

ANTICUERPOS ANTI-SEMA3A Y SUS USOS PARA TRATAR ENFERMEDADES OCULARES

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] En general, la presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de estos que actúan sobre la semaforina 3A (Sema3A). Más específicamente, se describen anticuerpos anti-Sema3A y métodos de uso para el tratamiento de varias enfermedades o trastornos. También se divulgan composiciones y kits farmacéuticos que comprenden el anticuerpo anti-Sema3A.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Las retinopatías isquémicas se caracterizan por la pérdida o disfunción de la vasculatura retinal, lo que da como resultado una reducción del flujo sanguíneo e hipoxia. La isquemia de la retina da como resultado una regulación ascendente de factores de crecimiento proangiogénicos que promueven la neovascularización retinal, lo que puede causar ceguera. Sin embargo, la revascularización de la retina isquémica no ocurre, cuando hay neovascularización patológica robusta en el cuerpo vítreo, una región del ojo que normalmente carece de vasos sanguíneos.

[0003] El crecimiento de estos nuevos vasos anormales crea la mayor amenaza para la visión, ya que pueden tener fugas, generar hemorragias o generar cicatrización que puede dar como resultado el desprendimiento de retina. Los tratamientos actuales para las retinopatías isquémicas intentan detener el crecimiento de los vasos patológicos, pero no abordan la isquemia subyacente que promueve su crecimiento. Además, el tratamiento estándar para la retinopatía diabética incluye la destrucción de una porción de la retina con un láser para intentar detener el nuevo crecimiento de vasos y conservar la visión central. Sin embargo, estos tratamientos, en cierta medida, son ineficaces. Aunque algunos pacientes pueden mantener una visión estable durante muchos años, un porcentaje alto de pacientes que padecen retinopatía en algún momento padecen una pérdida completa de visión.

[0004] En consecuencia, aún existe una necesidad no satisfecha de nuevos enfoques terapéuticos para tratar eficazmente enfermedades oculares o retinianas.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

[0005] Sema3A es una proteína secretada endógena que pertenece a la familia de semaforina de clase 3 (Sema3), que se identificaban originalmente como moléculas de guía axonal y que estaban involucradas en la formación de redes y localización de

vasos. La neuropilina 1 y 2 (Nrp1 y Nrp2) y las plexinas de tipo A/D (Plxns) actúan como los ligandos de fijación y las subunidades de transducción de señales de los complejos del receptor Sema3 en la superficie de células endoteliales (EC). Como un miembro especial de la familia Sema3, primero Sema3A se fija a Nrp1 exclusivamente y luego se combina con Plexina A1–4 como un complejo (Nrp1/PlexA1–4). En este complejo del receptor, Nrp1 actúa como un elemento de fijación, mientras que PlexA1–4 actúa como un elemento de transducción de señales.

[0006] La semaforina 3A humana es una proteína como se divulga en SEQ ID NO: 22 y está disponible en la secuencia de referencia NCBI NP_006071.1. Además, la Sema3A humana se codifica mediante ID de gen: 10371 (NCBI).

[0007] Sema3A se estudió en angiogénesis tumoral y metástasis durante años, pero todavía son poco claros sus efectos sobre la neovascularización retiniana. Los inventores ejemplificaron que la semaforina 3A es secretada mediante células ganglionares de la retina hipóxicas y que actúa como un indicio de repulsión de vasos. Sema3A repele vasos nuevos de la región isquémica induciendo un colapso del citoesqueleto en estas células. Sin intención de limitarse a ninguna teoría, los inventores plantearon que esto explicaría por qué la revascularización de regiones isquémicas no ocurre y, en cambio, la regulación ascendente de Sema3A genera una neovascularización patológica en la región del cuerpo vítreo.

[0008] La semaforina 3A se secreta mediante neuronas hipóxicas en la retina isquémica/avascular, por lo que se inhibe la regeneración vascular de la retina y mejora la neovascularización prerretiniana patológica.

[0009] Los inventores abordaron esta situación patológica mediante el desarrollo de anticuerpos que actúan sobre Sema3A. Por ende, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que específicamente se fijan a Sema3A, preferentemente Sema3A humana.

[0010] En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este que comprende:

- una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); y
- una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

[0011] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

- una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y
- una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13;

en donde:

- la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); y
- la región variable de la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

[0012] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

- una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y
- una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

[0013] En aun otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

- una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y
- una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

[0014] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

- a. una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 11, respectivamente;
- b. una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 11, respectivamente;
- c. una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 12, respectivamente; o
- d. una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 13, respectivamente,

[0015] En aun otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

- una cadena pesada que comprende, preferentemente que consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO: 19; y
- una cadena liviana que comprende, preferentemente que consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20.

[0016] En una forma de realización particular, la invención se refiere a un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

- a. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
- b. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
- c. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; o

- d. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

[0017] En una forma de realización de particular preferencia, el anticuerpo anti-Sema3A es un anticuerpo anti-Sema3A humanizado.

[0018] En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a al menos un residuo de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 370-382 de Sema3A humana como se ilustra en SEQ ID NO: 22.

[0019] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a al menos un residuo de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos como se indican en SEQ ID NO: 21 (DSTKDLPDDVITF). En una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a las regiones de aminoácidos como se indican en SEQ ID NO: 21.

[0020] En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este para uso como un medicamento:

[0021] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno para inhibir el efecto represor de vasos de SemaA, y/o para mejorar la revascularización de la retina.

[0022] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad retiniana u ocular.

[0023] En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este para el uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en retinopatía, retinopatía isquémica, retinopatía diabética que incluye retinopatía diabética proliferativa y retinopatía diabética no proliferativa, edema macular diabético, isquemia macular diabética, degeneración macular relacionada con la edad, retinitis pigmentosa, distrofia retiniana hereditaria, degeneración miópica, oclusiones arteriales de la retina, endoftalmitis, uveítis, edema macular cistoide, membrana neovascular coroidea secundaria a cualquier enfermedad retiniana, neuropatías ópticas, glaucoma, desprendimiento de retina, retinopatía tóxica, retinopatía por radiaciones, retinopatía

traumática, vasculopatía retiniana inducida por fármacos, neovascularización retiniana, vasculopatía coroidea polipoidea, vasculitis retiniana, microaneurisma retiniano, distrofia de Fuch, telangiectasia macular, síndrome de Usher y enfermedad de Stargardt.

[0024] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este para el uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en retinopatía diabética que incluye retinopatía diabética proliferativa y retinopatía diabética no proliferativa, retinopatía isquémica, edema macular diabético, isquemia macular diabética, edema macular relacionado con la edad, neovascularización retiniana, glaucoma y neovascularización coroidea. Preferentemente, dicha enfermedad es edema macular diabético y/o isquemia macular diabética.

[0025] En una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este para el uso en el tratamiento de isquemia macular diabética, promoviendo la regeneración vascular dentro de la retina isquémica (revascularización) y previniendo neovascularización patológica de la región del cuerpo vítreo del ojo.

[0026] En otra forma de realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este para el uso en el tratamiento de edema macular diabético, reduciendo la permeabilidad de la barrera hematorretiniana.

[0027] En otra forma de realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este para inhibir la permeabilidad inducida por Sema3A de la barrera hematorretiniana y/o regresión de los vasos inducida por Sema3A de áreas isquémicas.

[0028] En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-Sema3A, o fragmento de fijación al antígeno de este, y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0029] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, en donde el anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se administran por una vía de administración parenteral, intravenosa, intravítrea o subcutánea, preferentemente por vía intravítrea.

[0030] En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido

aislado o polinucleótidos que comprenden:

- una secuencia que codifica una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO: 19 o una región variable de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y
- una secuencia que codifica una cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20 o una región variable de la cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

[0031] En una forma de realización, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO: 19 o una región variable de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y una secuencia que codifica una cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20 o una región variable de la cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

[0032] En una forma de realización, la presente invención proporciona un vector viral que comprende un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO: 19 o una región variable de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y una secuencia que codifica una cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20 o una región variable de la cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

[0033] En una forma de realización, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende un vector de expresión o un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO: 19 o una región variable de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y una secuencia que codifica una cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20 o una región variable de la cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

[0034] En una forma de realización, la presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de

este que comprende la obtención de una célula huésped que comprende un vector de expresión o un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO: 19 o una región variable de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y una secuencia que codifica una cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 o una región variable de la cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13; y cultivar la célula huésped.

[0035] En una forma de realización, el método para producir un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, también comprende recuperar y purificar el anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0036] FIGURA 1: Ubicación de Sema3A en los ojos humanos.

Esta Figura muestra la ubicación de Sema3A en los ojos humanos en muestras de retina especificadas previamente de donantes humanos con antecedentes de retinopatía diabética o glaucoma de ángulo abierto primario (POAG) en comparación con controles de la misma edad (ctrl de edad) y sujetos con diabetes, pero sin patología ocular (ctrl de DM). Sema3A se encontró en la pared de la vasculatura de vasos sanguíneos retinianos. Además, se observaron objetos fluorescentes no identificados pero distintivos de Sema3A en la capa de células ganglionares retinianas.

[0037] FIGURA 2: Eficacia en el ensayo de permeabilidad celular.

La permeación de FITC-dextrano en células endoteliales microvasculares retinianas humanas se mide en un ensayo de Transwell. El anti-TNP es un anticuerpo de control contra trinitrofenol. El anti-Sema3A es un anticuerpo de acuerdo con la invención (clon I). La significancia se muestra frente a la Sema3A humana recombinante.

[0038] FIGURA 3: Colapso del citoesqueleto en HRMEC (Xcelligence).

Todas las Sema3A-F inducen un colapso del citoesqueleto en células endoteliales retinianas humanas. El anticuerpo de la invención (clon I) es específico para Sema3A y previene solo el colapso inducido por Sema3A.

[0039] FIGURA 4: Eficacia en la densidad de células líder y área avascular *in vivo*.

(A) y (C) La densidad de células líder y área avascular se investigaron en un modelo de retinopatía inducida por oxígeno en crías de ratón. Los animales se expusieron a 75 % de oxígeno de P7 a P12 y recibieron una única inyección intravítrea de anticuerpo luego de volver a normoxia en P12. El anti-TNP es un anticuerpo de control

contra trinitrofenol. El anti-Sema3A es un anticuerpo de acuerdo con la invención (clon I). En P17, preparados histológicos de retina se prepararon, se tiñeron con isolectina B4 y se usaron para contar las células líder y determinar el tamaño del área avascular retiniana.

(B) Se muestra la correlación entre la densidad de células líder y área avascular.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0040] Definiciones

[0041] La estructura generalizada de anticuerpos o inmunoglobulina es conocida por las personas del oficio de nivel medio, estas moléculas son glucoproteínas heterotetraméricas, en general de alrededor de 150.000 daltones, compuestas por dos cadenas livianas (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena liviana se liga de manera covalente a una cadena pesada mediante un puente disulfuro para formar un heterodímero, y la molécula heterotrímica se forma mediante un enlace de disulfuro covalente entre las dos cadenas pesadas idénticas de los heterodímeros. Si bien las cadenas livianas y pesadas se ligan mediante un puente disulfuro, la cantidad de enlaces de disulfuro entre las dos cadenas pesadas varía según el isotipo de la inmunoglobulina. Cada cadena pesada y liviana también tiene puentes disulfuro intracatenarios separados regularmente. Cada cadena pesada tiene en el terminal amino un dominio variable (V_H = cadena pesada variable), seguido por 3 o 4 dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4}), así como una región bisagra entre C_{H1} y C_{H2} . Cada cadena liviana tiene 2 dominios, un dominio variable del terminal amino (V_L = variable cadena liviana) y un dominio constante del terminal carboxi (C_L). El dominio V_L se asocia de manera no covalente con el dominio V_H , mientras que el dominio C_L , habitualmente, se liga de manera covalente al dominio C_{H1} mediante un puente disulfuro. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena liviana y la cadena pesada (Chothia et al., 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663.)

[0042] Ciertos dominios en los dominios variables difieren en gran medida entre los diferentes anticuerpos, es decir, son "hipervariables". Estos dominios hipervariables contienen residuos que están directamente involucrados en la fijación y especificidad de cada anticuerpo particular con su determinante antigénico específico. La hipervariabilidad, en los dominios variables de la cadena liviana y de la cadena pesada, se concentra en tres segmentos conocidos como regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o bucles hipervariables (HVL). Las CDR se definen

mediante comparación de secuencias en Kabat et al., 1991, en: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., mientras que los HVL se definen estructuralmente de acuerdo con la estructura tridimensional del dominio variable, como lo describen Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917. Cuando estos dos métodos dan como resultado identificaciones levemente diferentes de una CDR, se prefiere la definición estructural. Como lo define Kabat, CDR-L1 se ubica aproximadamente en los residuos 24-34, CDR-L2 aproximadamente en los residuos 50-56 y CDR-L3 aproximadamente en los residuos 89-97 en el dominio variable de la cadena liviana; CDR-H1 se ubica aproximadamente en los residuos 31-35, CDR-H2 aproximadamente en los residuos 50-65 y CDR-H3 aproximadamente en los residuos 95-102 en el dominio variable de la cadena pesada. Por lo tanto, las CDR1, CDR2, CDR3 de las cadenas pesadas y livianas definen las propiedades únicas y funcionales específicas para un anticuerpo determinado.

[0043] Las tres CDR en cada una de las cadenas pesadas y livianas están separadas por las regiones marco (FR), que contienen secuencias que tienden a ser menos variables. Desde el terminal amino hasta el terminal carboxi de los dominios variables de las cadenas pesada y liviana, las FR y CDR están dispuestas en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La configuración de lámina β de las FR acerca las CDR entre sí dentro de cada una de las cadenas y también las acerca a las CDR de la otra cadena. La conformación resultante contribuye con el sitio de fijación al antígeno (ver Kabat et al., 1991, NIH Publ. N.º 91-3242, vol. I, páginas 647-669), aunque no necesariamente todos los residuos de CDR participan de manera directa en la fijación al antígeno.

[0044] Los residuos de FR y los dominios constantes de Ig no participan directamente en la fijación al antígeno, pero contribuyen a la fijación al antígeno y/o median la función efectora del anticuerpo. Se cree que algunos residuos de FR tienen un efecto significativo en la fijación al antígeno en al menos tres maneras: mediante la fijación no covalente directamente a un epítipo, mediante la interacción con uno o más residuos de CDR, y mediante la afectación de la interfaz entre las cadenas pesadas y livianas. Los dominios constantes no participan directamente en la fijación al antígeno, pero median varias funciones efectoras de la Ig, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP).

[0045] Las cadenas livianas de las inmunoglobulinas de los vertebrados se asignan a una de dos clases que se diferencian claramente, kappa (κ) y lambda (λ), de acuerdo con la secuencia de aminoácidos del dominio constante. En términos comparativos, las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de los mamíferos se asignan a una de cinco clases principales, de acuerdo con la secuencia de los dominios constantes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. A su vez, IgG e IgA se dividen en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂, respectivamente. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Se conocen las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las clases de inmunoglobulinas nativas.

[0046] Las expresiones "anticuerpo", "anticuerpo anti-Sema3A", "anticuerpo anti-Sema3A humanizado" y "variante del anticuerpo anti-Sema3A humanizado" se usan en la presente en el sentido más amplio y abarcan específicamente anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo, tales como dominios variables y otras porciones de anticuerpos que exhiben una actividad biológica deseada, por ejemplo, fijación a Sema3A.

[0047] La expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos; es decir, los anticuerpos individuales en la población son idénticos, excepto por las posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un solo sitio determinante antigénico, un "epítipo". Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica una población sustancialmente homogénea de anticuerpos que se dirigen al epítipo idéntico y no debe interpretarse en el sentido de que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Cabe destacar que los anticuerpos monoclonales se pueden fabricar mediante cualquier técnica o metodología conocidas en el estado de la técnica; que incluye, por ejemplo, el método de hibridoma (Kohler et al., 1975, Nature 256:495) o métodos de ADN recombinante conocidos en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, patente estadounidense N.º 4.816.567), o métodos de aislamiento de anticuerpos monoclonales producidos de manera recombinante usando colecciones de anticuerpos de fago, mediante las técnicas descritas en Clackson et al., 1991, Nature 352: 624-628 y Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597.

[0048] Los anticuerpos quiméricos consisten en las regiones variables de las cadenas

pesadas y livianas de un anticuerpo de una especie (por ejemplo, un mamífero no humano, tal como un ratón), y las regiones constantes de las cadenas pesadas y livianas de un anticuerpo de otra especie (por ejemplo, un ser humano), y se pueden obtener mediante la unión de las secuencias de ADN que codifican las regiones variables del anticuerpo de la primera especie (por ejemplo, un ratón) con las secuencias de ADN de las regiones constantes del anticuerpo de la segunda especie (por ejemplo, un ser humano), y la transformación de un huésped con un vector de expresión que contiene las secuencias unidas para que pueda producir un anticuerpo quimérico. De manera alternativa, el anticuerpo quimérico también podría ser aquel en donde una o más regiones o dominios de la cadena pesada y/o cadena liviana son idénticas, homólogas o una variante de la secuencia correspondiente en un anticuerpo monoclonal de otra clase o isotipo de inmunoglobulina, o de una secuencia de consenso o línea germinal. Los anticuerpos quiméricos pueden incluir fragmentos de esos anticuerpos, siempre que el fragmento de anticuerpo exhiba la actividad biológica deseada de su anticuerpo de origen, por ejemplo, la fijación al mismo epítipo (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 4.816.567; y Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855).

[0049] Las expresiones "fragmento de anticuerpo", "fragmento de fijación al antígeno", "fragmento de anticuerpo anti-Sema3A", "fragmento de anticuerpo anti-Sema3A humanizado", "variante del fragmento de anticuerpo anti-Sema3A humanizado" se refieren a una porción de un anticuerpo anti-Sema3A de longitud completa, en donde se retiene una región variable o una capacidad funcional, por ejemplo, la fijación a un epítipo de Sema3A específica. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv y scFv-Fc, un diacuerpo, un anticuerpo lineal, un anticuerpo monocatenario, un minicuerpo, un diacuerpo formado de fragmentos de anticuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

[0050] Los anticuerpos de longitud completa se pueden tratar con enzimas, tales como papaína o pepsina, para generar fragmentos de anticuerpos útiles. La digestión de papaína se usa para producir dos fragmentos de anticuerpos de fijación al antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de fijación al antígeno y un fragmento "Fc" residual. El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena liviana y el dominio C_{H1} de la cadena pesada. El tratamiento de pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de fijación al antígeno e incluso es capaz de generar reticulación con el antígeno.

[0051] Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la presencia de residuos adicionales que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo en el terminal C del dominio C_{H1} . Los fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ son pares de fragmentos Fab' ligados mediante residuos de cisteína en la región bisagra. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0052] El fragmento "Fv" contiene un sitio de reconocimiento y fijación al antígeno completo que consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y la cadena liviana con una fuerte asociación no covalente. En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de fijación al antígeno en la superficie del dímero V_H - V_L . En conjunto, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de fijación al antígeno.

[0053] Un fragmento de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" es una variante de Fv monocatenario que comprende los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde los dominios están presentes en una sola cadena de polipéptidos. El Fv monocatenario es capaz de reconocer el antígeno y fijarse a este. Opcionalmente, el polipéptido scFv también puede contener un ligador polipeptídico ubicado entre los dominios V_H y V_L , a fin de facilitar la formación de una estructura tridimensional deseada para la fijación al antígeno mediante el scFv (ver, por ejemplo, Pluckthun, 1994, en *The Pharmacology of monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315).

[0054] Otros fragmentos de anticuerpos reconocidos incluyen aquellos que comprenden un par de fragmentos Fd en tándem (V_H - C_{H1} - V_H - C_{H1}) para formar un par de regiones de fijación al antígeno. Estos "anticuerpos lineales" pueden ser biespecíficos o monoespecíficos, como se describe, por ejemplo, en Zapata et al. 1995, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062.

[0055] Un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo humanizado es un tipo específico de anticuerpo quimérico que incluye una variante de la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina, o un fragmento de esta, que es capaz de fijarse a un antígeno predeterminado y que comprende una o más FR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una o más CDR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Esta secuencia de aminoácidos no humana, a menudo denominada secuencia "importada", generalmente se toma de un dominio de anticuerpo "importado", en particular, un dominio variable. En general, un anticuerpo humanizado incluye al menos las CDR o los HVL de un anticuerpo no humano, insertado entre las

FR de un dominio variable de la cadena pesada o liviana humano.

[0056] La presente invención describe anticuerpos anti-Sema3A humanizados específicos que contienen CDR derivadas de un anticuerpo murino o quimérico, insertados entre las FR de dominios variables de la cadena pesada y la cadena liviana de la secuencia de línea germinal humana. Se debe tener en cuenta que ciertos residuos de FR murinos pueden ser importantes para la función de los anticuerpos humanizados y, por ello, algunos de los residuos de los dominios variables de las cadenas pesada y liviana de la secuencia de línea germinal humana se modifican para que sean iguales a los de la secuencia murina correspondiente.

[0057] Como se usa en la presente, las expresiones “anticuerpo de la invención” y el “anticuerpo anti-Sema3A de la invención” se refieren al anticuerpo anti-Sema3A o a un fragmento de fijación al antígeno de este descritos en la presente. Preferentemente, dichas expresiones se refieren a cualquier anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (H-CDR3), y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

[0058] En un aspecto, un anticuerpo anti-Sema3A humanizado comprende sustancialmente todos o al menos uno, y en general dos, dominios variables (tales como, contenidos, por ejemplo, en los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc y Fv), en donde todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y específicamente en la presente, las CDR son secuencias murinas, y las FR son las de una secuencia de línea germinal o de consenso de inmunoglobulina humana. En otro aspecto, un anticuerpo anti-Sema3A humanizado también incluye al menos una porción de una región Fc de inmunoglobulina, en general, de una inmunoglobulina humana. Con frecuencia, el anticuerpo contiene la cadena liviana y al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir una o más de las regiones C_{H1}, bisagra, C_{H2}, C_{H3} y/o C_{H4} de la cadena pesada, según corresponda.

[0059] Un anticuerpo anti-Sema3A humanizado se puede seleccionar de cualquier clase de inmunoglobulinas, que incluyen IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, que incluye gG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Por ejemplo, el dominio constante puede ser un dominio constante de fijación al complemento, en donde se desea que el

anticuerpo humanizado exhiba actividad citotóxica, y el isotipo es generalmente IgG₁. Cuando no se desea esa actividad citotóxica, el dominio constante puede ser de otro isotipo, por ejemplo, IgG₂. Un anticuerpo anti-Sema3A humanizado alternativo puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo de inmunoglobulina, y la selección de dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas se encuentra dentro del alcance de una persona del oficio de nivel medio. En formas de realización específicas, la presente invención proporciona anticuerpos que son anticuerpos IgG1 y, más en particular, anticuerpos IgG1 caracterizados por una función efectora reducida.

[0060] Preferentemente, el anticuerpo anti-Sema3A de la invención es un anticuerpo humanizado formateado como IgG1KO.

[0061] No es necesario que las FR, las CDR o los HVL de un anticuerpo anti-Sema3A humanizado correspondan exactamente con las secuencias parentales. Por ejemplo, uno o más residuos en la secuencia HVL o CDR importada, en la secuencia de consenso o en la secuencia FR de línea germinal se pueden alterar (por ejemplo, mutagenizar) mediante sustitución, inserción o eliminación, de modo que el residuo de aminoácido resultante ya no sea idéntico al residuo original en la posición correspondiente en ninguna de las secuencias parentales, pero que sin embargo el anticuerpo retenga la función de fijación a Sema3A. En general, esta alteración no es extensiva y tiene alteraciones conservadoras. En general, al menos el 75 % de los residuos de anticuerpos humanizados corresponderán a los de las secuencias de consenso parentales o las secuencias FR de línea germinal y CDR importadas, con mayor frecuencia, al menos el 90 % y, con máxima frecuencia, más del 95 %, más del 98 % o más del 99 %.

[0062] Los residuos de inmunoglobulina que afectan la interfaz entre las regiones variables de la cadena pesada y liviana ("la interfaz V_L-V_H") son aquellos que afectan la proximidad u orientación de las dos cadenas entre sí. Determinados residuos que pueden estar involucrados en las interacciones intercatenarias incluyen los residuos V_L 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96, y 98, y los residuos V_H 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100 y 103 (utilizando el sistema de numeración descrito en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)). La patente estadounidense N.º 6.407.213 además explica que los residuos, tales como los residuos V_L 43 y 85, y los residuos V_H 43 y 60, también pueden participar en esta interacción. Si bien estos residuos se indican solo para la IgG humana, también se pueden aplicar a otras especies. Los residuos de anticuerpos

importantes que se prevé razonablemente que estén involucrados en las interacciones intercatenarias se seleccionan para la sustitución en la secuencia de consenso.

[0063] Las expresiones "secuencia de consenso" y "anticuerpo de consenso" se refieren a una secuencia de aminoácidos que comprende el residuo de aminoácido más frecuente en cada lugar en todas las inmunoglobulinas de cualquier clase, isotipo o estructura de subunidad particulares, por ejemplo, un dominio variable de inmunoglobulina humana. La secuencia de consenso se puede basar en inmunoglobulinas de una especie particular o de varias especies. Una secuencia, estructura o anticuerpo de "consenso" abarca una secuencia de consenso humana, como se describe en ciertas formas de realización, y se refiere a una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos de aminoácidos más frecuentes en cada lugar, en todas las inmunoglobulinas humanas de cualquier clase, isotipo o estructura de subunidad particulares. Por ello, la secuencia de consenso contiene una secuencia de aminoácidos que tiene, en cada posición, un aminoácido que está presente en una o más inmunoglobulinas conocidas, pero que puede no duplicar exactamente la secuencia de aminoácidos completa de una inmunoglobulina simple. La secuencia de consenso de la región variable no se obtiene de ningún anticuerpo o inmunoglobulina producida de manera natural. Kabat et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., y sus variantes. Las FR de las secuencias de consenso de las cadenas pesada y liviana, y sus variantes, proporcionan secuencias útiles para la preparación de anticuerpos anti-Sema3A humanizados. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.^{os} 6.037.454 y 6.054.297.

[0064] Las secuencias de línea germinal humanas se encuentran naturalmente en la población humana. La combinación de esos genes de línea germinal genera diversidad de anticuerpos. Las secuencias de anticuerpos de la línea germinal para la cadena liviana del anticuerpo derivan de genes v y j kappa o lambda de la línea germinal humanos conservados. De modo similar, las secuencias de la cadena pesada derivan de genes v, d y j de la línea germinal (LeFranc, M-P y LeFranc, G, "The immunoglobulin Facts Book" Academic Press, 2001).

[0065] Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes del entorno natural del anticuerpo son aquellos materiales que pueden interferir en los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden ser enzimas, hormonas u otros solutos proteicos o no proteicos. En un aspecto, el anticuerpo se purifica hasta

obtener al menos más del 95 % de aislamiento en peso del anticuerpo.

[0066] La expresión "rendimiento del anticuerpo" se refiere a factores/propiedades que contribuyen al reconocimiento del antígeno por parte del anticuerpo o a la eficacia de un anticuerpo *in vivo*. En una forma de realización preferida, se refiere a la capacidad del anticuerpo de prevenir el colapso del citoesqueleto en células retinianas. Los cambios en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden afectar las propiedades del anticuerpo, como el plegamiento, y pueden influir en los factores físicos, como la velocidad inicial de la fijación del anticuerpo al antígeno (k_a), la constante de disociación del anticuerpo del antígeno (k_d), la constante de afinidad del anticuerpo con el antígeno (K_d), la conformación del anticuerpo, la estabilidad de las proteínas y la semivida del anticuerpo.

[0067] Como se usan en la presente, la expresiones "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos o ácidos nucleicos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean para lograr una máxima correspondencia. Para determinar el porcentaje de identidad, las secuencias se alinean para lograr una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para lograr una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos). Luego se comparan los nucleótidos o residuos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos o nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia es ocupada por el mismo nucleótido o residuo de aminoácido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = cant. de posiciones idénticas/cant. total de posiciones (por ejemplo, posiciones superpuestas) x 100). En algunas formas de realización, las dos secuencias que se comparan tienen la misma longitud después de que se introducen los espacios dentro de las secuencias, según corresponda (por ejemplo, excluyendo la secuencia adicional que se extiende más allá de las secuencias que se comparan). Por ejemplo, cuando se comparan secuencias de la región variable, no se consideran las secuencias de dominio constante y/o líder. Para las comparaciones de secuencias entre dos secuencias, una CDR "correspondiente" se refiere a una CDR que tiene la misma ubicación en ambas secuencias (por ejemplo, CDR-H1 de cada secuencia).

[0068] El porcentaje de identidad o el porcentaje de similitud entre dos secuencias se pueden determinar mediante el uso de un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático que se usa para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Este algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST pueden llevarse a cabo con el programa NBLAST, calificación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico que codifica una proteína de interés. Las búsquedas de proteínas con BLAST pueden llevarse a cabo con el programa XBLAST, calificación=50, longitud de palabra=3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una proteína de interés. A fin de obtener alineaciones espaciadas para fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. De manera alternativa, se puede usar PSI-Blast para una búsqueda reiterada que detecta las relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden usar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático que se usa para comparar secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Este algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar las secuencias de aminoácidos, se pueden usar una tabla de residuos ponderados PAM120, una penalidad por longitud de espacio de 12 y una penalidad por espacio de 4. En el estado de la técnica, se conocen algoritmos adicionales para el análisis de secuencia e incluyen ADVANCE y ADAM, como se describe en Torellis y Robotti, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:3-5; y FASTA como se describe en Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-8. En FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y la velocidad de la búsqueda. Si ktup=2, las regiones similares en las dos secuencias que se comparan se encuentran al observar los pares de residuos alineados; si ktup=1, se examinan los aminoácidos alineados únicos. ktup se puede establecer en 2 o 1 para las secuencias de proteínas, o de 1 a 6 para las secuencias de ADN. Si no se especifica ktup, el valor predeterminado es 2 para proteínas y 6 para ADN. De manera alternativa, la alineación de secuencias de proteínas se puede llevar a cabo usando el algoritmo CLUSTAL W, como se describe

en Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402.

[0069] Como se usan en la presente, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas las denominaciones incluyen la progenie de aquellos. Por ello, las expresiones "transformantes" y "células transformantes" incluyen los cultivos y las células sujeto primarias derivados de aquellos sin perjuicio de la cantidad de transferencias.

[0070] El término "mamífero", a los fines de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos los seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológicos, deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas y similares. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

[0071] Como se usa en la presente, una "enfermedad" o "trastorno" es cualquier afección que recibiría un beneficio del tratamiento con un anticuerpo anti-Sema3A humanizado descrito en la presente. Esto incluye enfermedades o trastornos crónicos y agudos, incluidas las afecciones patológicas que predisponen al mamífero a su trastorno en cuestión.

[0072] La expresión "inyección intravítrea" tiene su significado normal en el estado de la técnica y se refiere a la introducción de un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, en el cuerpo vítreo de un paciente.

[0073] La expresión "administración subcutánea" se refiere a la introducción de un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este debajo de la piel de un animal o paciente humano, preferentemente, dentro de un reservorio entre la piel y el tejido subyacente, mediante la administración prolongada y relativamente lenta de un receptáculo de fármaco. El reservorio se puede crear apretando o separando la piel del tejido subyacente.

[0074] La expresión "infusión subcutánea" se refiere a la introducción de un fármaco debajo de la piel de un animal o paciente humano, preferentemente en un reservorio entre la piel y el tejido subyacente, mediante la administración prolongada y relativamente lenta de un receptáculo de fármaco durante un período de, por ejemplo, 30 minutos o menos, o 90 minutos o menos. De manera opcional, la infusión se puede realizar mediante la implantación subcutánea de una bomba de administración de un fármaco implantada debajo de la piel de un animal o paciente humano, en donde la bomba administra una cantidad predeterminada del fármaco durante un período predeterminado, tal como 30 minutos, 90 minutos, o un período que abarca la longitud del régimen de tratamiento.

[0075] La expresión "bolo subcutáneo" se refiere a la administración de un fármaco

debajo de la piel de un animal o paciente humano, en donde la administración del fármaco en bolo tiene una duración menor de aproximadamente 15 minutos, en otro aspecto, menor de 5 minutos, y aun en otro aspecto, menor de 60 segundos. Aun en otro aspecto, la administración se realiza dentro de un reservorio entre la piel y el tejido subyacente, en donde el reservorio se puede crear apretando o separando la piel del tejido subyacente.

[0076] La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este que alivia o mejora uno o más síntomas de los trastornos que se tratan. Al lograr esto, dicha cantidad genera una evolución beneficiosa del paciente. La eficacia se puede medir en formas convencionales, en función de la afección que se tratará. Por ejemplo, en enfermedades o trastornos oculares/retinianos caracterizados por células que expresan Sema3A, la eficacia se puede medir determinando las tasas de respuesta, por ejemplo, la recuperación de la vista, o evaluando el tiempo de atraso hasta la progresión de la enfermedad.

[0077] Los términos "tratamiento", "terapia" y similares, como se usan en la presente, incluyen medidas terapéuticas, profilácticas o supresoras que producen cualquier efecto deseable o beneficioso, incluidos, entre otros, el alivio o la mejora de uno o más síntomas, la regresión, la ralentización o el cese de la progresión de la enfermedad o el trastorno. Por ello, por ejemplo, el término "tratamiento" incluye la administración de un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este antes o después de la aparición de un síntoma de una enfermedad o trastorno, lo que implica la prevención o eliminación de uno o más signos de la enfermedad o el trastorno. Como otro ejemplo, el término incluye la administración de un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad. Además, la administración de un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este después de la aparición y después del desarrollo de síntomas clínicos en donde la administración afecta los parámetros clínicos de la enfermedad o del trastorno, en donde el tratamiento produce la mejora de la enfermedad o no, comprende, como se usan en la presente, el "tratamiento" o la "terapia". Además, en la medida en que las composiciones de la invención, ya sea solas o en combinación con otro agente terapéutico, alivien o mejoren al menos un síntoma de un trastorno que se trata, en comparación con ese síntoma en ausencia del uso de la composición del anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este, el resultado se debe

considerar como un tratamiento eficaz del trastorno subyacente independientemente de si se produce un alivio de todos los síntomas del trastorno, o no.

[0078] El término "prospecto" se refiere a las instrucciones que habitualmente se incluyen en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias de uso de dichos productos terapéuticos.

[0079] Anticuerpo de la invención

[0080] En un primer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este. Preferentemente, dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-Sema3A humanizado, con mayor preferencia, un anticuerpo anti-Sema3A monoclonal humanizado.

[0081] En una caracterización inicial, se generó una colección de anticuerpos que actúan sobre variantes de Sema3A colocando las CDR de anticuerpos murinos en las FR de los dominios variables de las cadenas pesada y liviana de consenso humano y, además, mediante modificación por ingeniería genética de las FR con diferentes alteraciones.

[0082] Esto dio como resultado un anticuerpo humanizado dirigido contra Sema3A con propiedades mejoradas como se divulga en la presente. Las secuencias del anticuerpo de la invención se muestran en la Tabla 1 a continuación.

[0083] Tabla 1:

Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
HCDR1	SYYS	SEQ ID NO: 1
HCDR2	TIKSGGYAY YPDSVKD	SEQ ID NO: 2
HCDR3	GGQGAMDY	SEQ ID NO: 3
LCDR1	RASQSIGDYL H	SEQ ID NO: 4
LCDR2	YASQSI	SEQ ID NO: 5
LCDR3	QQGYSPYT	SEQ ID NO: 6
VH – variante 1	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRGQ QGAMDYWGQG TTVTVSS	SEQ ID NO: 7
VH – variante 2	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFPFS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRGQ QGAMDYWGQG TTVTVSS	SEQ ID NO: 8
VH – variante 3	EVQLVESGGG LVQLGGSLRL SCAASGFTFS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCVKGG QGAMDYWGQG TTVTVSS	SEQ ID NO: 9
VH – variante 4	EVQLVESGGG LLQLGGSLRL SCAASGFTFS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLN LQMNSLRAED	SEQ ID NO: 10

	TAVYYCVKGG QGAMDYWGQG TTVTVSS	
VL – variante a	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIKY ASQSIGIPA RFGSGSGTD FTLTITSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIK	SEQ ID NO: 11
VL – variante b	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIYY ASQSIGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIK	SEQ ID NO: 12
VL- variante c	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIKY ASQSIGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIK	SEQ ID NO: 13
Cadena pesada- Clon I	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRGG QGAMDYWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTWSNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	SEQ ID NO: 14
Cadena liviana- Clon I	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIKY ASQSIGIPA RFGSGSGTD FTLTITSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK	SEQ ID NO: 15
Cadena pesada - Clon II	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFPPS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRGG QGAMDYWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTWSNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	SEQ ID NO: 16
Cadena	EVQLVESGGG LVQLGGSLRL SCAASGFTFS	SEQ ID NO:

pesada- Clon III	SYMSWVRQA PGKGLEWVST IKS GGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCVKGG QGAMDYWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKHTCPCPP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	17
Cadena liviana – Clon III	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLIYY ASQSISGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK	SEQ ID NO: 18
Cadena pesada- Clon IV	EVQLVESGGG LLQLGGSRL SCAASGFTFS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IKS GGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLN LQMNSLRAED TAVYYCVKGG QGAMDYWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKHTCPCPP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	SEQ ID NO: 19
Cadena liviana – Clon IV	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLIKY ASQSISGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK	SEQ ID NO: 20

[0084] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

- una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); y

- una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

[0085] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

- una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y
- una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

[0086] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

- una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y
- una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13;

en donde:

- la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); y
- la región variable de la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

[0087] En aun otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que

comprende:

- una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y
- una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

[0088] En una forma de realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

- una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 11, respectivamente;
- una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 11, respectivamente;
- una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 12, respectivamente; o
- una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 13, respectivamente,

[0089] En aun otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

- una cadena pesada que comprende, preferentemente que consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19; y
- una cadena liviana que comprende, preferentemente que consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20.

[0090] En una forma de realización particular, la invención se refiere a un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este que comprende:

- a. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, en donde dicho anticuerpo se denomina “clon I”;
- b. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

- NO: 16 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, en donde dicho anticuerpo se denomina “clon II”;
- c. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde dicho anticuerpo se denomina “clon III”; o
- d. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, en donde dicho anticuerpo se denomina “clon IV”.

[0091] Los mutantes IgG1-KO se elaboraron introduciendo mutaciones en la región Fc. Las mutaciones para reducir o inhibir la función efectora son conocidas por las personas del oficio de nivel medio y han sido divulgadas en el arte previo, por ejemplo, en Wang et al, Protein Cell 2018, 9(1):63–73 y Stewart et al. Journal for ImmunoTherapy of Cancer 2014, 2:29. En general, una lista no limitativa de mutaciones introducidas en la región Fc de IgG1 para reducir la función efectora del Fc comprende:

- L234A y L235A;
- L234A, L235A y N297Q;
- L234A, L235A y P329G; o
- L234A, L235A y D265A;

en donde los residuos se numeran de acuerdo con el índice EU de Kabat.

[0092] En una forma de realización preferida, el anticuerpo de la invención comprende las dos mutaciones L234A y L235A en la región Fc para reducir la función efectora.

[0093] Las CDR divulgadas en la presente e ilustradas en SEQ ID NO: 1 a 6 se presentan de acuerdo con la numeración de Kabat y se resumen en la Tabla 2 a continuación con la posición de Kabat.

[0094] Tabla 2:

CDR	Secuencia de Kabat	Posición de Kabat	SEQ ID NO:
HCDR1	SYYMS	31-35	1
HCDR2	TIKSGGYAYYPDSVKD	50-66	2
HCDR3	GGQGAMDY	99-106	3
LCDR1	RASQSIGDYLH	24-34	4
LCDR2	YASQSIG	50-56	5
LCDR3	QQGYSFPYT	89-97	6

[0095] El anticuerpo anti-Sema3A de la presente invención se fija con afinidad alta a Sema3A humana. En una forma de realización relacionada con este aspecto, un anticuerpo anti-Sema3A de la presente invención se fija a Sema3A humana a una $K_D <$

50 pM. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-Sema3A de la presente invención se fija a Sema3A humana a una $K_D < 35$ pM, como se ejemplifica en el Ejemplo 4. En una forma de realización preferida, el anticuerpo anti-Sema3A de la presente invención se fija a Sema3A humana a una $K_D < 30$ pM.

[0096] El anticuerpo anti-Sema3A de la invención también se fija a Sema3A de *Macaca fascicularis*, Sema3A de ratón, Sema3A de rata y Sema3A de conejo.

[0097] El anticuerpo anti-Sema3A de la presente invención previene el colapso del citoesqueleto inducido por Sema3A en células retinianas con una potencia funcional de menos de 100 pM, preferentemente menos de 80 pM, con mayor preferencia menos de 70 pM. En una forma de realización preferida, el anticuerpo anti-Sema3A de la presente invención previene el colapso del citoesqueleto inducido por Sema3A en células retinianas con una potencia funcional de 69 pM, como se ejemplifica en el Ejemplo 4.

[0098] En otro aspecto, el anticuerpo anti-Sema3A de la presente invención demostró tener un bajo riesgo de inmunogenicidad como se describe en el Ejemplo 5. Esto depende de una predicción *in silico* de la inmunogenicidad del anticuerpo. En general, el riesgo de inmunogenicidad se evalúa mediante diversos métodos conocidos tales como mediante algoritmos informáticos para predecir epítomos de linfocitos T, un factor principal que influye en la inmunogenicidad.

[0099] De hecho, se ha informado que secuencias que contenían epítomos de linfocitos T presentes en proteínas de interés podían predecirse mediante el uso de un algoritmo en función de a enfoque de matriz computacional, disponible con el nombre EpiMatrix (producido por EpiVax). Las personas del oficio de nivel medio pueden consultar Van Walle et al., Expert Opin Biol Ther. marzo de 2007; 7(3): 405-18 y Jawa y al., Clin Immunol. diciembre de 2013;149(3):534-55.

[00100] Los inventores demostraron que el anticuerpo de la invención muestra más propiedades ventajosas que otros anticuerpos o fragmentos que actúan sobre Sema3A mencionados en el arte previo y descritos en la presente.

[00101] Los inventores compararon la afinidad de fijación de un anticuerpo dirigido a Sema3A divulgado en WO2014123186 (Chiome Bioscience) con la afinidad del anticuerpo de la presente invención. Los anticuerpos de WO2014123186 se divulgaron para el uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. El presente Ejemplo 8 muestra que el anticuerpo de la invención demostró tener afinidades de fijación más altas para Sema3A humana que el anticuerpo del arte previo divulgado en Chiome Bioscience.

[00102] Los inventores también compararon las propiedades del anticuerpo de acuerdo con la presente invención con los fragmentos ScFv como se divulgan en WO2017074013 (Samsung). Estos fragmentos se divulgan para el uso en tratamiento de diversos tipos de cáncer. El presente Ejemplo 9 muestra que el anticuerpo de la invención demostró tener afinidades de fijación más altas para Sema3A humana que fragmentos del anticuerpo del arte previo divulgados en WO2017074013.

[00103] Una afinidad de fijación más alta prolonga el tiempo de neutralización de Sema3A luego de la inyección intravítrea del anticuerpo y permite una frecuencia de inyección reducida. Una afinidad de fijación más alta también permite la administración de una dosis más baja, lo que limita los potenciales efectos secundarios. El anticuerpo de la invención, por ende, proporciona ventajas técnicas en relación con los anticuerpos del arte previo. La afinidad de fijación mejorada y la frecuencia de inyección reducida considerablemente mejoran la eficacia del tratamiento de pacientes que lo necesitan. También proporciona beneficios valiosos para el paciente, en especial un cumplimiento mejorado del tratamiento con la droga.

[00104] Los inventores también compararon la potencia funcional del anticuerpo de la invención con un anticuerpo disponible en el comercio que actúan sobre Sema3A como se describe en el presente Ejemplo 11. Los inventores demostraron que, en las mismas condiciones, el anticuerpo de la invención previene el colapso del citoesqueleto inducido por Sema3A en células retinianas (Ejemplo 3), mientras que el anticuerpo disponible en el comercio no (Ejemplo 11).

[00105] Humanización y variantes de secuencias de aminoácidos

[00106] Otras variantes de anticuerpos anti-Sema3A y fragmentos de anticuerpo se pueden modificar por ingeniería genética en función del conjunto de CDR identificadas en las secuencias ilustradas en SEQ ID NO: 1 a 6. Se entiende que, en dichas variantes de anticuerpos anti-Sema3A y fragmentos de anticuerpo, la secuencia de aminoácidos de las CDR se mantiene inalterada pero las regiones circundantes, por ejemplo, las regiones FR, se pueden modificar por ingeniería genética. Las variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-Sema3A se pueden preparar incorporando cambios de nucleótidos adecuados en el ADN del anticuerpo anti-Sema3A o mediante síntesis de péptidos. Tales variantes incluyen, por ejemplo, eliminaciones y/o sustituciones de residuos, y/o inserciones en estos en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-Sema3A de los ejemplos de la presente. Cualquier combinación de eliminaciones, inserciones y sustituciones se lleva a cabo para obtener el constructo final, siempre que el constructo final posea las

características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos posteriores a la traducción del anticuerpo anti-Sema3A humanizado o de su variante, tal como el cambio de la cantidad o de la posición de los sitios de glucosilación.

[00107] Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo implica alterar el patrón de glucosilación original del anticuerpo. El término "alterar" en este contexto significa eliminar una o más porciones de carbohidratos que se encuentran en el anticuerpo, y/o agregar uno o más sitios de glucosilación que no estaban presentes previamente en el anticuerpo.

[00108] En algunos aspectos, la presente invención incluye moléculas de ácidos nucleicos que codifican las variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-Sema3A descritos en la presente. Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-Sema3A se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en el estado de la técnica. Estos métodos incluyen, entre otros, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis PCR y mutagénesis con casete de una variante preparada con anterioridad o una versión sin variante del anticuerpo anti-Sema3A.

[00109] En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-Sema3A es un fragmento de anticuerpo. Existen técnicas que se desarrollaron para la producción de fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos se pueden derivar mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto et al., 1992, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; y Brennan et al., 1985, Science 229:81). De manera alternativa, los fragmentos se pueden producir directamente en células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de E. coli y acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (ver, por ejemplo, Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-167). Mediante otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para las personas del oficio de nivel medio.

[00110] Los anticuerpos anti-Sema3A, y fragmentos de fijación al antígeno de estos, pueden incluir modificaciones.

[00111] En determinadas formas de realización, puede resultar conveniente usar un fragmento de anticuerpo anti-Sema3A, en lugar de un anticuerpo intacto. Puede ser

conveniente modificar el fragmento del anticuerpo a fin de aumentar su semivida sérica. Esto se puede obtener, por ejemplo, incorporando un epítipo de fijación al receptor de rescate en el fragmento del anticuerpo. En un método, la región adecuada del fragmento del anticuerpo se puede alterar (por ejemplo, mutar), o el epítipo se puede incorporar en una etiqueta del péptido que luego se fusiona al fragmento del anticuerpo en cualquier extremo o en el medio, por ejemplo, mediante síntesis de ADN o péptido. Ver, por ejemplo, WO 96/32478.

[00112] En otras formas de realización, la presente invención incluye modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-Sema3A. Las modificaciones covalentes incluyen la modificación de residuos de cisteinilo, residuos de histidilo, residuos de lisinilo y terminal amino, residuos de arginilo, residuos de tirosilo, grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo), residuos de glutaminilo y asparaginilo, o serilo, o residuos de treonilo. Otro tipo de modificación covalente incluye el acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al anticuerpo. Tales modificaciones se pueden obtener mediante síntesis química, o escisión enzimática o química del anticuerpo, si correspondiese. Otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se pueden incorporar en la molécula haciendo reaccionar residuos de aminoácidos dirigidos del anticuerpo con un agente de derivatización orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos del terminal amino o carboxi.

[00113] La eliminación de cualquier porción de carbohidrato presente en el anticuerpo se puede lograr en forma química o enzimática. La desglucosilación química es descrita por Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y Edge et al., 1981, Anal. Biochem., 118:131. La escisión enzimática de las porciones de carbohidratos en los anticuerpos se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo- y exo-glucosidasas, como describen Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol 138:350.

[00114] Otro tipo de modificación covalente útil comprende la ligadura del anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, en la forma establecida en una o más de las patentes estadounidenses N.º 4.640.835, patente estadounidense N.º 4.496.689, patente estadounidense N.º 4.301.144, patente estadounidense N.º 4.670.417, patente estadounidense N.º 4.791.192 y la patente estadounidense N.º 4.179.337.

[00115] Fijación al epítipo

[00116] En un **segundo aspecto**, la invención se refiere a un anticuerpo que reconoce un "epítipo del antígeno de Sema3A" y "epítipo de Sema3A" específicos.

En particular, el anticuerpo de la invención se fija a un epítipo de la Sema3A humana con SEQ ID NO: 22.

[00117] En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a al menos un residuo de aminoácidos dentro de las regiones de aminoácidos 370-382 de Sema3A humana como se indican en SEQ ID NO: 22.

[00118] En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a SEQ ID NO: 21.

[00119] Las secuencias SEQ ID NO: 21 y 22 se ilustran en la Tabla 5 a continuación.

[00120] Tabla 5

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
epítipo de Sema3A	DSTKDLPDDV ITF	21
Sema3A humana	NYQNGKNNVPRLKLSYKEMLESNNVITFNGLANSSSY HTFLLDEERSRLYVGAKDHIFSFDLVNIKDFQKIVWPVS YTRRDECKWAGKDILKECANFIKVLKAYNQTHLYACGT GAFHPICTYIEIGHHPEDNIFKLENSHFENGRGKSPYDP KLLTASLLIDGELYSGTAADFMRDFAIFRTLGHHPHPIR TEQHDSRWLNDPKFISAHLISESDNPEDDKVYFFREN AIDGEHSGKATHARIGQICKNDFGGHRSVLNKTTFLLK ARLICSVPGPNGIDTHFDELQDVFLMNFKDPKNPVVYG VFTTSSNIFKGSVCMYSMSDVRRVFLGPYAHRDGPN YQWVPYQGRVPYPRPGTCPSKTFGGFDSTKDLPDDVI TFARSHPAMYNPVFPMNNRPIVIKTDVNYQFTQIVVDR VDAEDGQYDVMFIGTDVGTVLKVVSIKETWYDLEEV LEEMTVFREPTAISAMELSTKQQQLYIGSTAGVAQLPL HRCDIYGKACAECCLARDPYCAWDGSACSRYFPTAK RRTRRQDIRNGDPLTHCSDLHHDNHHGHSPEERIIYG VENSSTFLECSPKSQRALVYWQFQRRNEERKEEIRVD DHIIRTDQGLLLRSLQKQKDSGNYLCHAVEHGFIQTLLKV TLEVIDTEHLEELLHKDDGDGSGSKTKEMSNSMTPSQK VWYRDFMQLINHPNLNTMDEFCEQVWKRDRKQRRQ RPGHTPGNSNKWKHLQENKKGRNRRTHEFERAPRSV	22

[00121] Como se usan en la presente, las expresiones “epítipo del antígeno de Sema3A” y “epítipo de Sema3A” se refieren a una molécula (por ejemplo, un péptido) o un fragmento de una molécula capaz de fijarse a un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este. Estas expresiones también incluyen, por ejemplo, un determinante antigénico de Sema3A reconocido por cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la presente invención, que tiene una combinación de CDR de cadena liviana y pesada seleccionada de CDR de cadena pesada de SEQ ID NO 1 a 3 y CDR de cadena liviana de SEQ ID NO: 4 a 6.

[00122] Los epítopos del antígeno de Sema3A se pueden incluir en proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos o similares. En general, los epítopos son proteínas, oligopéptidos cortos, imitadores de oligopéptidos (es decir, compuestos orgánicos que imitan las propiedades de fijación al anticuerpo del antígeno Sema3A) o combinaciones de estos.

[00123] Se descubrió que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la presente invención se fijan a un único epítipo de la Sema3A humana. Preferentemente, un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a al menos un residuo de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 370-382 del dominio extracelular de Sema3A humana con SEQ ID NO: 22. Este epítipo se ubica cerca de la interfase de Sema3A y un receptor plexina A. La fijación del anticuerpo a este epítipo inhibe la formación del complejo holoreceptor de señalización del Sema3A ligando, el receptor plexina A y el correceptor Nrp1, lo que genera la interferencia con los efectos biológicos de tal señalización.

[00124] En el contexto de la fijación al epítipo, la expresión “se fija en las regiones de aminoácidos X-Y...” significa que el anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a al menos un residuo de aminoácidos, preferentemente a todos ellos, en la región de aminoácidos especificada en la secuencia.

[00125] En otro aspecto, un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este se fija a al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEQ ID NO: 22. Preferentemente, un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este se fija a SEQ ID NO: 22.

[00126] Usos terapéuticos

[00127] En un tercer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este para el uso como un medicamento.

[00128] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno para inhibir el efecto represor de vasos de SemaA, y/o para mejorar la revascularización de la retina.

[00129] Preferentemente, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad retiniana u ocular. De hecho, los inventores desarrollaron un anticuerpo que actúa sobre Sema3A, que es extremadamente útil para:

- redirigir la angiogénesis hacia las regiones isquémicas, con el fin de mejorar la revascularización de la retina;
- prevenir la neovascularización patológica de la región del cuerpo vítreo; y
- prevenir la degradación de la barrera hematorretiniana.

[00130] Como se mencionó anteriormente, Sema3A es un indicio de repulsión de vasos secretado por células ganglionares retinianas hipóxicas. Mediante la fijación a neuropilina-1, activa la señalización intracelular de receptores plexina en células endoteliales, lo que da como resultado el desarmado de las fibras de actina. Este genera un colapso del citoesqueleto en los filópodos de las células líder, células endoteliales especializadas que se dirigen al crecimiento de nuevos vasos y previenen la regeneración vascular de áreas isquémicas en la retina. Los inventores demostraron que la modulación de la acción de repulsión de vasos con un anticuerpo neutralizante de Sema3A aumentará la cantidad de células líder y redirigirá la angiogénesis hacia regiones isquémicas, tales como la zona avascular foveal agrandada patológicamente en seres humanos con isquemia macular diabética.

[00131] Por lo tanto, en un cuarto aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este para el uso en el tratamiento o prevención de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en retinopatía, retinopatía isquémica, retinopatía diabética que incluye retinopatía diabética proliferativa y retinopatía diabética no proliferativa, edema macular diabético, isquemia macular diabética, degeneración macular relacionada con la edad, retinitis pigmentosa, distrofia retiniana hereditaria, degeneración miópica, oclusiones arteriales de la retina, endoftalmitis, uveítis, edema macular cistoide, membrana neovascular coroidea secundaria a cualquier enfermedad retiniana, neuropatías ópticas, glaucoma, desprendimiento de retina, retinopatía tóxica, retinopatía por radiaciones, retinopatía traumática, vasculopatía retiniana inducida por fármacos, neovascularización retiniana, vasculopatía coroidea polipoidea, vasculitis retiniana, microaneurisma retiniano, distrofia de Fuch, telangiectasia macular, síndrome de Usher y enfermedad de Stargardt.

[00132] El anticuerpo anti-Sema3A de la invención es en particularmente útil para tratar o prevenir retinopatía diabética que incluye retinopatía diabética proliferativa y retinopatía diabética no proliferativa, retinopatía isquémica, edema macular diabético, isquemia macular diabética, edema macular relacionado con la edad, neovascularización retiniana y neovascularización coroidea.

[00133] En una forma de realización preferida, dicha enfermedad es isquemia macular

diabética y el anticuerpo de la invención promueve la regeneración vascular dentro de la retina isquémica (revascularización) y previene la neovascularización patológica de la región del cuerpo vítreo del ojo.

[00134] En otra forma de realización preferida, dicha enfermedad es edema macular diabético y el anticuerpo de la invención disminuye la permeabilidad de la barrera hematorretiniana.

[00135] En otra forma de realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este para inhibir la permeabilidad inducida por Sema3A de la barrera hematorretiniana y/o regresión de los vasos inducida por Sema3A de áreas isquémicas.

[00136] En un aspecto preferido, el anticuerpo de la invención es útil para el tratamiento del edema macular diabético (DME) y/o isquemia macular diabética (DMI). En una forma de realización preferida, el anticuerpo de la invención es útil para tratar un paciente que tiene DME y DMI. Preferentemente, el anticuerpo de la invención se usa para tratar DMI como se define mediante un agrandamiento de la zona avascular foveal (FAZ) en un 15 %, 20 %, 25 %, y con mayor preferencia 30 %.

[00137] En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-3A, o fragmento de fijación al antígeno de este, y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[00138] El anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se administra por cualquier medio adecuado, que incluye por vía intravítrea, oral, parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Asimismo, el anticuerpo anti-Sema3A se administra de manera adecuada mediante infusión por impulso, en particular con dosis decrecientes del anticuerpo. En un aspecto, las dosis se administran mediante inyecciones, con máxima preferencia, mediante inyecciones intravenosas o subcutáneas, lo cual depende, en parte, de si la administración es breve o crónica. Preferentemente, el anticuerpo anti-Sema3A se administra mediante una inyección intravítrea en el ojo.

[00139] Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de anticuerpo dependerá de varios factores, tales como el tipo de enfermedad que se debe tratar, como se definió anteriormente, la gravedad y el transcurso de la enfermedad, si la administración del anticuerpo es con fines preventivos o terapéuticos, el tratamiento previo, los antecedentes patológicos del paciente, la respuesta al anticuerpo y el criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra de

manera adecuada al paciente de una sola vez o en una serie de tratamientos.

[00140] En una forma de realización preferida, el rango de dosis de los anticuerpos de la invención que se puede aplicar por inyección es en general de 1 mg/ojo a 10 mg/ojo, preferentemente entre 1,5 mg/ojo y 5 mg/ojo, con mayor preferencia entre 2 mg/ojo y 3 mg/ojo y aun con mayor preferencia alrededor de 2,5 mg/ojo.

[00141] En la presente, el término “supresión” se usa en el mismo contexto que “mejora” y “alivio”, y significa una atenuación o disminución de una o más características de la enfermedad.

[00142] La composición de anticuerpos se formulará, dosificará y administrará de manera que respete las buenas prácticas médicas. Algunos factores que se consideran en este contexto son el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo que se debe administrar dependerá de tales consideraciones y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar las enfermedades oculares o retinianas abordadas por el anticuerpo de la invención.

[00143] No es necesario que el anticuerpo se formule con uno o más agentes que se usan actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión, pero opcionalmente puede formularse de esa manera. La cantidad eficaz de esos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo anti-Sema3A presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. En general, estos se usan en las mismas dosis y con las vías de administración que se usaron anteriormente en la presente o de alrededor de 1 a 99 % de las dosis empleadas hasta ahora.

[00144] En otro aspecto, la invención también se refiere a un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno para el uso para el tratamiento o la prevención de enfermedades no oftalmológicas, tales como artritis autoinmunitaria, dolor neuropático, osteoporosis, y cáncer.

[00145] Método de tratamiento

[00146] En otro aspecto, la invención también abarca cualquier método para tratar o prevenir una enfermedad ocular en un paciente que lo necesita, en donde dicho método comprende la administración de un anticuerpo anti-Sema3A de la invención.

[00147] Preferentemente, la invención se refiere a un método de uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para inhibir el efecto represor de vasos de SemaA3. Con

mayor preferencia, la invención se refiere a dicho método para mejorar la revascularización de la retina.

[00148] Preferentemente, la invención se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad ocular o retiniana que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz desde el punto de vista farmacéutico del anticuerpo de acuerdo con la invención. Preferentemente, dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en retinopatía, retinopatía isquémica, retinopatía diabética que incluye retinopatía diabética proliferativa y retinopatía diabética no proliferativa, edema macular diabético, isquemia macular diabética, degeneración macular relacionada con la edad, retinitis pigmentosa, distrofia retiniana hereditaria, degeneración miópica, oclusiones arteriales de la retina, endoftalmitis, uveítis, edema macular cistoide, membrana neovascular coroidea secundaria a cualquier enfermedad retiniana, neuropatías ópticas, glaucoma, desprendimiento de retina, retinopatía tóxica, retinopatía por radiaciones, retinopatía traumática, vasculopatía retiniana inducida por fármacos, neovascularización retiniana, vasculopatía coroidea polipoidea, vasculitis retiniana, microaneurisma retiniano, distrofia de Fuch, telangiectasia macular, síndrome de Usher y enfermedad de Stargardt. Con mayor preferencia, dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en retinopatía diabética que incluye retinopatía diabética proliferativa y retinopatía diabética no proliferativa, retinopatía isquémica, edema macular diabético, isquemia macular diabética, edema macular relacionado con la edad, neovascularización retiniana, glaucoma y neovascularización coroidea. En otra forma de realización preferida, dicha enfermedad es edema macular diabético y/o isquemia macular diabética.

[00149] Todas las características técnicas divulgadas que se describen en la presente se pueden aplicar a dicho método de tratamiento.

[00150] Composiciones farmacéuticas y su administración

[00151] Una composición que comprende un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se puede administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad ocular o retiniana. La invención también proporciona el uso de un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad ocular o retiniana o enfermedad de Sema3A. Todas las características técnicas divulgadas que se describen en la presente se pueden aplicar a dicho uso de un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este en la elaboración de un medicamento. Como se usa en la presente, el término "sujeto"

significa cualquier paciente mamífero al que se puede administrar un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este, lo que incluye, por ejemplo, seres humanos y mamíferos no humanos, tales como primates, roedores y perros. Los sujetos a los que se pretende tratar específicamente usando los métodos descritos en la presente incluyen los seres humanos. El anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se puede administrar solo o en combinación con otras composiciones.

[00152] Se conocen distintos sistemas de administración que se pueden usar para administrar el anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este. Los métodos de introducción incluyen, entre otros, gotas para los ojos, la vía intravítrea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. El anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se puede administrar, por ejemplo, mediante infusión, bolo o inyección, y se puede administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. En formas de administración preferidas, la administración es mediante inyección intravítrea. Las formulaciones para tales inyecciones se pueden preparar, por ejemplo, en jeringas previamente llenadas.

[00153] Un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se puede administrar como composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento de fijación al antígeno de este, y uno o más ingredientes farmacéuticamente compatibles.

[00154] En formas de realización típicas, la composición farmacéutica se formula de acuerdo con procedimientos de rutina, como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa o subcutánea a seres humanos. Generalmente, las composiciones para la administración mediante inyección son soluciones en amortiguador acuoso isotónico estéril. En los casos en que sea necesario, la composición farmacéutica también puede incluir un agente solubilizante y anestesia local, tal como lignocaína, para aliviar el dolor en el lugar de la inyección. En general, los ingredientes se suministran en forma separada o combinados en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o un sachet que indican la cantidad de agente activo. Cuando la composición farmacéutica se administra mediante infusión, se puede suministrar con una botella de infusión que contiene solución salina o agua estéril de grado farmacéutico. Cuando la composición farmacéutica se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de

agua estéril para inyectar o solución salina para que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

[00155] Además, la composición farmacéutica se puede proveer como un kit farmacéutico que comprende (a) un recipiente que contiene un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este en forma liofilizada y (b) un segundo recipiente que contiene un diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico (por ejemplo, agua estéril) para inyectar. El diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico se puede usar para la reconstitución o la disolución del anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este liofilizados. Opcionalmente asociado al recipiente, puede haber un aviso prescrito por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, en donde el aviso contiene la aprobación de la agencia de fabricar, usar o vender para la administración en seres humanos.

[00156] La cantidad de anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este que es eficaz en el tratamiento o la prevención de una enfermedad ocular o retiniana se puede determinar mediante técnicas clínicas estándares. Asimismo, se pueden usar opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los rangos de dosis óptimos. La dosis precisa que se puede usar en la formulación también dependerá de la vía de administración y del estadio del trastorno, y debería decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar de las curvas de respuesta a la dosis, derivadas de sistemas de prueba en modelos de animales o *in vitro*.

[00157] Por ejemplo, la eficacia terapéutica y de toxicidad del anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este se pueden determinar en cultivos celulares o animales experimentales mediante procedimientos farmacéuticos estándar para determinar la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en 50 % de la población). Se prefiere un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este que presenta un índice terapéutico alto.

[00158] Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un rango de dosis para uso en seres humanos. La dosis del anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este yace normalmente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango en función de la forma de dosis empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este usado

en el método, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para alcanzar un rango de concentración en plasma circulante que incluye la IC_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza la inhibición media máxima de síntomas) como se determina en el cultivo celular. Esta información se puede usar para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos. Se pueden medir los niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento, ELISA y similares.

[00159] Para la inyección intravítrea del anticuerpo anti-Sema3A generalmente se prefieren intervalos más prolongados entre tratamientos. Debido a su afinidad de fijación y potencia mejoradas, los anticuerpos anti-Sema3A de la presente invención se pueden administrar en intervalos más prolongados.

[00160] En una forma de realización, el anticuerpo anti-Sema3A se administra cada 6 semanas, preferentemente, cada 7 semanas, preferentemente, cada 8 semanas, preferentemente, cada 9 semanas, preferentemente, cada 10 semanas, preferentemente, cada 11 semanas y, con mayor preferencia, cada 12 semanas. En una forma de realización de aun mayor preferencia, el anticuerpo anti-Sema3A de la invención se administra una vez cada 3 meses.

[00161] Debido a que el volumen que se puede administrar en el ojo es estrictamente limitado, es muy importante poder formular un anticuerpo anti-Sema3A en concentraciones altas. Asimismo, la potencia del anticuerpo anti-Sema3A es de gran importancia, ya que un anticuerpo potente puede ejercer su efecto incluso en las dosis más bajas y, en consecuencia, prolongar la actividad y los intervalos entre tratamientos.

[00162] Los anticuerpos de la presente invención se pueden formular en dosis muy altas que incluyen, entre otras, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml o 100 mg/ml. Preferentemente, los anticuerpos de la presente invención se pueden formular en una formulación líquida de alrededor de 50 mg/ml.

[00163] Una dosis habitual que se puede administrar a un paciente es alrededor de 2,5 mg/ojo. Los componentes amortiguadores habituales que se pueden usar para tal formulación comprenden, por ejemplo, acetato de sodio, PS20 y dihidrato de trehalosa.

[00164] En una forma de realización, el anticuerpo anti-Sema3A está formulado con 10 mM de amortiguador de histidina, 240 mM de sacarosa, 0,02 p/v % de polisorbato 20 a pH 5,5 con una concentración de proteína final de 60 mg/ml.

[00165] En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este pueden comprender también un agente terapéutico, conjugado o no conjugado con el agente de fijación.

[00166] Con respecto a los regímenes terapéuticos para la administración combinada, en una forma de realización específica, un anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este se administran de manera concurrente con un agente terapéutico. En otra forma de realización específica, el agente terapéutico se administra al menos 1 hora y hasta varios meses antes o después de la administración del anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este, por ejemplo, al menos 1 hora, 5 horas, 12 horas, 1 día, 1 semana, 1 mes o 3 meses antes o después de la administración del anticuerpo anti-Sema3A o un fragmento de fijación al antígeno de este.

[00167] Polinucleótidos, vectores, células huésped y métodos recombinantes

[00168] En un sexto aspecto, la presente invención abarca polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia que codifica un anticuerpo anti-Sema3A, vectores y células huésped que comprenden los polinucleótidos y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo. Los polinucleótidos aislados pueden codificar cualquier forma deseada del anticuerpo anti-Sema3A que incluye, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarias y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

[00169] Los polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica un anticuerpo anti-Sema3A, o un fragmento o cadena de este se pueden fusionar con una o más secuencias reguladoras o de control, como se conocen en el estado de la técnica, y se pueden contener en vectores de expresión o células huésped adecuados, como se conoce en el estado de la técnica. Cada una de las moléculas de polinucleótidos que codifican los dominios variables de las cadenas pesada y liviana se pueden fusionar independientemente con una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio constante, tal como un dominio constante humano, lo que permite la producción de anticuerpos intactos. De manera alternativa, los polinucleótidos, o las porciones de estos, se pueden fusionar juntos, lo que permite proporcionar un modelo para la producción de anticuerpos monocatenarios.

[00170] Para la producción recombinante, un polinucleótido que codifica el anticuerpo se inserta en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la

expresión. Se encuentran disponibles diversos vectores adecuados para expresar el anticuerpo recombinante. Los componentes del vector, en general, incluyen, entre otros, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento mejorador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

[00171] Los anticuerpos anti-Sema3A también se pueden producir como polipéptidos de fusión, en donde el anticuerpo se fusiona con un polipéptido heterólogo, tal como una secuencia de señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el terminal amino del polipéptido o de la proteína madura. La secuencia de señal heteróloga seleccionada es, en general, una reconocida y procesada (es decir, escindida mediante una peptidasa de señal) mediante la célula huésped. En el caso de las células huésped procariotas que no reconocen ni procesan la secuencia de señal del anticuerpo anti-Sema3A, la secuencia de señal se puede sustituir mediante una secuencia de señal procariótica. La secuencia de señal puede ser, por ejemplo, fosfatasa alcalina, penicilinas, lipoproteína, líderes de enterotoxina termoestable II, y similares. En el caso de secreción de levadura, la secuencia de señal natural se puede sustituir, por ejemplo, con una secuencia líder obtenida del factor alfa invertasa de levadura (que incluye líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), fosfatasa ácida, glucoamilasa de *C. albicans* o la señal descrita en WO90/13646. En células de mamífero, se pueden usar las secuencias de señales de mamíferos, así como líderes secretorios virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN para dicha región precursora está ligado en el marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo anti-Sema3A humanizado.

[00172] Los vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. En general, en vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Estas secuencias son conocidas para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2- μ es adecuado para la levadura, y varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV y BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos. En general, el origen del componente de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamíferos (el origen de SV40 puede usarse, en general, solo porque contiene el promotor temprano).

[00173] Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen que codifica un marcador seleccionable para facilitar la identificación de la expresión. Los genes marcadores seleccionables habituales codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, o de manera alternativa, son deficiencias auxotróficas del complemento, o en otras alternativas, suministran nutrientes específicos que no están presentes en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

[00174] Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que se transforman exitosamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y, por ende, sobrevive al régimen de selección. Los ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina. Los marcadores seleccionables comunes de células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para absorber un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-Sema3A humanizado, tal como DHFR (dihidrofolato reductasa), timidina quinasa, metalotioneína-I y -II (tales como genes de metalotioneína de primates), adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa y similares. Las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican, primero, mediante el cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped adecuada cuando se usa DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) con deficiencia de actividad DHFR (por ejemplo, DG44).

[00175] De manera alternativa, las células huésped (en particular, los huéspedes de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo anti-Sema3A, la proteína DHFR de tipo silvestre y otro marcador seleccionable, tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH), se pueden seleccionar mediante el crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección del marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 4.965.199.

[00176] Cuando la producción recombinante se realiza en una célula de levadura como célula huésped, el gen TRP1 presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb et al., 1979, Nature 282: 39) se puede usar como un marcador seleccionable. El gen TRP1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que no tiene la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo,

ATCC N.º 44076 o PEP4-1 (Jones, 1977, Genetics 85:12). La presencia de una lesión *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona un entorno eficaz para detectar la transformación mediante el crecimiento en ausencia del triptófano. En forma similar, las cepas de levadura con deficiencia de *Leu2p*, tales como ATCC 20.622 y 38.626 se complementan mediante plásmidos conocidos que tienen el gen *LEU2*.

[00177] Además, los vectores derivados del plásmido circular de 1,6 μ m pKD1 se pueden usar para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. De manera alternativa, un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante se informó en *K. lactis* (Van den Berg, 1990, Bio/Technology 8:135). También se describieron vectores de expresión estables de copias múltiples para la secreción de albúmina de suero recombinante madura humana mediante cepas industriales de *Kluyveromyces* (Fleer et al., 1991, Bio/Technology 9:968-975).

[00178] Los vectores de expresión y clonación, por lo general, contienen un promotor que se reconoce por el organismo huésped, y está ligado operativamente a la molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-Sema3A o cadena de polipéptidos de aquel. Los promotores adecuados para usar con huéspedes procarióticos incluyen el promotor *phoA*, los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, el sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor *tac*. Otros promotores bacterianos conocidos también son adecuados. Los promotores para usar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) ligada operativamente al ADN que codifica el anticuerpo anti-Sema3A humanizado.

[00179] Se conocen muchas secuencias del promotor eucariótico. Prácticamente, todos los genes eucarióticos tienen una región rica en AT ubicada aproximadamente de 25 a 30 bases corriente arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases corriente arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos, se encuentra una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas aquellas secuencias se insertan de manera adecuada en los vectores de expresión eucarióticos.

[00180] Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para usar con huéspedes de la levadura incluyen los promotores de 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa,

hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

[00181] Los promotores inducibles tienen la ventaja adicional de transcripción controlada mediante condiciones de crecimiento. Estos incluyen regiones promotoras de levadura para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas derivadas asociadas al metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para usar en la expresión de levadura también se describen en EP 73.657. Los mejoradores de levadura también se usan en forma conveniente con promotores de levadura.

[00182] La transcripción del anticuerpo anti-Sema3A de vectores en células huésped de mamíferos se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus de polioma, virus de difteria aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus del simio 40 (SV40), de promotores mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina o de promotores de choque término, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de célula huésped.

[00183] Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos usando el virus del papiloma bovino como vector se divulga en la patente estadounidense N.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente estadounidense N.º 4.601.978. Ver también Reyes et al., 1982, Nature 297:598-601, que describe la expresión de cADN de interferón γ humano en las células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. De manera alternativa, se puede usar la repetición del terminal largo del virus del sarcoma de Rous como promotor.

[00184] Otro elemento útil que se puede usar en un vector de expresión recombinante es una secuencia potenciadora, que se usa para aumentar la transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo anti-Sema3A mediante eucariotas superiores. En la actualidad, se conocen varias secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Sin embargo, en

general, se usa un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 en el último sitio del origen de replicación (bp 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el último sitio del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, 1982, Nature 297:17-18 para obtener una descripción de elementos potenciadores para la activación de promotores eucarióticos. El potenciador se puede escindir en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia que codifica el anticuerpo anti-Sema3A, pero preferentemente se ubica en el sitio 5' del promotor.

[00185] Los vectores de expresión que se usan en las células huésped eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del mRNA. En general, estas secuencias se encuentran disponibles en las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente, 3' de ADN o cADN eucarióticos o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del mRNA que codifica el anticuerpo anti-Sema3A. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase WO94/11026 y el vector de expresión allí divulgado. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-Sema3A se pueden expresar usando el sistema CHEF. (Véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 5.888.809, cuya descripción se incorpora por referencia en la presente.)

[00186] Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente son las células procarióticas, de levadura o eucarióticas superiores descritas anteriormente. Los procariotes adecuados para ello incluyen eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae*, tal como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella*, así como bacilos, tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41 P divulgado en DD 266.710 que se publicó el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque también son adecuadas otras cepas, tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos y no limitativos.

[00187] Además de los procariotes, los microbios eucarióticos, tales como hongos

filamentosos o levadura, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican el anticuerpo anti-Sema3A. *Saccharomyces cerevisiae*, comúnmente conocido como levadura de panadería, es el más habitual entre los microorganismos huésped eucarióticos inferiores. Sin embargo, hay varios géneros, especies y cepas diferentes generalmente disponibles y útiles en la presente, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces*, tales como *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos, tales como *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y huéspedes de *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

[00188] Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-Sema3A glucosilado derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos, que incluyen, por ejemplo, numerosas cepas y variantes baculovirales, y las correspondientes células huésped permisivas de insectos huéspedes, tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori* (gusano de la seda). En el comercio se encuentran varias cepas virales para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV; se pueden usar esos virus, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

[00189] Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, papa, soja, petunia, tomate y tabaco también se pueden usar como huéspedes.

[00190] El anticuerpo anti-Sema3A de la invención también se puede incorporar en vectores virales, es decir, el polinucleótido que codifica el anticuerpo anti-Sema3A o el fragmento de fijación al antígeno de este se introduce en el vector viral y luego se expresa en el cuerpo del paciente después de la infección por el virus.

[00191] En otro aspecto, la expresión del anticuerpo anti-Sema3A se realiza en las células de vertebrados. La propagación de las células de vertebrados en el cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento de rutina, y las técnicas se usan ampliamente. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para la

proliferación en cultivo de suspensión (Graham et al., 1977, J. Gen Virol. 36: 59), células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10), células de ovarios de hámster chino/-DHFR1 (CHO, Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216; por ejemplo, DG44), células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251), células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70), células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2), células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442), células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75), células de hígado humano (Hep G2, HB 8065), tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51), células TR1 (Mather et al., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68), células MRC 5, células FS4 y línea de hepatoma humano (Hep G2).

[00192] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación antes descritos para la producción de anticuerpos anti-Sema3A y se cultivan en un medio de nutrientes convencional modificado convenientemente para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes que codifican las secuencias deseadas.

[00193] Las células huésped que se usan para producir un anticuerpo anti-Sema3A descrito en la presente se pueden cultivar en varios medios. Los medios disponibles en el comercio, tales como Ham's F10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.) y medio Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma-Aldrich Co.) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, se puede usar cualquiera de los medios descritos en uno o más de Ham et al., 1979, Meth. Enz. 58: 44, Barnes et al., 1980, Anal. Biochem. 102: 255, patente estadounidense N.º 4.767.704, patente estadounidense N.º 4.657.866, patente estadounidense N.º 4.927.762, patente estadounidense N.º 4.560.655, patente estadounidense N.º 5.122.469, WO 90/103430 y WO 87/00195, como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar, según sea necesario, con hormonas y/u otros factores del crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), amortiguadores (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como gentamicina), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos que están presentes, en general, en concentraciones finales en el rango micromolar), glucosa o una fuente de energía equivalente. También se pueden incluir

otros complementos en concentraciones adecuadas conocidos por las personas del oficio de nivel medio. Las condiciones del cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las que se usaron previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para la persona del oficio de nivel medio.

[00194] Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir de manera intracelular, en el espacio periplásmico, o se puede segregar directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce de manera intracelular, las células se pueden alterar para liberar proteína como primera etapa. Los residuos de partículas, ya sea células huésped o fragmentos lisados, se pueden retirar, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167 describen un proceso para aislar anticuerpos que son segregados al espacio periplásmico de *E. coli*. En síntesis, la pasta celular es descongelada en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF) durante alrededor de 30 minutos. Los restos celulares se pueden retirar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo es segregado en el medio, los sobrenadantes de esos sistemas de expresión en general primero se concentran usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el comercio, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa, tal como PMSF, se puede incluir en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis, y se pueden incluir antibióticos para evitar el desarrollo de contaminantes no previstos. Se pueden usar varios métodos para aislar el anticuerpo de la célula huésped.

[00195] La composición de anticuerpos preparada de las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía por afinidad; la cromatografía por afinidad es una técnica de purificación típica. La conveniencia de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas gamma1, gamma2 o gamma4 humanas (ver, por ejemplo, Lindmark et al., 1983 *J. Immunol. Meth.* 62:1-13). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para gamma3 humana (ver, por ejemplo, Guss et al., 1986 *EMBO J.* 5:1567-1575). Una matriz a la que se une un ligando de afinidad es, con frecuencia, agarosa, pero también hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tales como el vidrio poroso controlado o poli(estirendivinil)benceno permiten tasas de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3}, la resina

Bakerbond ABX™™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. También hay otras técnicas disponibles para la purificación de las proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina-SEPHAROSE™™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como columna de ácido poliaspártico), cromatografía de afinidad, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio, según el anticuerpo que se desee recuperar.

[00196] Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un amortiguador de elución a un pH de alrededor de 2,5 a 4,5, lo cual se realiza, en general, con bajas concentraciones de sal (por ejemplo, sal a alrededor de 0-0,25 M).

[00197] También se incluyen ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de rigurosidad baja, moderada y alta, como se define en la presente, con la totalidad o con una porción (por ejemplo, la porción que codifica la región variable) de la secuencia de nucleótidos representada por secuencias de polinucleótidos aisladas que codifican un anticuerpo Sema3A o un fragmento de anticuerpo. La porción de hibridación del ácido nucleico que se hibrida tiene, en general, una longitud de al menos 15 (por ejemplo, 20, 25, 30 o 50) nucleótidos. La porción de hibridación del ácido nucleico que se hibrida es al menos 80 %, por ejemplo, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idéntica a la secuencia de una porción o la totalidad de un ácido nucleico que codifica un polipéptido anti-Sema3A (por ejemplo, una región variable de la cadena pesada o cadena liviana) o su complemento. Los ácidos nucleicos de hibridación del tipo que se describe en la presente se pueden usar, por ejemplo, como sonda de clonación, cebador, por ejemplo cebador de PCR, o sonda de diagnóstico.

[00198] En una forma de realización, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO: 19 o una región variable de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y una secuencia que codifica una cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20 o una región variable de la cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

[00199] Se entiende que en los anticuerpos anti-Sema3A o fragmentos de anticuerpo

la secuencia de ácidos nucleicos que codifica las CDR se mantiene inalterada (con respecto al aminoácido que codifican, son posibles los equivalentes de la secuencia de ADN debido a la degeneración de codones) pero las regiones circundantes, por ejemplo, las regiones FR, se pueden modificar por ingeniería genética.

[00200] Artículos de fabricación

[00201] En otro aspecto, se incluye un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril. Por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón que se puede perforar con una aguja de inyección hipodérmica. El agente activo en la composición es el anticuerpo anti-Sema3A o el fragmento de fijación al antígeno de este. La etiqueta que se encuentra sobre el recipiente o que está asociada a este indica que la composición se usa para tratar la afección determinada. El artículo de fabricación también puede comprender un segundo recipiente que comprende un amortiguador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, tal como una solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluye otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

[00202] La invención también se describe en los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la invención.

EJEMPLOS

[00203] Ejemplo 1: Regulación ascendente de Sema3A en el cuerpo vítreo de pacientes con DME y PDR

[00204] La expresión de Sema3A en las muestras de retina de donantes humanos con antecedentes de retinopatía diabética se investigó mediante inmunohistoquímica. El protocolo de inmunotinción fue de la siguiente manera:

1. Descongelar portaobjetos y dejar las muestras secarse al aire durante 30 min a temperatura ambiente (RT);
2. Dibujar caja con lapicera PAP y dejar secar;
3. Recuperar antígeno en 1 % de SDS durante 5 min a RT;
4. Lavar 3 veces los portaobjetos en PBS durante 5 min;

5. Bloquear secciones en una solución de 1 % de BSA/0,3 % de Triton X100/PBS (solución de bloqueo) durante 30 min a RT;
6. Diluir el primer anticuerpo anti-Sema3a de conejo (abcam, ab23393) 1:200 en una solución de bloqueo. Incubar las secciones en un portaobjetos a RT durante la noche;
7. Enjuagar 3 veces los portaobjetos en PBS durante 5 min;
8. Incubar el segundo anticuerpo con Alexa fluor546 (invitrogen, A10040) de anti-conejo en asno a una dilución de 1:400 en una solución de DAPI/0,3 % de Triton X100/ PBS. Incubar las secciones en el portaobjetos durante 3 horas a RT;
9. Enjuagar 3-5 veces los portaobjetos en PBS durante 5 min;
10. Colocar un cubreobjetos en las secciones con Aquamount y dejar secar al aire;
11. Capturar imágenes de las secciones y clasificar la intensidad con una magnificación de 40x.

[00205] Se llevó a cabo inmunotinción para Sema3A en conjuntos de tres secciones por cada donante humano. El etiquetado de Sema3A se evaluó independientemente en cada una de esas regiones por observadores previamente capacitados para esta tarea específica mediante el uso de un esquema de clasificación de 5 puntos (0=sin detección, 1=intensidad baja, pocos puntos, 2=intensidad moderada, muchos puntos, 3=intensidad brillante, tinción extendida y 4=intensidad muy brillante, detección abundante). Los observadores no tenían conocimiento del estado de salud de los donantes oculares. Dentro de la retina, Sema3A se asoció a la pared de la vasculatura de vasos sanguíneos retinianos. La expresión de Sema3A en la vasculatura retiniana y parénquima retiniano se aumentó en pacientes con edema macular diabético en comparación con diabéticos sin patologías oculares (**Figura 1**).

[00206] Ejemplo 2: Eficacia en el ensayo de permeabilidad celular

[00207] La permeabilidad transcelular se midió mediante la penetración de FITC-dextrano en monocapas de células endoteliales microvasculares retinianas humanas (HRMEC).

[00208] En síntesis, la permeabilidad endotelial *in vitro* se midió mediante el uso de un kit Millipore ('In Vitro Vascular Permeability Assay' N.º de catálogo ECM642) y células endoteliales microvasculares retinianas humanas (HRMEC). El kit de ensayo proporciona una placa receptora de 96 cavidades con insertos de cultivos celulares. Los insertos contienen poros de 1 µm y se recubren con colágeno de cola de rata tipo

I. HRMEC se sembraron a una densidad de 25.000 células/cavidad en los insertos y se permitió que las células crecieran en una monocapa durante 3 días. Las células se trataron con VEGF-A recombinante, Sema3A así como un anticuerpo de acuerdo con la invención durante la noche. Una solución de FITC-dextrano de alto peso molecular proporcionada dentro del kit se agregó al inserto, lo que permitió que las moléculas fluorescentes pasaran a través de la monocapa de células endoteliales. La permeabilidad *in vitro* se determinó mediante la medición de la fluorescencia de la solución de la cavidad de placa receptora a 485 nm / 535 nM (excitación y absorción).

[00209] Los inventores probaron un anticuerpo de ejemplo de acuerdo con la invención: clon I. Dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

[00210] El anticuerpo anti-Sema3A de acuerdo con la invención inhibió completamente la permeabilidad inducida por Sema3A, pero no la permeabilidad inducida por VEGF-A (**Figura 2**). Cabe destacar que el efecto de permeabilidad de Sema3A es independiente de VEGF-A. El uso de un anticuerpo de control dirigido contra TNP confirma que el efecto se debe a la diana específica de Sema3A mediante el anticuerpo de la invención.

[00211] Ejemplo 3: Medición del colapso del citoesqueleto en ensayo celular

[00212] La actividad celular de un anticuerpo de ejemplo de acuerdo con la invención (clon I) se evaluó mediante una medición del colapso del citoesqueleto en células endoteliales microvasculares retinianas humanas (HRMEC) usando el sistema XCELLigence (Real Time Cell Analysis Instruments como es comercializado por ACEA Biosciences). El sistema mide la unión celular y confluencia mediante impedancia celular. HRMEC expresa de manera endógena neuropilina-1 (Nrp1) y plexinas, que son componentes del holoreceptor de semaforina de clase-3. Mediante la unión con este complejo receptor, las semaforinas inducen un colapso de fibras de F-actina en el endotelio. En este ensayo funcional, la adición de proteína Sema3A recombinante a una capa confluyente de células endoteliales microvasculares retinianas humanas disminuye la impedancia celular debido al colapso del citoesqueleto y posterior achicamiento de las células, medido como una reducción en la impedancia celular.

[00213] En síntesis, E-Plates View se recubrieron con Attachment Factor. Las células se sembraron con una densidad de 20.000 células/cavidad y se permitió que crecieran en una monocapa en sus condiciones de crecimiento normales dentro del dispositivo XCELLigence durante la noche.

[00214] Se agregaron combinaciones de Sema3A (u otra semaforina de clase-3) con y sin el anticuerpo anti-Sema3A de acuerdo con la invención en presencia de 3 mM de CaCl_2 . El índice celular se normalizó en el punto temporal antes de la adición de sustancias. Se hicieron cálculos 5 h después de la estimulación.

[00215] El colapso del citoesqueleto inducido por Sema3A se puede prevenir completamente mediante el anticuerpo anti-Sema3A de acuerdo con la invención. Un colapso del citoesqueleto inducido mediante las otras semaforinas evaluadas (B, C, E y F) no se pudo prevenir mediante el anticuerpo anti-Sema3A de acuerdo con la invención, lo que confirmó su especificidad del anticuerpo de la invención a Sema3A (Figura 3).

[00216] Ejemplo 4: Afinidad y potencia celular

[00217] A) Afinidad

[00218] El amortiguador de corrida para este experimento y todas las diluciones (excepto cuando se comenzó) se realizaron en PBS-T-EDTA con 0,01 % de Tween20 [se agregaron 100 μl de Tween 20 al 100 % a 2l de PBS-T-EDTA para realizar la concentración de Tween 20 final de 0,01 %]. El chip sensor de GLM se normalizó y se preestableció conforme a las recomendaciones del fabricante. El chip sensor se activó con una mezcla equitativa de EDC/s-NHS en dirección horizontal durante 300 segundos a una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ y se inmovilizó con un aglutinante de Fab humano (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en 10 mM de acetato, pH 5,0) en dirección horizontal durante 300 segundos a una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$, lo que produjo ~ 6739-7414 RU del aglutinante de Fab humano en la superficie. El chip sensor se desactivó con etanolamina HCl 1 M en dirección horizontal durante 300 s a una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. El chip sensor se estabilizó con 18 s de 10 mM de glicina, pH 2,1, a una velocidad de flujo de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 1 vez horizontalmente y 1 vez verticalmente.

[00219] Los inventores probaron un anticuerpo de ejemplo de acuerdo con la invención (clon I). Dicho anticuerpo (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se capturó en la superficie del aglutinante de Fab humano verticalmente durante 300 s a una velocidad de flujo de 25 $\mu\text{l}/\text{min}$, que dio como resultado un nivel de captura de ~180 RU. El valor inicial se estabilizó mediante inyección de PBS-T-EDTA durante 60 s a una velocidad de flujo de 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ horizontalmente. El analito se inyectó horizontalmente en el anticuerpo capturado durante 600 s a una velocidad de flujo de 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ y una disociación durante 7200 s. La concentración de los analitos era 0 nM, 0,625 nM, 1,25 nM, 2,5 nM, 5 nM y 10 nM. La superficie se regeneró mediante la inyección de 10 mM de glicina,

pH 2,1, durante 18 s a una velocidad de flujo de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ una vez horizontalmente y una vez verticalmente. Se inyectó PBS-T-EDTA durante 60 s a una velocidad de flujo de 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ una vez verticalmente.

El área de interacción (interacciones con la superficie del sensor) y el blanco (PBS-T-EDTA con 0,01 % de Tween20 o 0 nM de analito) se sustrajeron de los datos sin procesar. Luego, los sensogramas se ajustaron de manera global a fijación de Langmuir 1:1 para proporcionar valores de asociación (k_a), disociación (k_d) y afinidad (K_D).

[00220] B) Potencia celular

[00221] Para determinar una potencia funcional en el ensayo de colapso del citoesqueleto, las curvas de concentración-respuesta de Sema3A se combinaron con concentraciones en aumento de anticuerpo como experimentos de desplazamiento de IC50. Un gráfico de Gaddum Schild se realizó para calcular el valor pA2 (el logaritmo negativo de la concentración de anticuerpo necesaria para desplazar la curva de concentración-respuesta de Sema3A en un factor 2). La potencia en pM se calculó del valor pA2 como $=\text{POTENCY}(10; -X)$.

[00222] Los resultados se resumen en la Tabla 6 a continuación.

[00223] Tabla 6:

Molécula	Afinidad (K_d) [pM]					Antagonismo funcional en ensayo de colapso del citoesqueleto (A_2) [pM]
	<i>Humano</i>	<i>Macaca fascicularis</i>	<i>Ratón</i>	<i>Rata</i>	<i>Conejo</i>	<i>Humano</i>
Anticuerpo de la invención (clon I)	29	28	27	27	42	69

[00224] Ejemplo 5: Evaluación de la inmunogenicidad del anticuerpo de la invención

[00225] Los inventores probaron la inmunogenicidad prevista de un anticuerpo de ejemplo de acuerdo con la invención, clon I. Dicho anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15, respectivamente.

[00226] Para este fin, usaron una herramienta *in silico* para predecir epítomos de linfocitos T (EpiMatrix desarrollada por EpiVax).

[00227] Mediante el cribado de las secuencias de muchos aislados de anticuerpos humanos, EpiVax identificó varios ligandos de HLA altamente conservados que se cree que tienen un potencial regulador. La evidencia experimental sugiere que muchos de estos péptidos son, de hecho, tolerogénicos activamente en la mayoría de los sujetos. Estos epítomos de linfocitos T altamente conservados, reguladores y promiscuos se denominan Tregítomos (De Groot et al. Blood. 15 de octubre de 2008;112(8):3303-11). El potencial de inmunogenicidad de neoepítomos contenidos en los anticuerpos humanizados se puede controlar eficazmente en presencia de una cantidad significativa de Tregítomos.

[00228] A los fines del análisis de inmunogenicidad del anticuerpo, EpiVax desarrolló un puntaje EpiMatrix ajustado a Tregítomos y predicción correspondiente de respuesta de anticuerpo antiterapéutica. Para calcular el puntaje EpiMatrix ajustado a Tregítomos, los puntajes de los Tregítomos se deducen del puntaje de proteínas EpiMatrix. Se mostró que los puntajes EpiMatrix ajustados a Tregítomos se correlacionaron bien con la respuesta inmunitaria clínica observada para un conjunto de 23 anticuerpos comerciales (De Groot et al. Clin Immunol. mayo de 2009;131(2):189-201).

[00229] Los resultados en la escala EpiMatrix se resumen en la Tabla 7 a continuación.

[00230] Tabla 7:

Molécula	Cadena pesada (% humano)		Epivax (VH)	Epivax (Vκ)	Cadena liviana (% humano)	
	FR	Gen V			FR	Gen V
Anticuerpo de la invención (clon I)	97	91	-27,27	-21,79	98	88

[00231] Las secuencias del anticuerpo de la invención tienen puntajes bajos en la escala EpiMatrix, lo que indica que el anticuerpo de la invención tiene un potencial altamente limitado para inmunogenicidad. Dicha escala EpiMatrix es conocida por las personas del oficio de nivel medio y se puede encontrar, entre otras, en la Figura 2 de la publicación Mufarrege et al. Clin Immunol. marzo de 2017;176:31-41.

[00232] Ejemplo 6: Eficacia en la densidad de células líder y área avascular *in vivo* (modelo de retinopatía inducida por oxígeno OIR)

[00233] El efecto de un anticuerpo de ejemplo de acuerdo con la invención (clon I) sobre la revascularización del área avascular isquémica se investigó en un modelo de ratón de retinopatía inducida por oxígeno (OIR). Camadas de ratones C57Bl/6J se

expusieron a una atmósfera de 75 % de oxígeno del día 7 posterior al nacimiento al día 12 posterior al nacimiento. Esto produce una regresión de los vasos sanguíneos en la retina central y la formación de un área avascular. Luego de regresar a condiciones normóxicas, esta área se torna isquémica. Las crías reciben una única inyección intravítrea de 10 µg de anticuerpo en 0,5 µl de solución en cada ojo bajo anestesia con isoflurano el día 12 posterior al nacimiento. El día 17 posterior al nacimiento, se sacrificaron los animales y se extirparon los ojos. Los ojos se fijaron en formalina y se preparó un preparado histológico de retina en el que los vasos sanguíneos de la retina se tiñeron con isolectina B4. Se contó la cantidad de células líder (células endoteliales especializadas que inician la formación de nuevos vasos) en el frente avascular en toda la retina (el límite entre el área periférica vascularizada y el área central avascular de la retina).

[00234] Las células líder se identificaron por su morfología especial que muestra extensiones de filopodios. Para análisis, se normalizó la cantidad de células líder a la longitud del frente avascular. El tamaño del área avascular se determinó usando un microscopio confocal y software de análisis de imágenes.

[00235] El anticuerpo anti-Sema3A de la invención aumenta la densidad de células líder en el modelo de OIR de ratón (**Figura 4**). Además, este muestra una reducción del área avascular. Existe una correlación negativa entre la densidad de las células líder y el tamaño del área avascular, lo cual indica una dependencia mecánica de los dos parámetros. El uso de un anticuerpo de control dirigido contra TNP confirma que el efecto se debe a la diana específica de Sema3A mediante el anticuerpo de la invención.

[00236] El general, el anticuerpo anti-Sema3A de la invención disminuye el tamaño de área avascular isquémica en un modelo animal de retinopatía inducida por oxígeno, lo cual indica un efecto beneficio en el tratamiento de la isquemia macular diabética.

[00237] **Ejemplo 7: Comparación de anti-Sema3A y Avastin $t_{1/2}$ en ojo de conejo**

[00238] Los resultados se resumen en la Tabla 8 a continuación.

[00239] **Tabla 8:**

	$t_{1/2}$ calculada (día)		
	<i>Anticuerpo de la invención (clon I)</i>		<i>Avastin</i>
	<i>0-14 días</i>	<i>todos</i>	
Cuerpo vítreo	5,1	3,9	4,4
Retina	6,1	4,1	4,8
Acuoso	4,7	3,3	4,5

[00240] Las semividas calculadas eran 3,9, 4,1 y 3,3 días en cuerpo vítreo, humor

acuoso y retina, respectivamente. Estas semividas son similares a aquellas informadas en la literatura para el anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado recombinante Avastin (anti-VEGF, bevacizumab, Bakri et al., Ophthalmology, 2007) utilizado clínicamente, lo cual también se confirmó mediante experimentos por los inventores. Estos resultados fueron los esperados, ya que la depuración intravítrea de las IgG de longitud completa depende principalmente de su tamaño molecular, que es similar para el anticuerpo de la invención y Avastin. Por lo tanto, se espera que la PK humana, que incluye la semivida ocular del anticuerpo de la invención y Avastin, sea similar. La semivida ocular humana informada de Avastin es de $9,73 \pm 1,48$ días (Hutton-Smith, 2016).

[00241] Ejemplo 8: Comparación de afinidad de fijación entre el anticuerpo de la invención y anticuerpo de Chiome

[00242] Para fines comparativos, los inventores desarrollaron el anticuerpo humanizado dirigido contra Sema3A divulgado en WO2014123186 (Chiome Bioscience) con las siguientes características:

- la cadena pesada es como se muestra en SEQ ID NO: 11 en WO2014123186, y
- La cadena liviana es como se muestra en SEQ ID NO: 12 en WO2014123186.

Los inventores desarrollaron 2 formas de este anticuerpo:

- uno formateado en Fc de IgG1KO, en adelante denominado “anticuerpo de Chiome A” y
- uno formateado en IgG1KO-FcRn nulo, en adelante denominado, “anticuerpo de Chiome B”.

[00243] Se inmovilizó una densidad superficial alta de anticuerpo anti-Fab humano (GE Healthcare) en un chip de GLM (BioRad) a través de acoplamiento de amina directo en 6 canales horizontales de acuerdo con el manual del fabricante de BioRad.

[00244] El anticuerpo de la invención (clon I) y los anticuerpos de Chiome se capturaron en la superficie del anticuerpo anti-Fab humano en 5 de 6 canales verticales con una densidad superficial mínima para el ensayo de fijación cinético. Sema3A humana se preparó en amortiguador PBS-T-EDTA (BioRad) a concentraciones de 100, 50, 25, 12,5, 10, 6,25, 5, 2,5, 1,25, 0,625 y 0 nM. Se usó una inyección de amortiguador PBS-T-EDTA como doble referencia para el análisis de los datos cinéticos. Cada una de las soluciones de Sema3A humana y amortiguador PBS-T-EDTA se inyectaron de manera simultánea en los 6 canales horizontales durante 10 min a una velocidad de flujo de 40 μ l/min, y luego 2 h de fase de disociación. Las superficies se regeneraron mediante una inyección de 18 s de 10 mM, pH 2,1, de HCl

de glicina (GE Healthcare) a una velocidad de flujo de 100 µl/min, y luego una inyección de 60 s de PBS-T-EDTA a una velocidad de flujo de 25 µl/min. Los sensogramas de fijación se adaptaron al modelo 1:1 Langmuir para calcular los valores de asociación, disociación, y afinidad.

[00245] Los datos cinéticos y de afinidad del anticuerpo de la invención y de los anticuerpos de Chiome que se fija a Sema3A humana se detallan en la Tabla 9 a continuación.

[00246] Tabla 9:

Nombre de muestra	KD a Sema3A humana
Anticuerpo de Chiome A	56,4 nM
Anticuerpo de Chiome B	55,9 nM
Anticuerpo de la invención (clon I)	32,0 pM

[00247] Conclusión

Los resultados muestran que el anticuerpo de la invención demostró tener mayor afinidad de fijación a Sema3A humana que los anticuerpos del arte previo divulgados en WO2014123186 (Chiome Bioscience).

[00248] Ejemplo 9: Comparación de afinidad de fijación entre el anticuerpo de la invención y scFv de Samsung

[00249] Se compararon los fragmentos scFv divulgados en WO2017074013 (Samsung).

[00250] Con fines de comparación, los inventores desarrollaron 3 fragmentos scFv divulgados ("Samsung scFv") con las características divulgadas en la Tabla 10 a continuación.

[00251] Tabla 10:

Nombre del anticuerpo	Secuencias	SEQ ID NO como se indica en WO2017074013
scFv de Samsung 1	Cadena pesada	19
	Cadena liviana	20
scFv de Samsung 2	Cadena pesada	21
	Cadena liviana	22
scFv de Samsung 3	Cadena pesada	23
	Cadena liviana	24

[00252] Se inmovilizó una densidad superficial alta de anticuerpo anti-His humano (GE Healthcare) en un chip de GLM (BioRad) a través de acoplamiento de amina directo en 6 canales horizontales de acuerdo con el manual del fabricante de BioRad. Los anticuerpos scFv de Samsung se capturaron en la superficie del anticuerpo anti-

His humano en 5 de 6 canales verticales con una densidad superficial mínima para el ensayo de fijación cinético. Sema3A humana se preparó en amortiguador PBS-T-EDTA (BioRad) a concentraciones de 100, 50, 25, 12,5, 10, 6,25, 5, 2,5, 1,25, 0,625 y 0 nM. Se usó una inyección de amortiguador PBS-T-EDTA como doble referencia para el análisis de los datos cinéticos. Cada una de las soluciones de Sema3A humana y amortiguador PBS-T-EDTA se inyectaron de manera simultánea en los 6 canales horizontales durante 10 min a una velocidad de flujo de 40 $\mu\text{l}/\text{min}$, y luego 1 h de fase de disociación. Las superficies se regeneraron mediante una inyección de 18 s de 10 mM, pH 2,1, de HCl de glicina (GE Healthcare) a una velocidad de flujo de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, y luego una inyección de 60 s de PBS-T-EDTA a una velocidad de flujo de 25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Los sensogramas de fijación se adaptaron al modelo 1:1 Langmuir para calcular los valores de asociación, disociación, y afinidad.

[00253] La fijación para el anticuerpo de la invención a Sema3A humana (clon I) se llevó a cabo usando un método similar pero se usó anti-IgG humana de cabra (Invitrogen) para capturar el anticuerpo de la invención. La fijación del anticuerpo de la invención y ScFv de Samsung a Sema3A de *Macaca fascicularis*, ratón, rata, o conejo también se llevó a cabo usando los mismos métodos.

[00254] Los datos cinéticos y de afinidad del anticuerpo de la invención y de ScFv de Samsung se detallan en la Tabla 11 a continuación.

[00255] Tabla 11:

Nombre del anticuerpo	K_D a Sema3A humana (pM)	K_D a Sema3A de <i>Macaca fascicularis</i> (pM)	K_D a Sema3A de ratón (pM)	K_D a Sema3A de rata (pM)	K_D a Sema3A de conejo (pM)
scFv de Samsung 1	359	89,0	105	< 20	112
scFv de Samsung 2	359	118	117	< 20	122
scFv de Samsung 3	296	68,0	88,8	< 20	59,5
Anticuerpo de la invención (clon I)	34,7	35,0	35,0	23,5	40,1

[00256] Conclusión

[00257] El anticuerpo de la invención tiene mayor afinidad de fijación a Sema3A humana, de *Macaca Fascicularis*, de ratón, o de conejo que el scFv de Samsung 3 divulgado en WO2017074013.

[00258] Ejemplo 10: Comparación de afinidad de dos anticuerpos de acuerdo con la invención

[00259] Los inventores desarrollaron dos anticuerpos que tienen las CDR como se indican en SEQ ID NO: 1 a 6. Los dos anticuerpos varían en la región Fc en que:

- un anticuerpo comprende la combinación L234A y L235A (anticuerpo A), y
- el otro anticuerpo comprende la mutación H435A (anticuerpo B),

los residuos se numeran de acuerdo con el índice EU de Kabat.

[00260] No se mostró ninguna diferencia estadística en la afinidad de fijación a Sema3A humana de ambos anticuerpos que tienen las CDR como se indican en SEQ ID NO: 1 a 6. Por lo tanto, la afinidad a Sema3A humana se mantiene en los anticuerpos dirigidos contra Sema3A de acuerdo con la invención.

[00261] Ejemplo 11: Potencia de un anticuerpo disponible en el comercio dirigido contra Sema3A

[00262] A fines de comparación, los inventores evaluaron la actividad celular de un anticuerpo disponible en el comercio que actúa sobre Sema3A. Dicho anticuerpo se comercializa a través de Creative Biolabs con la referencia “*Anticuerpo terapéutico Anti-SEMA3A humana, humanizado (CAT#: TAB-556CL)*”. Dicho anticuerpo disponible en el comercio en adelante se denomina “anticuerpo de Creative Biolabs”.

[00263] La actividad celular del anticuerpo de Creative Biolabs se evaluó mediante una medida de colapso del citoesqueleto en células endoteliales microvasculares retinianas humanas (HRMEC) con el mismo protocolo divulgado en el Ejemplo 3. Los cálculos y la determinación de potencia se realizaron 5 h después de la estimulación.

[00264] En estas condiciones, el anticuerpo de Creative Biolabs no mostró actividad alguna en el colapso del citoesqueleto inducido por Sema3A. El colapso del citoesqueleto inducido por Sema3A no se pudo prevenir mediante el anticuerpo de Creative Biolabs.

[00265] Por lo tanto, el anticuerpo de Creative Biolabs demostró que no previno el colapso del citoesqueleto inducido por Sema3A en las células retinianas mientras que, en las mismas condiciones, el anticuerpo de la invención sí lo hizo. Esto confirma el efecto sorprendente e inesperado del anticuerpo de la invención.