del complemento en un sujeto, en donde el inhibidor del complemento es
 - 45 (i) un anticuerpo monoclonal 166-32 producido a partir del hibridoma depositado ante la ATCC y designado HB 12476 o un fragmento de unión a antígeno del mismo,
 - (ii) un anticuerpo que se une específicamente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 166-32 o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, o
 - (iii) un anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo monoclonal 166-32 o un fragmento de unión a antígeno del mismo,
- 50 en donde la enfermedad ocular es la degeneración macular, retinopatía diabética o angiogénesis ocular.

15. Uso de un inhibidor del complemento para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad ocular asociada con la activación del complemento en un sujeto, en donde el inhibidor del complemento es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a Factor D, o un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno.
- 5 16. El uso de la reivindicación 15, en donde el anticuerpo es anticuerpo monoclonal 166-32 producido a partir del hibridoma depositado ante la ATCC y designado HB 12746.
17. El uso de la reivindicación 15, en donde el anticuerpo se une específicamente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 166-32 producido a partir del hibridoma depositado ante la ATCC y designado HB 12746.
- 10 18. El uso de la reivindicación 15, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo monoclonal 166-32 producido a partir del hibridoma depositado ante la ATCC y designado HB 12746.
19. El inhibidor del complemento para uso de la reivindicación 1, la composición para uso de la reivindicación 8 o el uso de la reivindicación 15, en donde la enfermedad ocular es degeneración macular, retinopatía diabética o angiogénesis ocular.
- 15 20. El inhibidor del complemento para uso de la reivindicación 19, la composición para uso de la reivindicación 19 o el uso de la reivindicación 19, en donde la degeneración macular es la forma seca de la degeneración macular relacionada con la edad.
21. El inhibidor del complemento para uso de la reivindicación 19, la composición para uso de la reivindicación 19 o el uso de la reivindicación 19, en donde la degeneración macular es la forma húmeda de la degeneración macular relacionada con la edad.