ANTICUERPOS ANTI-C3 Y FRAGMENTOS DE UNIÓN AL ANTÍGENO DE ESTOS Y SUS USOS PARA TRATAR ENFERMEDADES OFTÁLMICAS U OCULARES

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[001] La presente invención se refiere en general a anticuerpos y fragmentos de estos que se dirigen al complemento C3. Más específicamente, se divulgan anticuerpos anti-C3 y fragmentos de unión al antígeno de estos y métodos de uso para el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos. También se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo anti-C3.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[002] La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) generalmente se divide en dos clases principales, AMD seca y AMD húmeda. La AMD seca, también conocida como AMD no exudativa, se caracteriza por la presencia de drusas (depósitos amarillos) en la región macular. La AMD húmeda, también conocida como AMD exudativa o AMD neovascular, se caracteriza por el crecimiento de vasos sanguíneos anormales de la coroides debajo de la mácula. Este proceso también se denomina neovascularización coroidea y los nuevos vasos sanguíneos pueden filtrar líquido, tal como sangre, hacia dentro de la retina y alrededor de esta.

[003] La atrofia geográfica (GA), también conocida como AMD atrófica o AMD seca avanzada, es una forma avanzada de AMD caracterizada por la pérdida del epitelio pigmentario de la retina (RPE) y los fotorreceptores en la mácula. La pérdida irreversible de la agudeza visual se produce una vez que la GA involucra la fóvea central. Los pacientes con etapas más tempranas de GA por lo general experimentan déficits en la función visual incluso antes de que se vea afectada la agudeza visual.

[004] La fisiopatología subyacente de la atrofia geográfica no se comprende por completo; sin embargo, se cree que la desregulación de la actividad del complemento es un factor contribuyente. Varios productos de activación del complemento, incluso C3a, C5a, C5b-9 y el factor H del complemento (CFH), mostraron niveles elevados en muestras vítreas, la membrana de Bruch y otras partes de la coroides de pacientes con GA en comparación con los controles. Además, los inhibidores del complemento como CD59 (un inhibidor unido a la membrana de la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC)) y la proteína cofactor de membrana (MCP) (un regulador del complemento unido a la membrana que tiene actividad de cofactor para el factor I del complemento (CFI)) se informaron en niveles reducidos en GA.

[005] Un desafío importante en el tratamiento de la GA es que la desregulación observada de la actividad del complemento se produce en las capas más profundas de la retina. En la actualidad, no existen tratamientos adecuados para la GA con eficacia y aceptación y cumplimiento por parte de los pacientes aceptables.

[006] Por lo tanto, todavía existe una necesidad insatisfecha de enfoques terapéuticos nuevos y mejorados para tratar eficazmente enfermedades oftálmicas u oculares, tales como la atrofia geográfica, y restaurar o prevenir la pérdida de visión en pacientes que padecen tal enfermedad.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

[007] El sistema humano innato está compuesto por la vía del complemento. La vía del complemento sirve para defenderse contra la infección bacteriana piógena al unir la inmunidad innata y adaptativa; y eliminar productos de complejos inmunitarios y lesiones inflamatorias. El complemento es un sistema de más de 30 proteínas involucradas en reacciones en cascada en plasma y superficies celulares. El sistema del complemento y sus componentes del complemento están involucrados en diversos procesos inmunitarios. Por ejemplo, el complejo C5b-9 del complemento, también denominado complejo terminal o complejo de ataque a la membrana (MAC), cumple una función importante en la muerte celular al inducir daños en la permeabilidad de la membrana.

[008] Hay tres vías conocidas de activación del complemento: la clásica, la de la lectina y la alternativa. Las tres vías conducen a la escisión de C3 por parte de la C3 convertasa y la posterior escisión de C5 por parte de la C5 convertasa, lo que libera C3a, C3b, C5a y C5b.

[009] El complemento C3 es una proteína grande compuesta por 13 dominios diferentes y un tamaño molecular de 185 kilodaltons. Durante la activación del complemento, C3 experimenta escisión proteolítica y modificaciones estructurales en diferentes sitios. Los fragmentos derivados de C3 ejercen diferentes funciones efectoras y forman convertasas que alimentan los bucles de amplificación de las tres vías del complemento. Para evitar dudas, y a menos que se indique lo contrario, C3, como se usa en la presente, se refiere al componente 3 del complemento humano de UniProt P01024 y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica esa proteína. La secuencia del complemento C3 humano se representa en SEQ ID NO: 47 y está disponible en línea bajo el UniProt P01024.

[0010] C3b deriva de C3 nativo y es el mayor de los dos elementos formados por la escisión de C3.

[0011] La C3 convertasa de la vía clásica y la vía de la lectina, C4bC2a, escinde C3 de longitud completa en C3b y la anafilatoxina C3a. La vía alternativa también genera C3b y C3a, pero utiliza la C3 convertasa de la vía alternativa, C3bBb. Además, pueden generarse productos de degradación de C3 adicionales en las vías del complemento. El factor I del complemento (CFI) es una serina proteasa plasmática que es capaz de inactivar permanentemente C3b a iC3b. Luego, iC3b se escinde en fragmentos adicionales (C3dg y C3c) mediante CFI. Un producto proteolítico de C3 adicional, C3d, se une al receptor 2 del complemento (CR2) y puede cumplir una función importante en el control del ciclo celular de los linfocitos B. Junto con los productos proteicos derivados de C3, las vías del complemento incluyen, entre otros, C1, C2, C4, C4b, C4a, C5, C5b, C5a, C6, C7, C8, C9, C1q, C1r, C1s, factor B, factor D, factor P, factor H, factor I, CD46 (MCP), CD55 (DAF), CD59 (MAC-IP), CR1 (CD35), CR2 (CD21), CR3, CR4, C3aR, C5aR1, C5aR2, CRIg, cadena α de C4BP, cadena β de C4BP, ficolina-1, lectina de unión a manosa (MBL), serina proteasa-1 asociada con MBL (MASP-1) y serina proteasa-2 asociada con MBL (MASP- 2). La vía del complemento y diversos componentes de la vía del complemento se describen con mayor detalle en Noris *et al.* Semin Nephrol. 2013; 33(6): 479–492.

[0012] Trabajos recientes demostraron que los componentes del complemento C3 y C5 son los principales constituyentes de las drusas en pacientes con AMD. Se especuló que su presencia, así como la del complejo de ataque a la membrana (MAC) C5b-9 y otras proteínas reactivas de fase aguda en las células del RPE que recubren las drusas, están involucradas en el proceso que puede desencadenar la activación del complemento y la formación de MAC.

[0013] Se demostró que, en pacientes que padecen GA, una mayor activación no controlada del sistema del complemento en la coroides y la retina da como resultado la destrucción de la coriocapilar, el daño y la pérdida tanto de las células del RPE como de los fotorreceptores. Los inventores formularon la hipótesis e ilustraron que la neutralización de C3 en la retina bloquea el bucle de amplificación de la vía alternativa del complemento y, por lo tanto, reduce la generación del complejo de ataque a la membrana tóxico celular y la generación de los componentes proinflamatorios del complemento (C3a, C3b, iC3b, C5a), lo que mejora el resultado clínico de los pacientes que padecen GA.

[0014] Sin embargo, es particularmente difícil tratar enfermedades oftálmicas u oculares, ya que la administración de agentes terapéuticos al ojo está limitada debido a varias barreras, incluso, entre otras, las barreras hematorretinianas, tales como el

RPE. La capacidad de penetrar el RPE y entrar en la coroides del ojo mejoraría el potencial terapéutico de los fármacos.

[0015] Para abordar esta situación clínica, los inventores desarrollaron nuevos anticuerpos y fragmentos de estos capaces de penetrar en el RPE y la membrana de Bruch de la región coroidea del ojo, por lo que se dirigen al complemento C3 en la región coroidea. Los anticuerpos y fragmentos de estos de la presente invención muestran características mejoradas para mejorar el resultado clínico de los pacientes que padecen enfermedades oftálmicas u oculares.

[0016] En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que comprende una cadena pesada variable (VH) y una cadena liviana variable (VL),

- en donde la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 15, una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y
- en donde la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 y 18, y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6.

[0017] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión 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 de SEQ ID NO: 20, 22 o 24; 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: 21, 23 o 25.

[0018] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión 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 de SEQ ID NO: 20, 22 o 24; 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: 21, 23 o 25;

en donde:

- la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 15, una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y
- la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 y 18, y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6.

[0019] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión 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 de SEQ ID NO: 20; 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: 21;

en donde:

- la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y
- la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6.

[0020] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión 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 de SEQ ID NO: 22; 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: 23;

en donde:

- la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6.

[0021] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión 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 de SEQ ID NO: 24; 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: 25;

en donde:

- la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6.

[0022] En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que comprende: una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, 22 o 24; y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, 23 o 25.

[0023] En una forma de realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión 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: 20 y SEQ ID NO: 21, respectivamente;
b. una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23, respectivamente; o
c. una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25, respectivamente.

[0024] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se selecciona del grupo que consiste en un fragmento variable monocatenario (scFv), un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento Fv, un diacuerpo, un mimético de anticuerpo pequeño.

[0025] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es un fragmento variable monocatenario

(scFv) que comprende, o que consiste en, una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que están ligadas por un ligador polipeptídico. El scFv puede comprender, o consistir en, del terminal N al terminal C, la cadena liviana variable, el ligador y la cadena pesada variable. El scFv puede comprender, o consistir en, del terminal N al terminal C, la cadena pesada variable, el ligador y la cadena liviana variable. El ligador puede comprender un polipéptido seleccionado de SEQ ID NO: 43-46 y 56-65, preferentemente SEQ ID NO: 46.

[0026] En una forma de realización alternativa, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este se selecciona de los grupos que consisten en un anticuerpo de dominio único, tal como un sdAb, un sdFv, un nanocuerpo, un V-Nar y un VHH. En esta forma de realización particular, dicho anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una cadena pesada variable. En una forma de realización, dicha cadena pesada variable comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 15, una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3. En otra forma de realización, dicha cadena pesada variable comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, 22 o 24.

[0027] En una forma de realización, dicho fragmento de unión al antígeno es un fragmento variable monocatenario (scFv), con mayor preferencia un scFv humanizado.

[0028] En una forma de realización adicional, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es un fragmento variable monocatenario que comprende un polipéptido que tiene al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30 y 31.

[0029] En una forma de realización adicional, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es un fragmento variable monocatenario que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30 y 31.

[0030] En una forma de realización adicional, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es un fragmento variable monocatenario que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30 y 31.

[0031] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es capaz de inhibir las vías de activación del complemento, incluso la vía clásica (CP), la vía de la lectina (LP) y la vía

alternativa (AP). En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es capaz de una inhibición aproximadamente equivalente de la actividad de las vías del complemento CP, LP y AP. Por ejemplo, pero de ninguna manera limitativo, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este es capaz de inhibir la actividad de la vía CP en al menos 80 %, capaz de inhibir la actividad de la LP en al menos 80 % y capaz de inhibir la actividad de la AP en al menos 80 %. En ciertas formas de realización, la inhibición de la actividad de las vías del complemento CP, LP y AP es de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos alrededor de 90 % o al menos alrededor de 95 %.

[0032] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es capaz de unirse al complemento C3 y C3b.

[0033] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es capaz de evitar la formación de C3 convertasa.

[0034] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es capaz de penetrar la membrana de Bruch.

[0035] En una forma de realización particular, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se une a C3 humano a una K_D <50 nM, preferentemente a una K_D <15 nM, preferentemente a una K_D <10 nM, preferentemente a una K_D <7 nM, preferentemente a una K_D <1 nM, preferentemente a una K_D <0,5 nM, preferentemente a una K_D <0,2 nM, preferentemente a una K_D <0,15 nM, preferentemente a una K_D <0,10 nM, preferentemente a una K_D <0,05 nM, preferentemente a una K_D <0,04 nM, con mayor preferencia a una K_D <0,03 nM.

[0036] En otra forma de realización particular, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se une a C3b humano a una K_D <50 nM, preferentemente a una K_D <15 nM, preferentemente a una K_D <10 nM, preferentemente a una K_D <7 nM, preferentemente a una K_D <1 nM, preferentemente a una K_D <0,5 nM, preferentemente a una K_D <0,2 nM, preferentemente a una K_D <0,15 nM, preferentemente a una K_D <0,10 nM, con mayor preferencia a una K_D <0,05 nM.

[0037] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención tiene una afinidad de unión aproximadamente equivalente con C3 y C3b.

[0038] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al

antígeno de este de acuerdo con la invención tiene una afinidad de unión con C3a, iC3b, C4, C4b, C5 y/o C5b de alrededor de 10^{-4} M o menor (es decir, más débil).

[0039] En una forma de realización adicional, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención tiene una afinidad de unión más débil con C3a, iC3b, C4, C4b, C5 y/o C5b en comparación con la afinidad de unión con C3 y C3b.

[0040] En una forma de realización particular, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención no tiene afinidad de unión con C3a, iC3b, C4, C4b, C5 y/o C5b. Como se usa en la presente, "no tiene afinidad de unión" se refiere a una afinidad de unión no detectable con respecto al fondo con uno o más ensayos de afinidad de unión conocidos en la técnica, tales como, entre otros, un ensayo ELISA.

[0041] En ciertas formas de realización, el anticuerpo de la invención es capaz de unirse al complemento C3 de una manera para evitar la formación de C3 convertasa. En una forma de realización particular, el anticuerpo de la invención inhibe la actividad de C3 convertasa. En una forma de realización particular, el anticuerpo de la invención es capaz de inhibir el bucle de amplificación de la C3 convertasa.

[0042] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es capaz de inhibir la actividad de C3 coroidal.

[0043] En ciertas formas de realización, se espera que el anticuerpo anti-C3 de la invención tenga mejor eficacia y seguridad en el tratamiento de la GA u otra enfermedad oftálmica u ocular en comparación con otros tratamientos debido a las siguientes propiedades que se enumeran a continuación.

[0044] En una forma de realización preferida, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es capaz de unirse a un epítopo en el complemento C3, en donde tal unión evita la formación de C3 convertasa.

[0045] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que se une a al menos un residuo de aminoácido dentro de las regiones de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 47. En una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que se une a las regiones de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 48.

[0046] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que se une a al menos un residuo de aminoácido dentro

de los residuos del aminoácido 366 al aminoácido 478 del complemento C3 humano como se establece en SEQ ID NO: 47.

[0047] En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que se une a al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los residuos 366, 392-396, 413-421, 425, 427, 442, 453 y 478 del complemento C3 humano como se establece en SEQ ID NO: 47.

[0048] En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que se une a todos los residuos de aminoácidos 366, 392-396, 413-421, 425, 427, 442, 453 y 478 del complemento C3 humano como se establece en SEQ ID NO: 47.

[0049] En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este para su uso como un medicamento.

[0050] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad ocular o de la retina. Preferentemente, dicha enfermedad ocular o de la retina es una enfermedad o trastorno mediado por el complemento C3. Con mayor preferencia, dicha enfermedad se refiere a cualquier trastorno en el que el inicio, la progresión o la persistencia de los síntomas o la enfermedad requieran la participación de C3.

[0051] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un método para tratar una o más enfermedades oculares o de la retina, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la invención a un paciente que lo necesite.

[0052] En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de dicho anticuerpo anti-C3 o dicho fragmento de unión al antígeno de este para la elaboración de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad oftálmica u ocular.

[0053] En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en retinopatía, retinopatía proliferativa (PR), tal como retinopatía de la prematuridad, retinopatía isquémica, retinopatía diabética (DR), incluso retinopatía diabética proliferativa (PDR) y retinopatía diabética no proliferativa, edema macular diabético (DME), isquemia macular diabética (DMI), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), incluso AMD seca y AMD húmeda, atrofia geográfica (GA), retinosis pigmentaria, distrofia retiniana

hereditaria, degeneración miope, oclusiones venosas de la retina, oclusiones de las arterias de la retina, endoftalmitis, uveítis, edema macular cistoide, membrana neovascular coroidea secundaria a cualquier enfermedad de la retina, neuropatías ópticas, glaucoma, desprendimiento de la retina, retinopatía tóxica, retinopatía por radiación, retinopatía traumática, vasculopatía retiniana inducida por fármacos, neovascularización retiniana, vasculopatía coroidea polipoidea, vasculitis retiniana, microaneurisma retiniano, fibroplasia retrolental, coriorretinitis, distrofia de Fuch, telangiectasia macular, síndrome de Usher, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH) y enfermedad de Stargardt.

[0054] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad, atrofia geográfica, glaucoma neovascular y retinopatía diabética. En aun una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este para su uso en el tratamiento o la prevención de la atrofia geográfica.

[0055] En un aspecto, el anticuerpo de la invención inhibe la actividad de la vía clásica (CP), la vía de la lectina (LP) y la vía alternativa (AP) del complemento. Por lo tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este para su uso en un método para tratar una enfermedad oftálmica u ocular mediante la inhibición de la actividad de la vía clásica (CP), la vía de la lectina (LP) y la vía alternativa (AP) del complemento. La presente invención también proporciona una proteína de unión al antígeno o un fragmento de esta como se describió anteriormente para su uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por el complemento C3, mediante la inhibición de la actividad del complemento C3 localizado en la coroides.

[0056] En una forma de realización, la presente invención proporciona un método para diagnosticar trastornos asociados con el complemento C3 en una muestra biológica mediante el uso del anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la presente invención.

[0057] En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0058] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este o una composición farmacéutica

que comprende un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se administra por vía parenteral, vía intravenosa, vía intravítrea (IVT) o vía de administración subcutánea, preferentemente por vía intravítrea.

[0059] En una forma de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido o polinucleótidos que codifican un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la presente invención y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0060] En una forma de realización, la presente invención proporciona un polinucleótido o polinucleótidos aislados que codifican un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la invención.

[0061] En un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido o polinucleótidos aislados que comprenden:

- una secuencia que codifica una región variable de la cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 24, y/o
- una secuencia que codifica una región variable de la cadena liviana establecida en SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25.

[0062] En un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un scFv establecido en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31.

[0063] En una forma de realización, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido o polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia que codifica una región variable de la cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 24, y/o una secuencia que codifica una región variable de la cadena liviana establecida en SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25.

[0064] En una forma de realización, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un scFv establecido en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31.

[0065] En una forma de realización, la presente invención proporciona un vector viral que comprende un polinucleótido o polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia que codifica una región variable de la cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 24, y/o una secuencia que codifica una región variable de la cadena liviana establecida en SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o

SEQ ID NO: 25.

[0066] En una forma de realización, la presente invención proporciona un vector viral que comprende un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un scFv establecido en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31.

[0067] En una forma de realización, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende un vector de expresión o un polinucleótido o polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia que codifica una región variable de la cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 24, y/o una secuencia que codifica una región variable de la cadena liviana establecida en SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25.

[0068] En una forma de realización, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende un vector de expresión o un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un scFv establecido en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31.

[0069] En una forma de realización, la presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que comprende obtener una célula huésped que comprende un vector de expresión o un polinucleótido o polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia que codifica una región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 24, y/o una secuencia que codifica una región variable de la cadena liviana como se establece en SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25; y cultivar la célula huésped.

[0070] En una forma de realización, la presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que comprende obtener una célula huésped que comprende un vector de expresión o un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un scFv establecido en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31.

[0071] En una forma de realización, el método para producir un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este comprende además recuperar y purificar el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0072] Figura 1: Mejor penetración en la retina con scFv después de la inyección IVT equimolar en *Macaca fascicularis*. La Figura 1A muestra el nivel de exposición

retiniana de una inyección intravítrea de scFv (scFv 40 nmol, brolucizumab, 1 mg). Los datos están adaptados de Brolucizumab BLA. La Figura 1B muestra el nivel de exposición retiniana de una inyección intravítrea de Fab (Fab 40 nmol, ranibizumab, 2 mg). Los datos están adaptados de: Invest Ophthalmol Vis Sci. febrero de 2005;46(2):726-33.

[0073] Figura 2: Esta figura ilustra la unión del Clon I al complemento C3 humano. La Figura 2A muestra SEQ ID NO: 55 que es parte de la secuencia de C3 como se establece en SEQ ID NO: 47, en la que los residuos de epítopos están en negrita y subrayados. La Figura 2B muestra la estructura de EM del complejo C3c:Clon I, en la que la estructura de C3c se representa en gris y la estructura de scFv está en representación de cinta negra, respectivamente. El mapa de EM final se muestra como una superficie semitransparente con un nivel de contorno de 0,214.

[0074] Figura 3: Esta figura muestra la difusión *in vitro* del Clon I y el Compuesto comparativo A2 a través de la membrana de Bruch porcina. La difusión se midió durante 72 h en una cámara de Ussing y la cantidad de compuesto difundido a través de la membrana de Bruch se da como compuesto medido en la cámara de difusión en comparación con la cantidad total de compuesto (muestra y cámara de difusión). La cantidad total de compuesto se estableció en 100 %.

[0075] Figura 4: Esta figura muestra la difusión *in vitro* del Compuesto comparativo A3 y el Compuesto comparativo A2 a través de la membrana de Bruch porcina. La difusión se midió durante 72 h en una cámara de Ussing y la cantidad de compuesto difundido a través de la membrana de Bruch se da como compuesto medido en la cámara de difusión en comparación con la cantidad total de compuesto (muestra y cámara de difusión). La cantidad total de compuesto se estableció en 100 %.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0076] **Definiciones**

[0077] La estructura generalizada de anticuerpos o inmunoglobulina es conocida por las personas del oficio de nivel medio; estas moléculas son glicoproteínas heterotetraméricas, por lo general de alrededor de 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas livianas (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena liviana está ligada covalentemente a una cadena pesada mediante un puente disulfuro para formar un heterodímero, y la molécula heterotrimérica se forma a través de un enlace disulfuro covalente entre las dos cadenas pesadas idénticas de los heterodímeros. Aunque las cadenas liviana y pesada están ligadas entre sí mediante un puente disulfuro, la cantidad de enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas

varía según el isotipo de 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 de tres o cuatro 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 dos dominios, un dominio variable de terminal amino (V_L = cadena liviana variable) y un domino constante de 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 suele estar ligado de manera covalente al dominio C_{H1} a través de un puente disulfuro. Se cree que determinados residuos de aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena liviana y la cadena pesada (Chothia *et al.*, 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663.)

[0078] Ciertos dominios dentro de los dominios variables difieren ampliamente entre diferentes anticuerpos, es decir, son "hipervariables". Estos dominios hipervariables contienen residuos que están directamente involucrados en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular con su determinante antigénico específico. La hipervariabilidad, tanto en los dominios variables de la cadena liviana como 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 la 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 describen Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917.

[0079] Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de una CDR o FR determinada se pueden determinar adicionalmente mediante el uso de una nomenclatura adicional, tal como el esquema de numeración AHo, como se describe en Honegger A y Pluckthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool", J Mol Biol, 8 de junio de 2001; 309(3):657-70, o el esquema de numeración "IMGT") como se describe en Lefranc M P *et al.*, "MGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains", Dev Comp Immunol, enero de 2003; 27(1):55-77.

[0080] Las tres CDR dentro de cada una de las cadenas pesada y liviana están separadas por regiones marco (FR), que contienen secuencias que tienden a ser menos variables. Del terminal amino al terminal carboxi de los dominios variables de la

cadena liviana y pesada, las FR y las CDR están dispuestas en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La configuración en gran parte de lámina □ de las FR hace que las CDR dentro de cada una de las cadenas se aproximen mucho entre sí, así como a las CDR de la otra cadena. La conformación resultante contribuye al sitio de unión al antígeno (ver Kabat *et al.*, 1991, publ. NIH N.° 91-3242, vol. I, páginas 647-669), aunque no todos los residuos de CDR están necesariamente implicados directamente en la unión al antígeno.

[0081] Los residuos de FR y los dominios constantes de Ig pueden contribuir a la unión al antígeno y/o mediar en la función efectora del anticuerpo. Se cree que algunos residuos de FR tienen un efecto significativo en la unión al antígeno en al menos tres formas: al unirse de manera no covalente directamente a un epítopo, al interactuar con uno o más residuos de CDR y al afectar la interfaz entre las cadenas pesada y liviana. Los dominios constantes no están directamente implicados en la unión al antígeno, pero median en diversas funciones efectoras de Ig, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP).

[0082] Las cadenas livianas de las inmunoglobulinas de vertebrados se asignan a una de dos clases claramente distintas, kappa (□) y lambda (□), en función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante. En comparación, las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de mamíferos se asignan a una de cinco clases principales, de acuerdo con la secuencia de los dominios constantes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. IgG e IgA se pueden dividir a su vez en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2, respectivamente. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan □□ □, □, □ y □, respectivamente. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de las clases de inmunoglobulinas nativas son conocidas.

[0083] El término "anticuerpo" y las expresiones "anticuerpo anti-C3", "anticuerpo anti-C3 humanizado" y "anticuerpo anti-C3 humanizado variante" se usan en la presente en el sentido más amplio y abarcan específicamente anticuerpos monoclonales (incluso anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, tales como dominios variables y otras porciones de anticuerpos que exhiben una actividad biológica deseada, por ejemplo, unión a C3.

[0084] La expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos; es decir, los anticuerpos individuales en esa población son idénticos excepto por las mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un único determinante antigénico, un "epítopo". Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica una población sustancialmente homogénea de anticuerpos dirigidos al epítopo idéntico y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante algún método en particular. Debe entenderse que los anticuerpos monoclonales pueden elaborarse mediante cualquier técnica o metodología conocida en la técnica; incluso, por ejemplo, el método de hibridoma (Kohler *et al.*, 1975, Nature 256:495), o métodos de ADN recombinante conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.° 4.816.567) o métodos de aislamiento de monoclonales producidos de manera recombinante con colecciones de anticuerpos de fagos, mediante el uso de técnicas descritas en Clackson *et al.*, 1991, Nature 352: 624-628 y Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597.

[0085] Los anticuerpos quiméricos consisten en las regiones variables de la cadena liviana y pesada de un anticuerpo de una especie (por ejemplo, un mamífero no humano, tal como un ratón) y las regiones constantes de la cadena liviana y pesada de un anticuerpo de otra especie (por ejemplo, ser humano) y se pueden obtener al ligar las secuencias de ADN que codifican las regiones variables del anticuerpo de la primera especie (por ejemplo, ratón) con las secuencias de ADN de las regiones constantes del anticuerpo de la segunda especie (por ejemplo, ser humano) y transformar un huésped con un vector de expresión que contiene las secuencias ligadas para permitirle producir un anticuerpo quimérico. Alternativamente, el anticuerpo quimérico también podría ser uno en el que una o más regiones o dominios de la cadena pesada y/o liviana sean idénticos, homólogos o una variante de la secuencia correspondiente en un anticuerpo monoclonal de otra clase o isotipo de inmunoglobulina o a partir de una secuencia de consenso o de línea germinal. Los anticuerpos quiméricos pueden incluir fragmentos de tales anticuerpos, siempre que el fragmento de anticuerpo muestre la actividad biológica deseada de su anticuerpo parental, por ejemplo, unión al mismo epítopo (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.° 4.816.567; y Morrison *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855).

[0086] Las expresiones "fragmento de anticuerpo", "fragmento de unión al antígeno",

"fragmento de anticuerpo anti-C3", "fragmento de anticuerpo anti-C3 humanizado", "fragmento de anticuerpo anti-C3 humanizado variante" se refieren a una porción de un anticuerpo anti-C3 de longitud completa, en la que se retiene una región variable o una capacidad funcional, por ejemplo, unión al epítopo C3 específico. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno 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 a partir de fragmentos de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos de dominio único (por ejemplo, sdAb, sdFv, nanocuerpo, VHH) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0087] Los anticuerpos de longitud completa se pueden tratar con enzimas, tales como papaína o pepsina, para generar fragmentos de anticuerpos útiles. La digestión con papaína se usa para producir dos fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión al antígeno único, y un fragmento residual "Fc". El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena liviana y el dominio C_{H1} de la cadena pesada. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de unión al antígeno y todavía es capaz de reticular el antígeno.

[0088] 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.

[0089] El fragmento "Fv" contiene un sitio de unión al antígeno y reconocimiento de antígeno completo que consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y la cadena liviana en estrecha asociación no covalente. En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero de V_H-V_L. En conjunto, las seis CDR confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo.

[0090] Un fragmento de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" es una variante Fv monocatenaria que comprende los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, donde los dominios están presentes en una única cadena de polipéptidos. El Fv monocatenario es capaz de reconocer y unirse al antígeno. El polipéptido scFv también puede contener opcionalmente un ligador polipeptídico ubicado entre los dominios V_H y V_L

para facilitar la formación de una estructura tridimensional deseada para la unión al antígeno por parte del scFv (ver, por ejemplo, Pluckthun, 1994, en: The Pharmacology of monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315). Tales ligadores incluyen, entre otros, secuencias de aminoácidos GGGGS repetidas (SEQ ID NO: 43) o variantes de estas. Tales moléculas scFv pueden tener las estructuras generales: NH2-VL-ligador-VH-COOH o NH2-VH-ligador-VL-COOH. El scFv generalmente está libre de regiones de dominio constante de anticuerpo, aunque un scFv de la invención se puede ligar o unir a regiones de dominio constante de anticuerpo (por ejemplo, dominio Fc de anticuerpo) para alterar diversas propiedades del scFv, incluso, entre otras, mayor semivida en suero o tejido. Un scFv generalmente tiene un peso molecular de alrededor de 25 kDa y un radio hidrodinámico de alrededor de 2,5 nm.

[0091] En una forma de realización, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente invención son anticuerpos monocatenarios (scFv) o fragmentos Fab. En el caso de los anticuerpos scFv, un dominio VL seleccionado se puede ligar a un dominio VH seleccionado en cualquier orientación mediante un ligador flexible. Los ligadores flexibles, como se contemplan en la presente, son ligadores peptídicos o polipeptídicos con una longitud de al menos 1 aminoácido. Preferentemente, los ligadores tienen una longitud de 1 a 100 aminoácidos. Con mayor preferencia, los ligadores tienen una longitud de 5 a 50 aminoácidos, con mayor preferencia una longitud de 10 a 40 aminoácidos, e incluso con mayor preferencia los ligadores tienen una longitud de 15 a 30 aminoácidos. Los ejemplos no limitativos de ligadores pequeños usados con frecuencia incluyen secuencias de los aminoácidos glicina y serina, denominados miniligador GS. Los ejemplos preferidos de secuencias ligadoras son ligadores Gly/Ser de diferente longitud, tales como ligadores $(gly_x ser_y)_z$, incluso $(gly_4 ser)_3$ (SEQ ID NO: 45), $(gly_4 ser)_4$ (SEQ ID NO: 46), $(gly_4 ser)$ (SEQ ID NO: 44), $(gly_3 ser)$ (SEQ ID NO: 56), gly_3 y $(gly_3 ser_2)_3$ (SEQ ID NO: 65). La cantidad de aminoácidos en estos ligadores puede variar, por ejemplo, puede ser de 4 (por ejemplo, GGGS) (SEQ ID NO: 56), 6 (por ejemplo, GGSGGS) (SEQ ID NO: 57), 7 (por ejemplo, GGGSGGS) (SEQ ID NO: 58) o múltiples de estos, tal como, por ejemplo, dos o tres o más repeticiones de estos cuatro, seis o siete aminoácidos. En una forma de realización, el anticuerpo de la invención comprende un ligador seleccionado del grupo que consiste en secuencias establecidas en SEQ ID NO: 43 (GGGGS), SEQ ID NO: 44 (GGGGSGGGGS), SEQ ID NO: 45 (GGGGSGGGGSGGGGS) y SEQ ID NO: 46 (GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS). En una forma de realización particular, dicho

ligador es SEQ ID NO: 46. Dicho ligador también puede ser una variante como se describe en Holliger *et al.* (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448. Otros ligadores que se pueden usar para la presente invención están descritos por Alfthan *et al.* (1995), Protein Eng. 8:725-731, Choi *et al.* (2001), Eur. J. Immunol. 31:94-106, Hu *et al.* (1996), Cancer Res. 56:3055-3061, Kipriyanov *et al.* (1999), J. Mol. Biol. 293:41-56 y Roovers *et al.* (2001), Cancer Immunol. Immunother. 50:51-59. Los ejemplos adicionales de ligadores incluyen los siguientes: ligador 7GS: SGGSGGS (SEQ ID NO: 59); ligador 8GS: ligador 9GS: GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 60); ligador 18GS: GGGGSGGGGSGGGGGGGS (SEQ ID NO: 61); ligador 25GS: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 62); ligador 30GS: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 63); y ligador 35GS: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 64).

[0092] En un scFv de acuerdo con la presente divulgación, la disposición de VL y VH puede ser VL-ligador-VH o VH-ligador-VL, en donde la primera orientación es la preferida. Sin embargo, también se contemplan anticuerpos de un solo dominio VH o VL. En el caso de los fragmentos Fab, los dominios variables de la cadena liviana VL seleccionados se fusionan con la región constante de una cadena kappa de Ig humana, mientras que los dominios variables de la cadena pesada VH adecuados se fusionan con el primer dominio constante CH1 (del terminal N) de una IgG humana. En el terminal C del dominio constante o en otros sitios del dominio variable o constante, se puede formar un puente disulfuro intercatenario.

[0093] Como se usa en la presente, un "VHH", "nanocuerpo" o "anticuerpo solo de cadena pesada" es una proteína de unión al antígeno que comprende un único dominio variable de la cadena pesada derivado de las especies de la familia Camelidae, que incluye camellos, llamas y alpacas. Un VHH generalmente tiene un peso molecular de alrededor de 15 kDa.

[0094] Otros fragmentos de anticuerpos reconocidos incluyen aquellos que comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}) para formar un par de regiones de unión 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.

[0095] Un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo humanizado es un tipo específico de anticuerpo quimérico que incluye una variante de secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina, o un fragmento de esta, que es capaz de unirse 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", por lo general se toma de un dominio de anticuerpo "importado", particularmente un dominio variable. En general, un anticuerpo humanizado incluye al menos las CDR o los HVL de un anticuerpo no humano, insertadas entre las FR de un dominio variable de la cadena liviana o pesada humano.

[0096] La presente invención describe anticuerpos anti-C3 humanizados específicos que contienen CDR derivadas de un anticuerpo murino, de conejo, de llama o quimérico insertado entre las FR de los dominios variables de la cadena pesada y liviana de la secuencia de línea germinal humana. Se entenderá que ciertos residuos de FR no humanos (por ejemplo, de anticuerpos murinos, de conejo, de llama o quiméricos, etc.) pueden ser importantes para la función de los anticuerpos humanizados y, por lo tanto, ciertos de los residuos de los dominios variables de la cadena pesada y liviana de la secuencia de línea germinal humana se modifican para que sean los mismos que los de la secuencia no humana correspondiente.

[0097] Como se usa en la presente, las expresiones "anticuerpo de la invención" y "anticuerpo anti-C3 de la invención" se refieren a un anticuerpo dirigido contra C3 o un fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente. En una forma de realización, dicho anticuerpo de la invención es un scFv. En una forma de realización específica, el anticuerpo de la invención comprende una cadena pesada variable (VH) y una cadena liviana variable (VL), en donde la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 15, una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y en donde la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 y 18, y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6.

[0098] En una forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-C3 humanizado o un fragmento de este. Los anticuerpos humanizados comprenden sustancialmente al menos uno, y por lo general dos, dominios variables (tales como los contenidos, por ejemplo, en los fragmentos Fab, Fab', F(ab')2, Fabc y Fv) en los que todas, o sustancialmente todas, las CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y específicamente en la presente, las CDR son de origen de conejo, y las FR son las de una secuencia de consenso o línea germinal de inmunoglobulina humana. En otro aspecto, un anticuerpo anti-C3 humanizado también

incluye al menos una porción de una región Fc de inmunoglobulina, por lo general la de una inmunoglobulina humana. Normalmente, el anticuerpo contendrá tanto la cadena liviana como 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.

[0099] Un anticuerpo anti-C3 humanizado se puede seleccionar de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluso IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluso IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2. Por ejemplo, el dominio constante puede ser un dominio constante de fijación al complemento donde se desea que el anticuerpo humanizado exhiba actividad citotóxica, y el isotipo es por lo general IgG1. Cuando tal actividad citotóxica no es deseable, el dominio constante puede ser de otro isotipo, por ejemplo, IgG_2 o puede ser una secuencia de IgG1 modificada que carece de actividad citotóxica, por ejemplo, que contiene la mutación N297A o L234A junto con L235A. Un anticuerpo anti-C3 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 de la técnica. En formas de realización específicas, la presente invención proporciona anticuerpos que son anticuerpos IgG1 y, más particularmente, anticuerpos IgG1 caracterizados por una función efectora reducida.

[00100] Las FR y CDR, o los HVL, de un anticuerpo anti-C3 humanizado o fragmentos de este, incluso los scFv, no necesitan corresponderse con precisión a las secuencias parentales. Por ejemplo, uno o más residuos en la CDR importada, o la HVL, o la secuencia de FR de línea germinal o de consenso pueden alterarse (por ejemplo, mutagenizarse) 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 cualquiera de las secuencias parentales, pero, no obstante, el anticuerpo retiene la función de unión a C3. Tal alteración por lo general no será extensa y serán alteraciones conservadoras. Por lo general, al menos 75 % de los residuos de anticuerpos humanizados corresponderán a los de las secuencias de CDR importadas y FR de línea germinal o de consenso, con mayor frecuencia al menos 90 % y con máxima frecuencia más de 95 %, o más de 98 % o más de 99 %.

[00101] Las expresiones "secuencia de consenso" y "anticuerpo de consenso" se refieren a una secuencia de aminoácidos que comprende el residuo de aminoácido que aparece con mayor frecuencia en cada ubicación en todas las inmunoglobulinas de cualquier clase, isotipo o estructura de subunidad en particular, por ejemplo, un

dominio variable de inmunoglobulina humana. La secuencia de consenso puede estar basada en inmunoglobulinas de una especie en particular o de muchas especies. Se entiende que una secuencia, estructura o anticuerpo de "consenso" abarca una secuencia humana de consenso como se describe en ciertas formas de realización, y se refiere a una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos de aminoácidos que aparecen con mayor frecuencia en cada ubicación en todas las inmunoglobulinas humanas de cualquier clase, isotipo o estructura de subunidad en particular. Por lo tanto, 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 cualquier inmunoglobulina individual. La secuencia de consenso de la región variable no se obtiene de ningún anticuerpo o inmunoglobulina producidos naturalmente. Kabat *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. y variantes de esta. Las FR de secuencias de consenso de la cadena liviana y pesada, y variantes de estas, proporcionan secuencias útiles para la preparación de anticuerpos anti-C3 humanizados. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.° 6.037.454 y 6.054.297.

[00102] Las secuencias de línea germinal humana se encuentran naturalmente en la población humana. Las secuencias de línea germinal humana corresponden a moléculas de proteína de anticuerpo codificadas por los segmentos génicos variable (V), diversidad (D) y unión (J), que se redisponen y forman genes recombinados. La recombinación de VDJ conduce a la generación de un número grande pero finalmente finito de proteínas de anticuerpo no mutadas, conocidas como repertorio de línea germinal. Una combinación de esos genes de línea germinal genera diversidad de anticuerpos. Las secuencias de anticuerpo de línea germinal para la cadena liviana del anticuerpo provienen de genes v y genes j kappa o lambda de línea germinal humana conservados. De manera similar, las secuencias de la cadena pesada provienen de genes v, d y j de línea germinal (LeFranc, M-P, y LeFranc, G, "The Immunoglobulin Facts Book" Academic Press, 2001).

[00103] Un anticuerpo "aislado" es uno que se identificó y separó y/o recuperó de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes del entorno natural del anticuerpo son aquellos materiales que pueden interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo y pueden ser enzimas, hormonas u otros solutos proteináceos o no proteináceos. En un aspecto, el anticuerpo se purificará

hasta al menos más de 95 % de aislamiento por peso de anticuerpo.

[00104] La expresión "rendimiento del anticuerpo" se refiere a factores/propiedades que contribuyen al reconocimiento del antígeno por parte del anticuerpo o la eficacia de un anticuerpo *in vivo*. En una forma de realización preferida, se refiere a la capacidad del anticuerpo para evitar el colapso del citoesqueleto en las células de la retina. Los cambios en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden afectar las propiedades del anticuerpo, tales como el plegamiento, y pueden influir en factores físicos, tales como la tasa inicial de unión 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 la proteína y la semivida del anticuerpo. Como se usa en la presente, el término "afinidad" se refiere a la fuerza de la interacción entre el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo y el epítopo al que se une. Como entenderán fácilmente las personas del oficio de nivel medio, la afinidad de una proteína de unión al antígeno o un anticuerpo se puede informar como una constante de disociación (K_D) en molaridad (M). La capacidad de un dominio de unión al antígeno para unirse a un determinante antigénico específico se puede medir a través de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) u otras técnicas conocidas para una persona del oficio de nivel medio, por ejemplo, técnica de resonancia de plasmones superficiales (SPR) (analizado en un instrumento BIAcore), por ejemplo, realizado a 25 °C (Liljeblad *et al.*, Glyco J 17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)).

[00105] Como se usan en la presente, el término "idéntico" y la expresión "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, 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 alinean para una máxima correspondencia. Para determinar el porcentaje de identidad, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos). Luego se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido 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 = cantidad de posiciones idénticas/cantidad total de posiciones (por ejemplo, posiciones superpuestas) x 100). En algunas formas de realización, las dos secuencias que se comparan tienen la misma longitud, opcionalmente después de introducir espacios dentro de las secuencias, según sea adecuado (por ejemplo, se excluye cualquier extensión de secuencia adicional que vaya más allá de las secuencias que se comparan). Por ejemplo, cuando se comparan secuencias de región variable, no se consideran las secuencias líder y/o de dominio constante. Para comparar dos secuencias, una CDR "correspondiente" se refiere a una CDR en la misma ubicación en ambas secuencias (por ejemplo, CDR-H1 de cada secuencia).

[00106] La determinación del porcentaje de identidad o el porcentaje de similitud entre dos secuencias puede lograrse con un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático utilizado 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. Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al*., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Se pueden realizar búsquedas de nucleótidos BLAST con el programa NBLAST, puntuación=100, longitud de palabra=12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico que codifica una proteína de interés. Se pueden realizar búsquedas de proteínas BLAST con el programa XBLAST, puntuación=50, longitud de palabra=3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una proteína de interés. Para obtener alineaciones con espacios incorporados a fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al*., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Alternativamente, se puede usar PSI-Blast para realizar una búsqueda repetida que detecte relaciones distantes entre las moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden usar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático utilizado para comparar secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Tal algoritmo está incorporado 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 secuencias de aminoácidos, se pueden usar una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. En la técnica se conocen

algoritmos adicionales para analizar las secuencias, y estos incluyen ADVANCE y ADAM, como se describen en Torellis y Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5; y FASTA, descrito en Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-8. Dentro de FASTA, ktup es una opción de control que configura la sensibilidad y la velocidad de la búsqueda. Si ktup=2, se encuentran regiones similares en las dos secuencias que se comparan al observar pares de residuos alineados; si ktup=1, se examinan aminoácidos alineados simples. La configuración de ktup puede ser de 2 o 1 para secuencias de proteínas, o ir de 1 a 6 para secuencias de ADN. Si no se especifica ktup, el valor por defecto es de 2 para proteínas y de 6 para ADN. Alternativamente, se puede llevar a cabo una alineación de secuencias de proteínas con el algoritmo CLUSTAL W, como describen Higgins *et al*., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402.

[00107] Como se usa en la presente, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas esas designaciones incluyen la progenie de estas. Por lo tanto, "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula en cuestión primaria y los cultivos derivados de esta sin tener en cuenta la cantidad de transferencias.

[00108] El término "mamífero" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluso seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas y similares. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

[00109] Una "enfermedad" o "trastorno", como se usa en la presente, es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con un anticuerpo anti-C3 humanizado descrito en la presente. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

[00110] La expresión "inyección intravítrea" tiene su significado normal en la técnica y se refiere a la introducción de un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este en el humor vítreo de un paciente.

[00111] La expresión "administración subcutánea" se refiere a la introducción de un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este debajo de la piel de un paciente animal o humano, preferentemente dentro de una bolsa entre la piel y el tejido subyacente, mediante una administración sostenida relativamente lenta desde un receptáculo de fármaco. Pellizcar o tirar de la piel hacia arriba y lejos del tejido subyacente puede crear la bolsa.

[00112] La expresión "infusión subcutánea" se refiere a la introducción de un fármaco bajo la piel de un paciente animal o humano, preferentemente dentro de una bolsa entre la piel y el tejido subyacente, mediante una administración sostenida relativamente lenta desde un receptáculo de fármaco durante un período de tiempo que incluye, entre otros, 30 minutos o menos, o 90 minutos o menos. Opcionalmente, la infusión se puede realizar mediante la implantación subcutánea de una bomba de administración de fármaco implantada debajo de la piel del paciente animal o humano, en donde la bomba administra una cantidad predeterminada de fármaco durante un período de tiempo predeterminado, tal como 30 minutos, 90 minutos, o un período de tiempo que abarca la duración del régimen de tratamiento.

[00113] La expresión "bolo subcutáneo" se refiere a la administración de fármaco debajo de la piel de un paciente animal o humano, en donde la administración de fármaco en bolo es menor de alrededor de 15 minutos; en otro aspecto, menor de 5 minutos, y en otro aspecto, menor de 60 segundos. En aun otro aspecto, la administración se realiza dentro de una bolsa entre la piel y el tejido subyacente, donde la bolsa se puede crear al pellizcar o tirar de la piel hacia arriba y lejos del tejido subyacente.

[00114] La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa para referirse a una cantidad de un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que alivia o mejora uno o más de los síntomas del trastorno que se trata. Al hacerlo, es esa cantidad la que tiene un resultado beneficioso para el paciente. La eficacia se puede medir de manera convencional, según la afección a tratar. Por ejemplo, en enfermedades oftálmicas u oculares caracterizadas por células que expresan C3, la eficacia puede medirse al determinar las tasas de respuesta, por ejemplo, restauración de la visión o al evaluar el tiempo de retraso hasta la progresión de la enfermedad.

[00115] El término "tratamiento" y “terapia” y similares, como se usan en la presente, incluyen medidas terapéuticas, así como profilácticas o supresoras para una enfermedad o trastorno que conduce a cualquier efecto clínicamente deseable o beneficioso, que incluye, entre otros, el alivio de uno o más síntomas, regresión, ralentización o cese de la progresión de la enfermedad o trastorno. Así, por ejemplo, el término tratamiento incluye la administración de un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este antes o después del inicio de un síntoma de una enfermedad o trastorno, con lo que se previene o elimina uno o más signos de la enfermedad o trastorno. Como otro ejemplo, el término incluye la administración de un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión 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-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este después del inicio y después de que se hayan desarrollado los síntomas clínicos cuando la administración afecta los parámetros clínicos de la enfermedad o trastorno, independientemente de que el tratamiento conduzca o no a la mejora de la enfermedad, comprende "tratamiento" o “terapia” como se usa en la presente. Además, siempre 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 de anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este, el resultado debe considerarse un tratamiento eficaz del trastorno subyacente independientemente de si todos los síntomas del trastorno se alivian o no.

[00116] El término "prospecto" se usa para referirse a instrucciones que habitualmente se incluyen en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información acerca de las indicaciones, el uso, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias relacionadas con el uso de tales productos terapéuticos.

[00117] **Anticuerpo de la invención**

[00118] En una forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este. En una forma de realización particular, la invención proporciona un anticuerpo anti-C3 humanizado o un fragmento de unión al antígeno de este. En una forma de realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti-C3 monoclonal humanizado o un fragmento de unión al antígeno de este.

[00119] En una caracterización inicial, se generó una colección de anticuerpos que se dirigen a C3, en particular, scFv que se dirigen a C3. Los inventores humanizaron y optimizaron estos scFv, como se ilustra en el **Ejemplo 4**. Además, procedieron a un diseño por ingeniería genética adicional de las CDR y las FR con diferentes alteraciones, con el fin de mejorar la afinidad y optimizar el aminoácido poco frecuente en el anticuerpo humano. A través de diversas y exhaustivas etapas de optimización, los inventores desarrollaron moléculas terapéuticas muy prometedoras, en particular, scFv humanizados dirigidos contra C3 con propiedades mejoradas como se divulga en la presente.

[00120] Las secuencias de las CDR de los anticuerpos de la invención se muestran en la Tabla 1 a continuación. La Tabla 1 muestra las CDR de acuerdo con la

nomenclatura de Kabat.

[00121] **Tabla 1:**

Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CDR-H1	NYAMN	1
CDR-H2	VISYDGSNKYYADSVKG	2
CDR-H2	IINVGGGTNYADSVKG	15
CDR-H3	AVGYHHARLDP	3
CDR-L1	TLSSAHKTYTID	4
CDR-L2	LKSDGSYTKGS	5
CDR-L2	LKSEGSYTKGS	18
CDR-L3	GTEGVGGYV	6

[00122] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que comprende una cadena pesada variable (VH) y una cadena liviana variable (VL),

- en donde la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 15, una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y
- en donde la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 y 18, y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6.

[00123] En una forma de realización particular, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que comprende una cadena pesada variable (VH) y una cadena liviana variable (VL), en donde la VH comprende: una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 2 o 15 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 15, y/o una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % o al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y/o en donde la VL comprende: una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 5 o 18 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 18, y/o una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % o al menos 85 % idéntica a la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

[00124] En una forma de realización particular, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este

- en donde la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6, o
- en donde la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6,
- en donde la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6, o
- en donde la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3 y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6.

[00125] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión 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 de SEQ ID NO: 20, 22 o 24; y/o
- 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: 21, 23 o 25.
-

[00126] En aun otra forma de realización, la presente invención proporciona un

anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión 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 de SEQ ID NO: 20, 22 o 24; 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: 21, 23 o 25;

en donde:

- la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 15, una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y
- la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 y 18, y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6.

[00127] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión 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 de SEQ ID NO: 20; 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: 21;

en donde:

- la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6.

[00128] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión 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 de SEQ ID NO: 22; 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: 23;

en donde:

- la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6.

[00129] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión 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 de SEQ ID NO: 24; 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: 25;

en donde:

- la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6.

[00130] En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que comprende: una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, 22 o 24; y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, 23 o 25.

[00131] En otra forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión 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: 20 y SEQ ID NO: 21, respectivamente;
b. una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23, respectivamente; o
c. una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,

respectivamente.

[00132] En aun otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que comprende:

a. una cadena pesada variable que comprende, preferentemente que consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y una cadena liviana variable que comprende, preferentemente que consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, en donde dicho anticuerpo se denomina "**Clon I**",

b. una cadena pesada variable que comprende, preferentemente que consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una cadena liviana variable que comprende, preferentemente que consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, en donde dicho anticuerpo se denomina "**Clon II**";

c. una cadena pesada variable que comprende, preferentemente que consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y una cadena liviana variable que comprende, preferentemente que consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, en donde dicho anticuerpo se denomina "**Clon III**".

[00133] La siguiente tabla muestra las CDR de anticuerpos de acuerdo con la invención, de acuerdo con diferentes nomenclaturas conocidas, tales como de acuerdo con Kabat; de acuerdo con el CCG (Chemical Computing Group como se ilustra en Almagro *et al.*, Proteins 2011; 79:3050-3066 y Maier *et al*, Proteins 2014; 82:1599-1610); de acuerdo con Chothia; y/o de acuerdo con Aho.

[00134] La Tabla 2 resume además las secuencias de aminoácidos de las CDR de los anticuerpos de acuerdo con la invención.

[00135] **Tabla 2:**

Clon	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Nomenclatura	SEQ ID NO:
Clon I	CDR-H1	NYAMN	Kabat	1
	CDR-H2	VISYDGSNKYYADSVKG	Kabat	2
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	Kabat	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	Kabat	4
	CDR-L2	LKSDGSYTKGS	Kabat	5
	CDR-L3	GTEGVGGYV	Kabat	6
	CDR-H1	GFTFSNYAMN	CCG	7
	CDR-H2	VISYDGSNKYYADSVKG	CCG	2
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	CCG	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	CCG	4
	CDR-L2	LKSDGSYTKGS	CCG	5
	CDR-L3	GTEGVGGYV	CCG	6

Clon	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Nomenclatura	SEQ ID NO:
	CDR-H1	GFTFSNY	Chothia	8
	CDR-H2	SYDGSN	Chothia	9
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	Chothia	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	Chothia	4
	CDR-L2	LKSDGSYTKGS	Chothia	5
	CDR-L3	GTEGVGGYV	Chothia	6
	CDR-H1	GFTFSNYA	Aho	10
	CDR-H2	ISYDGSNK	Aho	11
	CDR-H3	ARAVGYHHARLDP	Aho	12
	CDR-L1	SAHKTYT	Aho	13
	CDR-L2	LKSDGSY	Aho	14
	CDR-L3	GTEGVGGYV	Aho	6
Clon II	CDR-H1	NYAMN	Kabat	1
	CDR-H2	IINVGGGTNYADSVKG	Kabat	15
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	Kabat	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	Kabat	4
	CDR-L2	LKSDGSYTKGS	Kabat	5
	CDR-L3	GTEGVGGYV	Kabat	6
	CDR-H1	GFTFSNYAMN	CCG	7
	CDR-H2	IINVGGGTNYADSVKG	CCG	15
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	CCG	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	CCG	4
	CDR-L2	LKSDGSYTKGS	CCG	5
	CDR-L3	GTEGVGGYV	CCG	6
	CDR-H1	GFTFSNY	Chothia	8
	CDR-H2	NVGGG	Chothia	16
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	Chothia	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	Chothia	4
	CDR-L2	LKSDGSYTKGS	Chothia	5
	CDR-L3	GTEGVGGYV	Chothia	6
	CDR-H1	GFTFSNYA	Aho	10
	CDR-H2	INVGGGT	Aho	17
	CDR-H3	ARAVGYHHARLDP	Aho	12
	CDR-L1	SAHKTYT	Aho	13
	CDR-L2	LKSDGSY	Aho	14
	CDR-L3	GTEGVGGYV	Aho	6
Clon III	CDR-H1	NYAMN	Kabat	1
	CDR-H2	IINVGGGTNYADSVKG	Kabat	15
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	Kabat	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	Kabat	4
	CDR-L2	LKSEGSYTKGS	Kabat	18
	CDR-L3	GTEGVGGYV	Kabat	6
	CDR-H1	GFTFSNYAMN	CCG	7
	CDR-H2	IINVGGGTNYADSVKG	CCG	15
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	CCG	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	CCG	4
	CDR-L2	LKSEGSYTKGS	CCG	18
	CDR-L3	GTEGVGGYV	CCG	6
	CDR-H1	GFTFSNY	Chothia	8
	CDR-H2	NVGGG	Chothia	16
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	Chothia	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	Chothia	4
	CDR-L2	LKSEGSYTKGS	Chothia	18

Clon	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Nomenclatura	SEQ ID NO:
	CDR-L3	GTEGVGGYV	Chothia	6
	CDR-H1	GFTFSNYA	Aho	10
	CDR-H2	INVGGGT	Aho	17
	CDR-H3	ARAVGYHHARLDP	Aho	12
	CDR-L1	SAHKTYT	Aho	13
	CDR-L2	LKSEGSY	Aho	19
	CDR-L3	GTEGVGGYV	Aho	6

[00136] Por lo tanto, en un aspecto específico, la invención se refiere a un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que comprende una cadena pesada variable (VH) y una cadena liviana variable (VL),

- en donde la VH comprende una CDR-H1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 8 y 10, una secuencia de CDR-H2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 9, 11, 15, 16 y 17, una secuencia de CDR-H3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 y 12; y
- en donde la VL comprende una secuencia de CDR-L1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y 13, una secuencia de CDR-L2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 14, 18 y 19, y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6.

[00137] En un aspecto particular, la invención se refiere a un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que comprende una cadena pesada variable (VH) y una cadena liviana variable (VL),

- en donde la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 7, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6, o
- en donde la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 8, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 9 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6, o
- en donde la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 10, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 11 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 12; y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 13, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 14 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6, o

- en donde la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 7, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6, o
- en donde la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 8, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 16 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6, o
- en donde la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 10, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 17 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 12; y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 13, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 14 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6, o
- en donde la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 7, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6, o
- en donde la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 8, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 16 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6, o
- en donde la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 10, una secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 17 y una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 12; y la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 13, una secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 19 y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6.

[00138] Las secuencias de cadenas pesadas variables y cadenas livianas variables de ejemplo de acuerdo con la invención se muestran en la Tabla 3.

[00139] **Tabla 3:**

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
VH - Clon I	QVQLVESGGGSVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTASYYCARAVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	20
VL - Clon I	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEKCPR YLMQLKSDGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADY YCGTEGVGGYVFGGGTKLTVLG	21
VH - Clon II	QVQLVESGGGSVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGK GLEWVAIINVGGGTNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTASYYCARAVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	22
VL - Clon II	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEKCPR YLMQLKSDGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADY YCGTEGVGGYVFGGGTKLTVLG	23
VH - Clon III	QVQLVESGGGSVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGK GLEWVAIINVGGGTNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTASYYCARAVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	24
VL - Clon III	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEKCPR YLMQLKSEGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADY YCGTEGVGGYVFGGGTKLTVLG	25

[00140] Las secuencias de scFv de ejemplo de la invención se muestran en la Tabla 4.

[00141] **Tabla 4**

Nombre	secuencia	SEQ ID NO:
Clon I	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEKCPRYL MQLKSDGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADYYCGT EGVGGYVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV ESGGGSVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVAV ISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTASYYCA RAVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	26
Clon I	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEKCPRY LMQLKSDGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADYYCG TEGVGGYVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV ESGGGSVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVAV ISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTASYYCA RAVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	27
Clon II	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEKCPRYL MQLKSDGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADYYCGT EGVGGYVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV ESGGGSVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVAII NVGGGTNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTASYYCAR AVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	28
Clon II	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEKCPRY LMQLKSDGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADYYCG TEGVGGYVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV ESGGGSVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVAII NVGGGTNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTASYYCAR AVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	29

Clon III	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEKCPRYL MQLKSEGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADYYCGT EGVGGYVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV ESGGGSVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVAII NVGGGTNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTASYYCAR AVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	30
Clon III	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEKCPRY LMQLKSEGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADYYCG TEGVGGYVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV ESGGGSVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVAII NVGGGTNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTASYYCAR AVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	31

[00142] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de la invención se selecciona del grupo que consiste en un fragmento variable monocatenario (scFv), un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento Fv, un diacuerpo, un mimético de anticuerpo pequeño. En una forma de realización alternativa, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este se selecciona de los grupos que consisten en un anticuerpo de dominio único, tal como un sdAb, un sdFv, un nanocuerpo, un V-Nar y un VHH. En esta forma de realización particular, dicho anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una cadena pesada variable. En una forma de realización adicional, dicha cadena pesada variable comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 15, una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3. En otra forma de realización específica, dicha cadena pesada variable comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, 22 o 24.

[00143] En una forma de realización, el anticuerpo de la invención es un fragmento monocatenario que comprende un ligador, preferentemente que comprende el ligador establecido en SEQ ID NO: 46 (GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS).

[00144] En una forma de realización, el anticuerpo de la invención es un fragmento monocatenario que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30 y 31.

[00145] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es capaz de inhibir las vías de activación del complemento, incluso la vía clásica (CP), la vía de la lectina (LP) y la vía alternativa (AP).

[00146] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es capaz de unirse al complemento C3 y C3b.

[00147] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es capaz de evitar la formación de C3 convertasa.

[00148] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es capaz de penetrar la membrana de Bruch.

[00149] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención tiene una afinidad de unión aproximadamente equivalente con C3 y C3b.

[00150] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención tiene una afinidad de unión con C3a, iC3b, C4, C4b, C5 y/o C5b de alrededor de 10^{-4} M o menor (es decir, más débil).

[00151] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención tiene una afinidad de unión más débil con C3a, iC3b, C4, C4b, C5 y/o C5b en comparación con la afinidad de unión con C3 y C3b.

[00152] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención no tiene afinidad de unión con C3a, iC3b, C4, C4b, C5 y/o C5b.

[00153] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es capaz de inhibir el bucle de amplificación de la C3 convertasa.

[00154] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es capaz de inhibir la actividad de C3 coroidal.

[00155] El anticuerpo anti-C3 de la invención o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se une con alta afinidad a C3 humano. En una forma de realización relacionada con este aspecto, el anticuerpo anti-C3 de la presente invención se une a C3 humano a una K_D <50 nM, preferentemente a una K_D <15 nM, preferentemente a una K_D <10 nM, preferentemente a una K_D <7 nM, preferentemente a una K_D <1 nM, preferentemente a una K_D <0,5 nM, preferentemente a una K_D <0,2 nM, preferentemente a una K_D <0,15 nM, preferentemente a una K_D <0,10 nM, preferentemente a una K_D <0,05 nM, preferentemente a una K_D <0,04 nM, con mayor preferencia a una K_D <0,03 nM, por ejemplo, según se determina mediante SPR. En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 de la presente invención se

une a C3 humano a una K_D comprendida entre 0,16 y 0,023 nM, como se ejemplifica en el **Ejemplo 8**.

[00156] En una forma de realización particular, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se une a C3b humano a una K_D <50 nM, preferentemente a una K_D <15 nM, preferentemente a una K_D <10 nM, preferentemente a una K_D <7 nM, preferentemente a una K_D <1 nM, preferentemente a una K_D <0,5 nM, preferentemente a una K_D <0,2 nM, preferentemente a una K_D <0,15 nM, preferentemente a una K_D <0,10 nM, con mayor preferencia a una K_D <0,05 nM, por ejemplo, según se determina mediante SPR. En una forma de realización adicional, el anticuerpo anti-C3 de la presente invención se une a C3 humano a una K_D comprendida entre 0,15 nM y 0,05 nM, como se ejemplifica en el **Ejemplo 8**.

[00157] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención tiene una afinidad de unión con C3 y C3b de alrededor de 10^{-8} M a alrededor de 10^{-14} M. En ciertas formas de realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención tiene una afinidad de unión con C3 y C3b de alrededor de 10^{-10} M a alrededor de 10^{-12} M. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-C3 de la invención tienen una afinidad de unión con C3 y C3b de al menos (más fuerte que) alrededor de 10^{-8} M, al menos (más fuerte que) alrededor de 10^{-9} M, al menos (más fuerte que) alrededor de 10^{-10} M, al menos (más fuerte que) alrededor de 10^{-11} M o al menos (más fuerte que) alrededor de 10^{-12} M. En una forma de realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención tiene una afinidad de unión aproximadamente equivalente con C3 y C3b. Por ejemplo, pero de ninguna manera limitativo, el anticuerpo de acuerdo con la invención puede tener una afinidad de unión con C3 de alrededor de 10^{-10} M y una afinidad de unión con C3b de alrededor de 10^{-10} M. En una forma de realización particular, el anticuerpo de acuerdo con la invención tiene una afinidad de unión con C3 de alrededor de 10^{-11} M y una afinidad de unión con C3b de alrededor de 10^{-11} M. En otra forma de realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención tiene una afinidad de unión con C3 de alrededor de 10^{-12} M y una afinidad de unión con C3b de alrededor de 10^{-12} M.

[00158] En una forma de realización alternativa, la afinidad de unión con C3 está dentro de un factor de 10 de la afinidad de unión con C3b.

[00159] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención muestra reactividad cruzada con C3 de *Macaca fascicularis*. Los inventores demostraron en el **Ejemplo 8** que los

anticuerpos de la invención también se unen a C3 de *Macaca fascicularis*. El C3 de *Macaca fascicularis* es 95,1 % idéntico al C3 humano y la reactividad cruzada permite las pruebas preclínicas y toxicológicas de los anticuerpos anti-C3 de la invención en un modelo animal relevante.

[00160] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención tiene una afinidad de unión con el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) relevante para la enfermedad de C3, más precisamente SNP de C3 P314L y SNP de C3 R102G. Los inventores también demostraron en el **Ejemplo 8** que el anticuerpo de la invención se une a SNP de C3 humano relevante para la enfermedad, lo que garantiza que los anticuerpos de la invención pueden tratar una amplia variedad de pacientes que padecen enfermedades oftálmicas o oculares.

[00161] La alta afinidad de unión del anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención contribuye a prolongar el tiempo de neutralización de C3 tras la inyección intravítrea y permite además una frecuencia de inyección reducida. Una mayor afinidad de unión permite además la administración de una dosis más baja, lo que limita los posibles efectos secundarios. La afinidad de unión ventajosa y la frecuencia de inyección reducida mejoran considerablemente la eficacia del tratamiento de los pacientes que lo necesitan.

[00162] Debido a su alta afinidad de unión, su semivida ventajosa y su capacidad para estar altamente concentrado, el anticuerpo anti-C3 de la invención permite un mayor intervalo entre dosis. También proporciona valiosos beneficios para el paciente, especialmente una mejor observancia y cumplimiento del fármaco.

[00163] El anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención puede tener una duración terapéuticamente eficaz mayor de 1 mes, que puede ser una duración mayor en comparación con otros agentes terapéuticos. La mayor duración terapéuticamente eficaz puede deberse a la concentración molar de los anticuerpos anti-C3 o los fragmentos de unión al antígeno de estos de la invención, que puede alcanzar hasta 7 mM.

[00164] El anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se puede inyectar más fácilmente en el ojo en comparación con otros agentes terapéuticos. En una forma de realización, los anticuerpos anti-C3 de la invención no contienen PEG, lo que reduce su viscosidad, como se ilustra en el **Ejemplo 13**. Por lo tanto, se espera que la viscosidad de los anticuerpos anti-C3 de la invención sea menor que la de otros agentes terapéuticos. Las soluciones de

viscosidad reducida, tales como las soluciones que son menores o iguales a 20 centipoises (cP), se inyectan más fácilmente en el ojo debido a una contrapresión reducida.

[00165] Los inventores demostraron que los anticuerpos anti-C3 o los fragmentos de unión al antígeno de estos de acuerdo con la invención presentan características farmacéuticas excelentes, como se ilustra mediante una estabilidad mejorada. De hecho, los inventores demostraron en el **Ejemplo 11** que el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención muestra una estabilidad térmica mejorada. Estos resultados ilustran que el anticuerpo de la invención permanece en su conformación nativa y activa a temperatura fisiológica. Cabe destacar que un punto medio de transición térmica (T_m) más alto refleja una estabilidad mejorada de una proteína a temperaturas más bajas. Por lo tanto, los inventores demostraron que el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención muestra una propiedad de estabilidad térmica mejorada que contribuye a una eficacia terapéutica mejorada al tiempo que permite una dosis y frecuencia de inyección reducidas para los pacientes. Además, un T_m indica una mayor vida útil y una mejor estabilidad en el tiempo del producto terapéutico.

[00166] En un aspecto adicional, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención demostró tener un bajo riesgo de inmunogenicidad como se describe en los **Ejemplos 4 y 12**. Estos resultados confirman que los anticuerpos de la invención son altamente adecuados y prometedores para el tratamiento de enfermedades oftálmicas u oculares, ya que presentan bajos riesgos de inmunogenicidad y/o bajo riesgo de desarrollar anticuerpos antifármaco (ADA).

[00167] El sistema del complemento es una parte importante del sistema inmunitario innato que participa en la lesión tisular en una serie de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. El sistema del complemento incluye más de 30 proteínas circulantes y asociadas a células (por ejemplo, C1, C1q, C1r, C1s, C2, C3, C3a, C3b, C4, factor B, factor D, factor H, factor I).

[00168] Existen tres vías principales que activan el complemento, la vía clásica (CP), la vía de la lectina (LP) y la vía alternativa (AP).

[00169] Las tres vías del complemento son iniciadas por diferentes factores, cada uno de los cuales da como resultado la escisión del componente C3 del complemento.

[00170] La vía clásica generalmente se desencadena por la interacción del antígeno y el anticuerpo específico del isotipo o subclase correcto; la inmunoglobulina M (IgM), IgG3 e IgG1 son los activadores más eficaces de la vía clásica. Esto induce un cambio conformacional en el complejo C1, lo que le permite escindir C4 y C2 para generar el complejo C4bC2b. C4bC2b actúa como la C3 convertasa de la vía clásica.

[00171] La vía del complemento de la lectina se desencadena por la unión de una lectina tipo C, lectina de unión a manano (MBL, también conocida como lectina de unión a manosa) o una serie de proteínas relacionadas denominadas ficolinas (L-ficolina, H-ficolina y M-ficolina), a los azúcares terminales expresados en glicoproteínas o polisacáridos de la envoltura que se encuentran en la superficie de microorganismos.

[00172] La vía alternativa se inicia mediante la hidrólisis lenta del C3 circulante, que expone un grupo tioéster interno, un fenómeno denominado "activación al ralentí (*tickover*) de C3". La unión de las proteínas específicas de la vía alternativa factor B, factor D y properdina a C3 hidrolizado o al fragmento de escisión del complemento C3b conduce a una mayor activación de C3. El C3 escindido en forma de C3b luego puede interactuar con polisacáridos o proteínas en la superficie de microorganismos o endotoxinas (lipopolisacáridos bacterianos) para iniciar la activación de la vía alternativa y generar el MAC, como ocurre durante la activación de la vía clásica.

[00173] En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-C3 o los fragmentos de unión al antígeno de estos de acuerdo con la invención se seleccionan por su capacidad para inhibir una o más vías del complemento, la vía clásica, la vía alternativa y la vía de la lectina. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-C3 de la invención se seleccionan por su capacidad para inhibir las tres vías del complemento, la vía clásica, la vía alternativa y la vía de la lectina. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es capaz de inhibir las tres vías del complemento en el ojo.

[00174] Por lo general, la potencia funcional de los anticuerpos anti-C3 o los fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con la invención para inhibir la vía clásica, la vía alternativa y la vía de la lectina puede determinarse mediante un ensayo de inhibición del complemento o ensayo hemolítico como se describe en el **Ejemplo 7**. La potencia se puede expresar en una IC50 (la concentración inhibitoria máxima media). Por lo tanto, en una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de este de acuerdo con la invención

- inhibe la vía clásica (CP) con una potencia comprendida entre 70 y 80 nM,

según se mide mediante un ensayo de inhibición del complemento

- inhibe la vía de la lectina (LP) con una potencia comprendida entre 340 y 360 nM, según se mide mediante un ensayo de inhibición del complemento e
- inhibe la vía alternativa (AP) con una potencia comprendida entre 60 y 70 nM, según se mide mediante un ensayo de inhibición del complemento.

[00175] La capacidad de los anticuerpos anti-C3 o los fragmentos de unión al antígeno de estos de acuerdo con la invención para inhibir las tres vías del complemento mejora además su potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades oftálmicas u oculares. En una forma de realización, la capacidad de los anticuerpos de la invención para inhibir las tres vías del complemento mejora además su potencial terapéutico en el tratamiento de una enfermedad oftálmica u ocular, en particular, AMD o GA. Sin limitarse a la teoría, la inhibición de las tres vías del complemento puede mejorar el potencial terapéutico de los anticuerpos anti-C3 de la invención al evitar que los efectos promotores de la enfermedad de una vía activa compensen las otras vías inactivadas.

[00176] Por lo tanto, en una forma de realización particular, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es capaz de inhibir las tres vías del complemento en la región coroidea del ojo. La región coroidea es una capa que contiene vasos sanguíneos que recubre la parte posterior del ojo y se ubica entre la retina y la esclerótica. La región coroidea se divide en cuatro capas, la capa de Haller, la capa de Sattler, la coriocapilar y la membrana de Bruch. La membrana de Bruch, también conocida como lámina vítrea, es la capa más interna de la coroides y es adyacente al epitelio pigmentario de la retina (RPE). En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-C3 de la invención son capaces de penetrar o difundirse a través de la membrana de Bruch y entrar en otras capas de la coroides, tales como, entre otras, la coriocapilar.

[00177] La retina tiene barreras físicas sustanciales que pueden impedir que las moléculas grandes, tales como las inmunoglobulinas de longitud completa, penetren en capas más profundas, lo que puede dar como resultado efectos terapéuticos reducidos (Jackson *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44(5): 2141-6). Por el contrario, los derivados de anticuerpos más pequeños pueden penetrar más profundamente en la retina. Los derivados de anticuerpos de ejemplo que tienen un peso molecular de alrededor de 60 kDa o menos son fragmentos de anticuerpos que incluyen, entre otros, un Fab, un fragmento Fab', un scFab, un scFv, un fragmento Fv, un nanocuerpo, un VHH, un dAb, un V-Nar, sdAb, un sdFv y anticuerpos biespecíficos

y bivalentes, tales como un diacuerpo monocatenario (scDb) o un DART. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención tiene un peso molecular de alrededor de 60 kDa o menos, por ejemplo, alrededor de 55 kDa, alrededor de 50 kDa, alrededor de 45 kDa, alrededor de 40 kDa, alrededor de 35 kDa, alrededor de 30 kDa, alrededor de 25 kDa, alrededor de 20 kDa, alrededor de 15 kDa o menos.

[00178] En una forma de realización, el formato scFv permite una frecuencia de dosis de 3 meses. Esto representa una mejora significativa en comparación con el enfoque terapéutico existente para tratar enfermedades oftálmicas u oculares que requiere una administración más frecuente. Por lo tanto, el scFv de la invención mejora sensiblemente el cumplimiento del paciente.

[00179] Los inventores demostraron en el **Ejemplo 10** que el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención (Clon I) muestra una alta capacidad de difusión a través de la membrana de Bruch, en particular cuando se compara con los compuestos comparativos A2 y el Compuesto comparativo A3 como se describe en el Ejemplo 2. Por lo tanto, en una forma de realización, los anticuerpos anti-C3 o los fragmentos de unión al antígeno de estos de acuerdo con la invención son capaces de penetrar o difundirse a través de la membrana de Bruch en parte debido a su tamaño, que es lo suficientemente bajo para facilitar la penetración. En ciertas formas de realización, el tamaño de los anticuerpos de la invención se mide mediante peso molecular. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-C3 o los fragmentos de unión al antígeno de estos de acuerdo con la invención tienen un peso molecular que es menor de alrededor de 60 kDa. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-C3 de la invención son de alrededor de 20 kDa a alrededor de 30 kDa o de alrededor de 10 kDa a alrededor de 20 kDa. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-C3 de la invención son de alrededor de 25 kDa. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-C3 de la invención son de alrededor de 15 kDa. En ciertas formas de realización, el tamaño de los anticuerpos anti-C3 o los fragmentos de unión al antígeno de estos de acuerdo con la invención se mide mediante su radio hidrodinámico. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-C3 de la invención tienen un radio hidrodinámico menor o igual a alrededor de 3,0 nm. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-C3 de la invención tienen un radio hidrodinámico menor o igual a alrededor de 2,5 nm. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención tiene un radio hidrodinámico menor o igual a

alrededor de 2,0 nm.

[00180] **Humanización y variantes de secuencias de aminoácidos**

[00181] Se pueden diseñar por ingeniería genética variantes adicionales de anticuerpos anti-C3 y fragmentos de anticuerpos en función del conjunto de CDR identificadas bajo las secuencias representadas en SEQ ID NO: 1 a 6, 15 y 18. Debe entenderse que, en algunas formas de realización, en dicha variante de los anticuerpos anti-C3 y fragmentos de anticuerpos, la secuencia de aminoácidos de las CDR permanece sin cambios, pero las regiones circundantes, por ejemplo, las regiones FR, pueden diseñarse por ingeniería genética. Las variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-C3 o fragmentos de este se pueden preparar al introducir cambios de nucleótidos adecuados en el ADN del anticuerpo anti-C3 o mediante síntesis de péptidos. Tales variantes incluyen, por ejemplo, eliminaciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-C3 o fragmentos de estos de los ejemplos en la presente. Se realiza cualquier combinación de eliminaciones, inserciones y sustituciones para llegar al 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-C3 humanizado o de su variante o el fragmento de unión al antígeno de este, tal como el cambio de la cantidad o la posición de los sitios de glicosilación.

[00182] Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo implica la alteración del patrón de glicosilación original del anticuerpo. El término "alterar" en este contexto significa eliminar una o más porciones carbohidrato que se encuentran en el anticuerpo y/o agregar uno o más sitios de glicosilación que no estaban presentes previamente en el anticuerpo.

[00183] En algunos aspectos, la presente invención incluye moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-C3 o los fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente. Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-C3 o el fragmento de este se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, entre otros, el aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos naturales) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo anti-C3 o el

fragmento de unión al antígeno de este.

[00184] En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-C3 de la invención es un fragmento de anticuerpo. Existen técnicas que se desarrollaron para la producción de fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos pueden derivarse mediante la 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). Alternativamente, los fragmentos se pueden producir directamente en células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de E. coli y acoplarse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (ver, por ejemplo, Carter *et al.*, 1992, Bio/Technology 10:163-167). Mediante otro enfoque, los fragmentos $F(ab')_2$ pueden aislarse directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para la persona del oficio de nivel medio.

[00185] Los anticuerpos anti-C3 y los fragmentos de unión al antígeno de estos pueden incluir modificaciones. Las variantes de los anticuerpos proporcionados en la presente pueden generarse mediante la introducción de eliminaciones, sustituciones, adiciones y/o modificaciones en el marco y/o en las CDR. Luego, las variantes de anticuerpos pueden evaluarse para determinar la función deseada mediante el uso de los métodos descritos en la presente. Se puede realizar cualquier combinación de eliminaciones, sustituciones, adiciones, modificaciones e inserciones en la proteína de unión al antígeno o el fragmento de esta, siempre que la variante generada posea las características deseadas para las que se puede cribar mediante el uso de los métodos adecuados.

[00186] Como se usa en la presente, una "sustitución conservadora" se refiere a una modificación que mantiene las propiedades funcionales del anticuerpo parental. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos conservadoras incluyen aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares. Por ejemplo, sustitución de alanina (A) por valina (V); sustitución de arginina (R) por lisina (K); sustitución de asparagina (N) por glutamina (Q); sustitución de ácido aspártico (D) por ácido glutámico (E); sustitución de cisteína (C) por serina (S); sustitución de ácido glutámico (E) por ácido aspártico (D); sustitución de glicina (G) por alanina (A); sustitución de histidina (H) por arginina (R) o lisina (K); sustitución de isoleucina (I) por leucina (L); sustitución de metionina (M) por leucina (L); sustitución de fenilalanina (F) por tirosina (Y); sustitución de serina (S) por treonina (T); sustitución de triptófano (W) por tirosina (Y); sustitución de fenilalanina (F)

por triptófano (W); y/o sustitución de valina (V) por leucina (L) y viceversa.

[00187] En ciertas formas de realización, puede ser deseable usar un fragmento de anticuerpo anti-C3, en lugar de un anticuerpo intacto. Puede ser deseable modificar el fragmento de anticuerpo para aumentar su semivida en suero. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítopo de unión al receptor de rescate en el fragmento de anticuerpo. En un método, la región adecuada del fragmento de anticuerpo se puede alterar (por ejemplo, mutar), o el epítopo se puede incorporar en una etiqueta de péptido que luego se fusiona con el fragmento de anticuerpo en cualquiera de los extremos o en el medio, por ejemplo, mediante síntesis de ADN o péptidos. Ver, por ejemplo, WO 96/32478.

[00188] En otras formas de realización, la presente invención incluye modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-C3 o los fragmentos de unión al antígeno de estos. Las modificaciones covalentes incluyen la modificación de residuos cisteinilo, residuos histidilo, residuos lisinilo y del terminal amino, residuos arginilo, residuos tirosilo, grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo), residuos glutaminilo y asparaginilo, o residuos serilo o treonilo. Otro tipo de modificación covalente implica el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al anticuerpo. Tales modificaciones pueden realizarse mediante síntesis química o mediante escisión enzimática o química del anticuerpo o fragmento de este, si corresponde. Se pueden introducir otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo en la molécula al hacer reaccionar residuos de aminoácidos diana del anticuerpo o fragmento de este con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos del terminal amino o carboxi.

[00189] La eliminación de cualquier porción carbohidrato presente en el anticuerpo o fragmento de este puede realizarse química o enzimáticamente. La desglicosilación química está descrita por Hakimuddin *et al.*, 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge *et al.*, 1981, Anal. Biochem., 118:131. La escisión enzimática de porciones carbohidrato en anticuerpos puede lograrse mediante el uso de una variedad de endoglicosidasas y exoglicosidasas como describen Thotakura *et al.*, 1987, Meth. Enzymol 138:350.

[00190] Otro tipo de modificación covalente útil comprende ligar el anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera establecida en una o más de la patente estadounidense N.° 4.640.835; la patente estadounidense N.° 4.496.689; la patente estadounidense N.° 4.301.144; la patente estadounidense N.° 4.670.417; la

patente estadounidense N.° 4.791.192 y la patente estadounidense N.° 4.179.337.

[00191] La variante de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrita en la presente, tales como las variantes que comprenden una secuencia que tiene un cierto nivel de % de identidad con las secuencias divulgadas en la presente, preferentemente retiene una capacidad funcional de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos anteriormente, por ejemplo, unión al epítopo C3 específico, ser capaz de inhibir las vías de activación del complemento, incluso la vía clásica (CP), la vía de la lectina (LP) y la vía alternativa (AP), ser capaz de unirse al complemento C3 y C3b, ser capaz de evitar la formación de C3 convertasa y/o ser capaz de penetrar la membrana de Bruch.

[00192] **Unión al epítopo**

[00193] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este que reconoce un "epítopo C3" específico. Como se usa en la presente, la expresión "epítopo C3" se refiere a una molécula (por ejemplo, un péptido) o un fragmento de una molécula capaz de unirse a un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este. Esta expresión incluye además, por ejemplo, un determinante antigénico C3 reconocido por cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la presente invención.

[00194] Los epítopos del antígeno C3 se pueden incluir en proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos o similares. Los epítopos son más comúnmente proteínas, oligopéptidos cortos, imitadores de oligopéptidos (es decir, compuestos orgánicos que imitan las propiedades de unión al anticuerpo del antígeno C3) o combinaciones de estos.

[00195] En el contexto de la unión al epítopo, la frase "se une dentro de las regiones de aminoácidos X-Y..." significa que el anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se une a al menos un residuo de aminoácido dentro de la región de aminoácidos especificada en la secuencia.

[00196] El anticuerpo o los fragmentos de unión al antígeno de la presente invención se unen a un epítopo del complemento C3 humano como se establece en SEQ ID NO: 47. En una forma de realización, el anticuerpo de la invención se une a un epítopo de la cadena D del complemento C3c humano como se establece en SEQ ID NO: 48. SEQ ID NO: 48 está disponible en línea bajo la referencia PDB: 2A74_D.

[00197] El anticuerpo o los fragmentos de unión al antígeno de la presente invención se unen a un epítopo del complemento C3 humano como se establece en SEQ ID NO: 47. En otra forma de realización, el anticuerpo de la invención se une a un

epítopo de la cadena D del complemento C3c humano como se establece en SEQ ID NO: 48. SEQ ID NO: 48 está disponible en línea bajo la referencia PDB: 2A74_D.

[00198] Se descubrió que el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se une a un epítopo único del complemento C3 humano. En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de la presente invención se une a al menos un residuo de aminoácido dentro de los residuos del aminoácido 366 al aminoácido 478 del complemento C3 humano como se establece en SEQ ID NO: 47.

[00199] En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que se une a al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los residuos 366, 392-396, 413-421, 425, 427, 442, 453 y 478 del complemento C3 humano como se establece en SEQ ID NO: 47.

[00200] En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que se une a todos los residuos 366, 392-396, 413-421, 425, 427, 442, 453 y 478 del complemento C3 humano como se establece en SEQ ID NO: 47. En una forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que se une a al menos un residuo de aminoácido dentro de los residuos del aminoácido 344 al aminoácido 456 de la cadena D del complemento C3c humano como se establece en SEQ ID NO: 48.

[00201] En una forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que se une a al menos un residuo seleccionado del grupo que consiste en los residuos 344, 370-374, 391-399, 403, 405, 420, 431 y 456 de la cadena D del complemento C3c humano como se establece en SEQ ID NO: 48.

[00202] En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de la invención se une a todos los residuos 344, 370-374, 391-399, 403, 405, 420, 431 y 456 de la cadena D del complemento C3c humano como se establece en SEQ ID NO: 48.

[00203] En una forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que se une a al menos un residuo de aminoácido dentro de los residuos del aminoácido 369 al aminoácido 418 de la cadena D del complemento C3c humano como se establece en SEQ ID NO: 48.

[00204] En otra forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo

anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que se une a al menos un residuo seleccionado del grupo que consiste en los residuos 369 a 379, 389, 391 a 401, 403 y 418 de la cadena D del complemento C3c humano como se establece en SEQ ID NO: 48.

[00205] En otra forma de realización, el anticuerpo de la invención se une a todos los residuos 369 a 379, 389, 391 a 401, 403 y 418 de la cadena D del complemento C3c humano como se establece en SEQ ID NO: 48.

[00206] Las secuencias SEQ ID NO: 47 y 48 se muestran en la Tabla 5 a continuación.

[00207] **Tabla 5:**

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
C3 humano	MGPTSGPSLLLLLLTHLPLALGSPMYSIITPNILRLESEETMVLEAHDAQG DVPVTVTVHDFPGKKLVLSSEKTVLTPATNHMGNVTFTIPANREFKSEKG RNKFVTVQATFGTQVVEKVVLVSLQSGYLFIQTDKTIYTPGSTVLYRIFTV NHKLLPVGRTVMVNIENPEGIPVKQDSLSSQNQLGVLPLSWDIPELVNM GQWKIRAYYENSPQQVFSTEFEVKEYVLPSFEVIVEPTEKFYYIYNEKGL EVTITARFLYGKKVEGTAFVIFGIQDGEQRISLPESLKRIPIEDGSGEVVLS RKVLLDGVQNPRAEDLVGKSLYVSATVILHSGSDMVQAERSGIPIVTSPY QIHFTKTPKYFKPGMPFDLMVFVTNPDGSPAYRVPVAVQGEDTVQSLTQ GDGVAKLSINTHPSQKPLSITVRTKKQELSEAEQATRTMQALPYSTVGN SNNYLHLSVLRTELRPGETLNVNFLLRMDRAHEAKIRYYTYLIMNKGRLL KAGRQVREPGQDLVVLPLSITTDFIPSFRLVAYYTLIGASGQREVVADSV WVDVKDSCVGSLVVKSGQSEDRQPVPGQQMTLKIEGDHGARVVLVAV DKGVFVLNKKNKLTQSKIWDVVEKADIGCTPGSGKDYAGVFSDAGLTFT SSSGQQTAQRAELQCPQPAARRRRSVQLTEKRMDKVGKYPKELRKCC EDGMRENPMRFSCQRRTRFISLGEACKKVFLDCCNYITELRRQHARASH LGLARSNLDEDIIAEENIVSRSEFPESWLWNVEDLKEPPKNGISTKLMNIF LKDSITTWEILAVSMSDKKGICVADPFEVTVMQDFFIDLRLPYSVVRNEQ VEIRAVLYNYRQNQELKVRVELLHNPAFCSLATTKRRHQQTVTIPPKSSL SVPYVIVPLKTGLQEVEVKAAVYHHFISDGVRKSLKVVPEGIRMNKTVAV RTLDPERLGREGVQKEDIPPADLSDQVPDTESETRILLQGTPVAQMTED AVDAERLKHLIVTPSGCGEQNMIGMTPTVIAVHYLDETEQWEKFGLEKR QGALELIKKGYTQQLAFRQPSSAFAAFVKRAPSTWLTAYVVKVFSLAVNL IAIDSQVLCGAVKWLILEKQKPDGVFQEDAPVIHQEMIGGLRNNNEKDMA LTAFVLISLQEAKDICEEQVNSLPGSITKAGDFLEANYMNLQRSYTVAIAG YALAQMGRLKGPLLNKFLTTAKDKNRWEDPGKQLYNVEATSYALLALLQ LKDFDFVPPVVRWLNEQRYYGGGYGSTQATFMVFQALAQYQKDAPDH QELNLDVSLQLPSRSSKITHRIHWESASLLRSEETKENEGFTVTAEGKGQ GTLSVVTMYHAKAKDQLTCNKFDLKVTIKPAPETEKRPQDAKNTMILEIC TRYRGDQDATMSILDISMMTGFAPDTDDLKQLANGVDRYISKYELDKAF SDRNTLIIYLDKVSHSEDDCLAFKVHQYFNVELIQPGAVKVYAYYNLEES CTRFYHPEKEDGKLNKLCRDELCRCAEENCFIQKSDDKVTLEERLDKAC EPGVDYVYKTRLVKVQLSNDFDEYIMAIEQTIKSGSDEVQVGQQRTFISPI KCREALKLEEKKHYLMWGLSSDFWGEKPNLSYIIGKDTWVEHWPEEDE CQDEENQKQCQDLGAFTESMVVFGCPN	47
Complemento C3c del componente 1 de	SPMYSIITPNILRLESEETMVLEAHDAQGDVPVTVTVHDFPGKKLVLSSE KTVLTPATNHMGNVTFTIPANREFKSEKGRNKFVTVQATFGTQVVEKVV LVSLQSGYLFIQTDKTIYTPGSTVLYRIFTVNHKLLPVGRTVMVNIENPEGI PVKQDSLSSQNQLGVLPLSWDIPELVNMGQWKIRAYYENSPQQVFSTE FEVKEYVLPSFEVIVEPTEKFYYIYNEKGLEVTITARFLYGKKVEGTAFVIF	48

plasma humano (cadena D)	GIQDGEQRISLPESLKRIPIEDGSGEVVLSRKVLLDGVQNLRAEDLVGKS LYVSATVILHSGSDMVQAERSGIPIVTSPYQIHFTKTPKYFKPGMPFDLM VFVTNPDGSPAYRVPVAVQGEDTVQSLTQGDGVAKLSINTHPSQKPLSI TVRTKKQELSEAEQATRTMQALPYSTVGNSNNYLHLSVLRTELRPGETL NVNFLLRMDRAHEAKIRYYTYLIMNKGRLLKAGRQVREPGQDLVVLPLSI TTDFIPSFRLVAYYTLIGASGQREVVADSVWVDVKDSCVGSLVVKSGQS EDRQPVPGQQMTLKIEGDHGARVVLVAVDKGVFVLNKKNKLTQSKIWD VVEKADIGCTPGSGKDYAGVFSDAGLTFTSSSGQQTAQRAELQCPQP	

[00208] Es muy probable que la unión al epítopo C3 específico dé como resultado propiedades funcionales inesperadas de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos de la presente invención, por ejemplo, alta afinidad de unión a C3 y C3b, y una potente inhibición de las tres vías de activación del complemento, incluso la vía clásica (CP), la vía de la lectina (LP) y la vía alternativa (AP).

[00209] **Usos terapéuticos**

[00210] En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este para su uso como un medicamento.

[00211] Como se mencionó anteriormente, los inventores ahora demostraron que la neutralización de C3 en la retina bloqueará el bucle de amplificación de todas las vías del complemento y, por lo tanto, reduce la generación del complejo de ataque a la membrana tóxico celular y la generación de los componentes proinflamatorios del complemento (C3a, C3b, iC3b, C5a), lo que mejora el resultado clínico de los pacientes que padecen atrofia geográfica.

[00212] En consecuencia, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad ocular o de la retina.

[00213] En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad oftálmica u ocular. En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en retinopatía, retinopatía proliferativa (PR), tal como retinopatía de la prematuridad, retinopatía isquémica, retinopatía diabética (DR), incluso retinopatía diabética proliferativa (PDR) y retinopatía diabética no proliferativa, edema macular diabético (DME), isquemia macular diabética (DMI), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), incluso AMD seca y AMD húmeda, atrofia geográfica (GA), retinosis pigmentaria, distrofia retiniana hereditaria, degeneración

miope, oclusiones venosas de la retina, oclusiones de las arterias de la retina, endoftalmitis, uveítis, edema macular cistoide, membrana neovascular coroidea secundaria a cualquier enfermedad de la retina, neuropatías ópticas, glaucoma, desprendimiento de la retina, retinopatía tóxica, retinopatía por radiación, retinopatía traumática, vasculopatía retiniana inducida por fármacos, neovascularización retiniana, vasculopatía coroidea polipoidea, vasculitis retiniana, microaneurisma retiniano, fibroplasia retrolental, coriorretinitis, distrofia de Fuch, telangiectasia macular, síndrome de Usher, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH) y enfermedad de Stargardt.

[00214] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad, atrofia geográfica, glaucoma neovascular y retinopatía diabética. En aun una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este para su uso en el tratamiento o la prevención de la atrofia geográfica.

[00215] En una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un scFv anti-C3 para su uso en el tratamiento de la atrofia geográfica, en donde dicho scFv anti-C3 comprende una cadena pesada variable (VH) y una cadena liviana variable (VL), en donde la VH comprende una secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR-H2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 15, una secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 3; y en donde la VL comprende una secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 y 18, y una secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 6. En una forma de realización particular, dicho scFv anti-C3 comprende una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21, respectivamente. En otra forma de realización particular, dicho scFv anti-C3 comprende una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23, respectivamente. En una forma de realización particular adicional, dicho scFv anti-C3 comprende una cadena pesada variable y una cadena liviana variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25, respectivamente.

[00216] Los inventores ilustraron que el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención muestra propiedades más

ventajosas que otros "compuestos comparativos" que se dirigen a C3 mencionados en el estado de la técnica y descritos en el **Ejemplo 5**.

[00217] El anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención difiere de los enfoques terapéuticos basados en APL2, NGM621 y ZIMURA®.

[00218] APL-2 o pegcetacoplán es un derivado pegilado del tridecapéptido cíclico compstatina (inhibidor del componente C3 del complemento). El componente activo de APL-2 es APL-1. Los inventores desarrollaron compuestos sustitutos (Compuesto comparativo A1 y Compuesto comparativo A2) con fines comparativos como se ilustra en el **Ejemplo 5A**.

[00219] APL-2 tiene un gran peso molecular equivalente a 350 kDa y un radio hidrodinámico de alrededor de 7,8 nm, lo que dificulta su penetración profunda en la retina. APL-2 solo tiene una duración eficaz de 1 mes, posiblemente debido a una baja concentración de 3,5 mM. APL-2 también es una molécula PEGilada, lo que aumenta su viscosidad y puede dificultar su inyección en el ojo. En consecuencia, existe la necesidad de reducir la progresión de la GA de manera más eficiente.

[00220] NGM621 es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado que se une con potencia al complemento C3 (C3) e inhibe la activación del complemento. Los inventores desarrollaron este compuesto con fines comparativos como se ilustra en el **Ejemplo 5B**. Se describió que NGM621 es capaz de inhibir las vías clásica y alternativa.

[00221] ZIMURA® (o avacincaptad pegol) está diseñado para inhibir la escisión del factor C5 del complemento en C5a y C5b. ZIMURA® no se une a C3.

[00222] Los inventores ilustraron en el **Ejemplo 6B** que el formato de los anticuerpos anti-C3 o los fragmentos de unión al antígeno de estos de acuerdo con la invención mejora la cantidad de moléculas de fármaco administradas en el ojo por inyección intravítrea. De hecho, se ilustra que el formato scFv puede administrar una mayor cantidad de fármaco por inyección IVT, en comparación con los otros compuestos. Esto confirma que el formato scFv puede lograr una mayor inhibición del complemento, lo que potencia el efecto terapéutico. Además, los inventores demostraron que el formato scFv permite una mejor penetración en la retina tras la inyección IVT, en comparación con Fab o IgG.

[00223] Los inventores compararon la potencia del anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención en comparación con, entre otros, un derivado de compstatina, tal como el Compuesto comparativo A1,

y una IgG dirigida contra C3, tal como el Compuesto comparativo A3 como se ilustra en el **Ejemplo 7**. Los inventores demostraron que los anticuerpos de la invención inhiben las vías clásica, alternativa y de la lectina con mayor potencia en comparación con el Compuesto comparativo A1 y el Compuesto comparativo A3. Además, evaluaron que los anticuerpos o los fragmentos de estos de ejemplo de la invención son más potentes para inhibir la CP y la LP en comparación con el Compuesto comparativo A1. También demostraron que la potencia en la inhibición de la AP mejora en el ensayo de hemólisis en comparación con el Compuesto comparativo A1.

[00224] Los inventores también ejemplificaron la afinidad de unión del anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención en comparación con compuestos existentes, tales como un derivado de compstatina, tal como el Compuesto comparativo A1, y una IgG dirigida contra C3, tal como el Compuesto comparativo A3 en el **Ejemplo 8**. La alta afinidad de unión de los anticuerpos de ejemplo contribuye a prolongar el tiempo de neutralización de C3 tras la inyección intravítrea y permite además una frecuencia de inyección reducida. La afinidad de unión mejorada y la frecuencia de inyección reducida mejoran considerablemente la eficacia del tratamiento de los pacientes. También proporciona valiosos beneficios para el paciente, especialmente una mejor observancia y cumplimiento del fármaco.

[00225] Además, los inventores demostraron que los anticuerpos anti-C3 o los fragmentos de unión al antígeno de estos de acuerdo con la invención se unen con mayor afinidad a C3 y C3b humanos en comparación con un derivado de compstatina, tal como el Compuesto comparativo A1, y una IgG dirigida contra C3, tal como el Compuesto comparativo A3, lo que permite una inhibición más potente de C3. En comparación con el Compuesto comparativo A3, los anticuerpos de la invención se unen con mayor afinidad a C3b y, por lo tanto, bloquearán la generación de C3b en el bucle de amplificación de C3, así como la actividad de C3b y C3b ya depositados generados por vías de activación alternativas.

[00226] Los inventores también demostraron en el **Ejemplo 8** que el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se une al polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) de C3 humano relevante para la enfermedad, lo que garantiza que los anticuerpos de la invención pueden tratar una amplia variedad de pacientes que padecen enfermedades oftálmicas u oculares. Los inventores demostraron además que dicha afinidad de unión mejora, en comparación con la afinidad de unión del Compuesto comparativo A1 a dicho SNP de C3 humano.

[00227] Los inventores ilustraron en el **Ejemplo 10** que el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención permite una permeabilidad mejorada a través de la membrana de Bruch, mientras que el Compuesto comparativo A2 y ZIMURA® no muestran penetración y el Compuesto comparativo A3 muestra solo una penetración reducida. Como la mayor parte de la actividad del complemento se encuentra en el RPE/la membrana de Bruch/el área de CC, la excelente penetración y difusión tisular a través de la membrana de Bruch es esencial para el enfoque terapéutico de inhibición de la vía de C3.

[00228] Por último, los anticuerpos anti-C3 o los fragmentos de unión al antígeno de estos de acuerdo con la invención inhiben todos los efectores del complemento con alta afinidad y potencia, como se ilustra en el **Ejemplo 7**. Esto conduce a la inhibición del bucle de amplificación de C3 en todas las vías, así como a la actividad del C3b ya formado y del C3b generado por la activación "al ralentí (*tickover*)" de C3. El resultado es una inhibición total de todas las vías de activación del complemento y de todas las funciones efectoras del complemento.

[00229] En conclusión, los inventores desarrollaron, por lo tanto, una estrategia terapéutica muy prometedora para el tratamiento de pacientes que padecen de GA y demostraron la superioridad de los anticuerpos anti-C3 o los fragmentos de unión al antígeno de estos de acuerdo con la invención en comparación con los Compuestos comparativos A2 y el Compuesto comparativo A3. De hecho, los inventores demostraron que el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención:

- permite una mejor administración del fármaco por inyección intravítrea (**Ejemplo 6B**) y muestra una mejor penetración en la retina tras la inyección intravítrea equimolar debido, entre otras cosas, a su formato;
- tiene una duración terapéuticamente eficaz mejorada debido, entre otras cosas, a su formato, lo que garantiza una frecuencia de dosis mejorada y una mejor observancia del paciente;
- tiene una mejor penetración en el tejido diana (**Ejemplo 10**) y tiene la capacidad de penetrar el RPE y la membrana de Bruch, lo que mejora su potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades oftálmicas u oculares;
- tiene una potencia mejorada y un bloqueo del complemento más eficaz, lo que confirma que el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención inhibe todas las funciones efectoras del complemento, con alta afinidad y potencia (**Ejemplos 7 y 8**);

- tiene una afinidad de unión mejorada a C3, lo que contribuye a prolongar el tiempo de neutralización de C3 tras la inyección intravítrea y permite además una frecuencia de inyección reducida (**Ejemplo 8**);
- tiene una afinidad de unión mejorada a C3b, en particular, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se une a C3 y C3b con una afinidad similar, lo que asegura una inhibición de la generación de C3b en el bucle de amplificación de C3 (**Ejemplo 8**); y
- tiene una afinidad de unión mejorada a SNP de C3 humano relevante para la enfermedad, lo que garantiza que los anticuerpos de la invención pueden tratar una amplia variedad de pacientes que padecen enfermedades oftálmicas u oculares (**Ejemplo 8**);
- muestra una estabilidad mejorada (**Ejemplos 11 y 13**); y
- tiene un riesgo de inmunogenicidad bajo (**Ejemplos 4 y 12**).

[00230] Además, en una forma de realización particular de la invención, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este no está PEGilado. En esta forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención muestra una reducción del riesgo de inducir la neovascularización como se observó en los ensayos clínicos divulgados con respecto al compuesto comparativo, tal como ZIMURA® o APL-2.

[00231] En general, los anticuerpos de la invención demostraron ser un tratamiento muy eficaz, con la mayor duración del efecto, un fármaco molar mejorado, la mejor observancia posible por parte de los pacientes y la mejor eficacia retiniana en la AMD húmeda, en particular en la GA.

[00232] En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[00233] El anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este se administra por cualquier medio adecuado, incluso intravítreo, oral, parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo anti-C3 se administra adecuadamente mediante infusión de pulsos, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. En un aspecto, la dosis se administra mediante inyecciones, con máxima preferencia inyecciones intravenosas o subcutáneas, que dependen en parte de si la administración es breve o crónica. En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3

se administra a través de una inyección intravítrea en el ojo.

[00234] Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosis adecuada de anticuerpo dependerá de una variedad de factores, tales como el tipo de enfermedad a tratar, como se definió anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, el tratamiento anterior, los antecedentes médicos del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico a cargo. El anticuerpo se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

[00235] En algunas formas de realización, el rango de dosis de los anticuerpos de la invención aplicable por inyección suele ser de 1 mg/ojo a 20 mg/ojo, o entre 5 mg/ojo y 20 mg/ojo, o entre 10 mg/ojo y 15 mg/ojo o alrededor de 15 mg/ojo.

[00236] El término "supresión" se usa en la presente en el mismo contexto que "mejora" y "alivio" para significar una reducción o disminución de una o más características de la enfermedad.

[00237] La composición de anticuerpo se formulará, dosificará y administrará de manera compatible con las buenas prácticas médicas. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el cronograma de administración y otros factores conocidos por los profesionales médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo a administrar se regirá por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar las enfermedades oftálmicas u oculares abordadas por el anticuerpo de la invención.

[00238] No es necesario que el anticuerpo se formule, pero opcionalmente se formula con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de esos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo anti-C3 presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan generalmente en las mismas dosis y con las mismas vías de administración que las usadas anteriormente o alrededor de 1 a 99 % de las dosis empleadas hasta ahora.

[00239] En un aspecto específico, la invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico y al menos un agente terapéutico adicional.

[00240] **Método de tratamiento**

[00241] En otro aspecto, la invención también abarca cualquier método para tratar o prevenir una enfermedad oftálmica u ocular en un paciente que lo necesite, en donde dicho método comprende la administración de un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este de la invención.

[00242] En algunas formas de realización, la invención se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad oftálmica u ocular que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención. En una forma de realización, tal enfermedad se selecciona del grupo que consiste en retinopatía, retinopatía proliferativa (PR), tal como retinopatía de la prematuridad, retinopatía isquémica, retinopatía diabética (DR), incluso retinopatía diabética proliferativa (PDR) y retinopatía diabética no proliferativa, edema macular diabético (DME), isquemia macular diabética (DMI), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), incluso AMD seca y AMD húmeda, atrofia geográfica (GA), retinosis pigmentaria, distrofia retiniana hereditaria, degeneración miope, oclusiones venosas de la retina, oclusiones de las arterias de la retina, endoftalmitis, uveítis, edema macular cistoide, membrana neovascular coroidea secundaria a cualquier enfermedad de la retina, neuropatías ópticas, glaucoma, desprendimiento de la retina, retinopatía tóxica, retinopatía por radiación, retinopatía traumática, vasculopatía retiniana inducida por fármacos, neovascularización retiniana, vasculopatía coroidea polipoidea, vasculitis retiniana, microaneurisma retiniano, fibroplasia retrolental, coriorretinitis, distrofia de Fuch, telangiectasia macular, síndrome de Usher, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH) y enfermedad de Stargardt.

[00243] Todas las características técnicas divulgadas descritas en la presente son aplicables a dicho método de tratamiento.

[00244] **Composiciones farmacéuticas y administración de estas**

[00245] Una composición que comprende un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este se puede administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad oftálmica u ocular. La invención proporciona además el uso de un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este en la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad relacionada con C3. El término "sujeto", como se usa en la presente, significa cualquier paciente mamífero al que se le puede administrar un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este, 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 mediante el uso de los métodos descritos en la presente incluyen los seres humanos. El anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este se puede administrar solo o en combinación con otras composiciones.

[00246] Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar el anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este. Los métodos de introducción incluyen, entre otros, las vías intravítrea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral, y gotas oftálmicas. El anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión 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 realización preferidas, la administración es mediante inyección intravítrea. Las formulaciones para tales inyecciones se pueden preparar, por ejemplo, en jeringas precargadas.

[00247] En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-C3 o los fragmentos de unión al antígeno de estos de acuerdo con la invención se administran por vía intraocular. La administración de compuestos terapéuticos a las diferentes estructuras del ojo, tales como la retina, es un desafío. Los desafíos incluyen, entre otros, varias barreras oculares restrictivas, mecanismos de lágrima, que incluyen el parpadeo y el lavado de los compuestos administrados, volúmenes de inyección locales limitados, biodisponibilidad local limitada y baja tolerancia a impurezas y contaminantes (ver, por ejemplo, Patel *et al*. World J Pharmacol. 2013; 2(2): 47-64; Morrison *et al*. Ther. Deliv. 2014; 5(12): 1297-1315). Los anticuerpos de la invención pueden superar estos desafíos. Los anticuerpos de la invención tienen preferentemente un peso molecular de alrededor de 60 kDa o menos, preferentemente alrededor de 25 kDa. Los ejemplos de proteínas de unión al antígeno de alrededor de 60 kDa o menos incluyen, entre otros, fragmentos scFv, VHH y Fab. Los ejemplos de proteínas de unión al antígeno de alrededor de 25 kDa o menos incluyen, entre otros, fragmentos scFv y VHH. El tamaño más pequeño del scFv permite la administración de más compuestos terapéuticos por inyección. Esto permite altas concentraciones de los anticuerpos al ojo. El tamaño más pequeño de los anticuerpos de la invención, en particular los scFv, también puede mejorar su penetración en los tejidos relevantes para la enfermedad, es decir, la región coroidea del ojo. Los anticuerpos de la invención son capaces de penetrar una o más capas de la región coroidea, incluso la capa de Haller, la capa de Sattler, la coriocapilar y la membrana de Bruch, por lo que

se dirigen al complemento C3 y C3b dentro de esas capas de la región coroidea.

[00248] En ciertas formas de realización, la administración intraocular se logra con un dispositivo de administración de fármacos, tal como un dispositivo de administración de fármacos supracoroideo o un dispositivo de administración de fármacos subretiniano. Los procedimientos de administración supracoroidea implican la administración de un fármaco en el espacio supracoroideo del ojo, y normalmente se realizan con un dispositivo de administración de fármacos supracoroideo, tal como un microinyector con una microaguja (ver, por ejemplo, Hariprasad, Retinal Physician; 2016; 13: 20-23); Goldstein, 2014, Retina Today 9(5): 82-87; cada uno de los cuales se incorpora por referencia en la presente en su totalidad).

[00249] En ciertas formas de realización, la administración intraocular se logra a través de una vía intravítrea. La administración intravítrea a menudo se realiza con una jeringa y una aguja de calibre 27 a calibre 30 (ver, por ejemplo, Jiang *et al*. *supra*).

[00250] Si bien todas estas formas de administración están claramente contempladas dentro del alcance de la presente invención, una forma de administración sería una solución para inyección, en particular, para inyección intravítrea. Normalmente, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un amortiguador (por ejemplo, amortiguador de acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato), opcionalmente un agente estabilizador (por ejemplo, albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros métodos compatibles con las enseñanzas en la presente, los anticuerpos de la invención se pueden administrar directamente en el sitio de la población celular adversa, lo que aumenta la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

[00251] En formas de realización alternativas, la composición farmacéutica se puede formular de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa o subcutánea a seres humanos. Por lo general, las composiciones para la administración mediante inyección son soluciones en amortiguador acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición farmacéutica también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lignocaína, para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o mezclados en forma de dosis 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 indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición farmacéutica deba administrarse mediante infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contenga

solución salina o agua estéril de grado farmacéutico. Cuando la composición farmacéutica se administre mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, de modo que los ingredientes se mezclen antes de la administración.

[00252] Además, la composición farmacéutica se puede proporcionar como un kit farmacéutico que comprende (a) un recipiente que contiene un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención en forma liofilizada y (b) un segundo recipiente que contiene un diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico (por ejemplo, agua estéril) para inyección. El diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico se puede usar para la reconstitución o la dilución del anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este liofilizado. Asociado opcionalmente con tales recipientes puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la elaboración, el uso o la venta de composiciones farmacéuticas o productos biológicos, aviso que refleja la aprobación de la agencia de la elaboración, el uso o la venta para su administración en seres humanos.

[00253] La cantidad del anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención que es eficaz en el tratamiento o la prevención de una enfermedad oftálmica u ocular se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. Además, opcionalmente, se pueden emplear ensayos *in vitro* para ayudar a identificar 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 a partir de curvas de respuesta a la dosis derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o en modelos animales.

[00254] Por ejemplo, la toxicidad y la eficacia terapéutica del anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se pueden determinar en cultivos celulares o en animales de experimentación mediante procedimientos farmacéuticos estándar para determinar la ED_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en 50 % de la población). Se prefiere un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este que exhiba un gran índice terapéutico.

[00255] Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y los estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosis para su uso en seres humanos. La dosis del anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este se encuentra normalmente dentro de un rango de concentraciones circulantes que

incluyen la ED_{50} con toxicidad baja o nula. 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-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este usado en el método, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración en plasma circulante que incluya la IC_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición máxima media de los síntomas), según se determina en un cultivo celular. Tal información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución, ELISA y similares.

[00256] Para la inyección intravítrea del anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención generalmente se prefieren intervalos más largos entre tratamientos. Debido a su potencia mejorada, el anticuerpo anti-C3 de la presente invención se puede administrar por intervalos más prolongados.

[00257] En una forma de realización, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención 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 aun una forma de realización preferida, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se administra una vez cada 3 meses.

[00258] Dado que el volumen que se puede administrar al ojo está estrictamente limitado, es muy importante que el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se pueda formular en concentraciones altas. Además, la potencia del anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención es de gran importancia ya que un potente anticuerpo puede ejercer su efecto incluso en dosis más bajas y, por lo tanto, prolongar la actividad y también los intervalos entre tratamientos.

[00259] 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, 100 mg/ml, 110 mg/ml, 120 mg/ml, 130 mg/m, 140 mg/ml, 150 mg/ml, 160 mg/ml, 170 mg/ml, 180 mg/ml, 190 mg/ml, 200 mg/ml. Preferentemente, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se puede formular en una formulación líquida con

una concentración que comprende entre 90 mg/ml y 180 mg/ml, con mayor preferencia entre 130 mg/ml y 160 mg/ml. Preferentemente, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se puede formular en una formulación líquida de alrededor de 150 mg/ml.

[00260] Una dosis típica que se puede administrar a un paciente es de alrededor de entre 2,5 mg/ojo y 20 mg/ojo, o entre 7,5 mg/ojo y 15 mg/ojo. En una forma de realización particular, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se puede administrar a un paciente a una concentración de 7,5 mg por ojo. En otra forma de realización particular, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se puede administrar a un paciente a una concentración de 15 mg por ojo. Los componentes amortiguadores típicos que se pueden usar para tal formulación comprenden, por ejemplo, acetato de sodio, PS20 y dihidrato de trehalosa.

[00261] En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este pueden comprender además un agente terapéutico, ya sea conjugado o no conjugado con el agente de unión.

[00262] Con respecto a los regímenes terapéuticos para la administración conjunta, en una forma de realización específica, el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este se administra de manera concurrente con un agente terapéutico. En otra forma de realización específica, el agente terapéutico se administra antes o después de la administración del anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este, durante al menos una hora y hasta varios meses, por ejemplo, al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes o tres meses, antes o después de la administración del anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este.

[00263] **Polinucleótidos, vectores, células huésped y métodos recombinantes**

[00264] En un aspecto, la presente invención abarca polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia que codifica el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención, 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-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este, incluso, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa, fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv,

diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[00265] Los polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se pueden fusionar con una o más secuencias reguladoras o de control, como se conoce en la técnica, y pueden estar contenidos en vectores de expresión adecuados o células huésped como se conoce en la técnica. Cada una de las moléculas de polinucleótidos que codifican los dominios variables de la cadena liviana o pesada se puede fusionar de manera independiente con una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio constante, tal como un dominio constante humano, lo que permite la producción de anticuerpos intactos. Alternativamente, los polinucleótidos, o porciones de estos, se pueden fusionar entre sí y proporcionar una plantilla para la producción de un anticuerpo monocatenario.

[00266] Para la producción recombinante, se inserta un polinucleótido que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Están disponibles muchos vectores adecuados para expresar el anticuerpo recombinante. Los componentes del vector generalmente incluyen, entre otros, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

[00267] El anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención también se puede producir como polipéptidos de fusión, en los que dicho anticuerpo o fragmento de este 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 de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia de señal heteróloga seleccionada es generalmente una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa de señal) por la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no reconocen ni procesan la secuencia de señal del anticuerpo anti-C3, la secuencia de señal se puede sustituir por una secuencia de señal procariota. La secuencia de señal puede ser, por ejemplo, fosfatasa alcalina, penicilinasa, lipoproteína, líderes de enterotoxina II termoestable y similares. Para la secreción de levadura, la secuencia de señal nativa se puede sustituir, por ejemplo, con una secuencia líder obtenida del factor alfa de la invertasa de levadura (incluso los 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 secuencias de señal de mamífero, así como líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN para tal región precursora se liga en el marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo anti-C3 humanizado o el fragmento de unión al antígeno de este.

[00268] 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. Generalmente, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Tales secuencias son conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas, el origen del plásmido 2-□□ es adecuado para la levadura y diversos orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV y BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el origen del componente de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamífero (el origen SV40 por lo general se puede usar solo porque contiene el promotor temprano).

[00269] 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 típicos codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, o alternativamente, 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 la D-alanina racemasa para Bacilli.

[00270] Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que les confiere resistencia a los fármacos y, por lo tanto, sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de tal selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina. Los marcadores seleccionables comunes para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para absorber un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-C3 humanizado, tal como DHFR (dihidrofolato reductasa), timidina quinasa, metalotioneína-I y -II (tal como genes de metalotioneína de primates), adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa y similares. Las células transformadas

con el gen de selección DHFR se identifican primero al cultivar todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped adecuada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) con deficiencia de actividad de DHFR (por ejemplo, DG44).

[00271] Alternativamente, las células huésped (particularmente, los huéspedes de tipo silvestre que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican el anticuerpo anti-C3, la proteína DHFR de tipo silvestre y otro marcador seleccionable, tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH), pueden seleccionarse mediante crecimiento celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.° 4.965.199.

[00272] Cuando la producción recombinante se realiza en una célula de levadura como célula huésped, se puede usar el gen TRP1 presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al*., 1979, Nature 282:39) como un marcador seleccionable. El gen TRP1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N.° 44076 o PEP4-1 (Jones, 1977, Genetics 85:12). La presencia de la lesión de trp1 en el genoma de la célula huésped de levadura entonces proporciona un entorno eficaz para detectar la transformación mediante el crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura con deficiencia de Leu2p, tales como ATCC 20.622 y 38.626, se complementan con plásmidos conocidos que portan el gen LEU2.

[00273] Además, los vectores derivados del plásmido pKD1 circular de 1,6 µm se pueden usar para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, se informó un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis (*Van den Berg, 1990, Bio/Technology 8:135). También se han divulgado 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).

[00274] Los vectores de expresión y clonación normalmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está ligado operativamente a la molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-C3 o una cadena polipeptídica de este. Los promotores adecuados para su uso con huéspedes

procariotas incluyen promotor phoA, sistemas promotores de β-lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, sistema promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos, tales como el promotor tac. También son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) ligada operativamente al ADN que codifica el anticuerpo anti-C3 humanizado.

[00275] Se conocen muchas secuencias de promotores eucariotas. Prácticamente, todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT ubicada aproximadamente de 25 a 30 bases corriente arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia que se encuentra de 70 a 80 bases corriente arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas, hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

[00276] Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores de 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, 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.

[00277] Los promotores inducibles tienen la ventaja adicional de que la transcripción está controlada por las condiciones de crecimiento. Estos incluyen regiones promotoras de levadura para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas derivadas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los mejoradores de levadura también se usan ventajosamente con promotores de levadura.

[00278] La transcripción del anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención de vectores en células huésped de mamífero 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 térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de célula huésped.

[00279] Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos mediante el uso del virus del papiloma bovino como vector se divulga en la patente estadounidense N.° 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente estadounidense N.° 4.601.978. Ver también Reyes *et al*., 1982, Nature 297:598-601, que divulgan la expresión de cADN de interferón p humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. Alternativamente, se puede usar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como el promotor.

[00280] 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 el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención por eucariotas superiores. Actualmente, se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina, α-fetoproteína e insulina). Por lo general, sin embargo, se usa un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (bp 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus. Ver también Yaniv, 1982, Nature 297:17-18 para obtener una descripción de elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede empalmar en el vector en una posición en dirección 5' o 3' con respecto a la secuencia que codifica el anticuerpo anti-C3, pero se ubica preferentemente en un sitio en dirección 5' del promotor.

[00281] Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (levaduras, 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 estabilizar el mARN. Tales secuencias están comúnmente disponibles en las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o cADN eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de

nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del mARN que codifica el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Ver WO94/11026 y el vector de expresión allí divulgado. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-C3 se pueden expresar mediante el uso del sistema CHEF. (Ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.° 5.888.809.

[00282] Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores de la presente son las células procariotas, de levadura o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este fin 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 marcescans*, y *Shigella*, así como también *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis 41 P* divulgado en DD 266.710, publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa y Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli 294* (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas, tales como *E. coli B*, *E. coli X1776* (ATCC 31.537) y *E. coli W3110* (ATCC 27.325). Estos ejemplos son meramente ilustrativos y no limitativos.

[00283] Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos o las levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican anticuerpos anti-C3. Saccharomyces cerevisiae, o levadura de panadería común, es la más usada entre los microorganismos huéspedes eucariotas inferiores. Sin embargo, hay varios géneros, especies y cepas diferentes generalmente disponibles y útiles en la presente, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces*, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastors* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *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*.

[00284] Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-

C3 glicosilado o el fragmento de unión al antígeno de este derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos, incluso, por ejemplo, numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células huésped de insectos permisivas de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori* (gusano de seda). Una variedad de cepas virales para la transfección está disponible para el público, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica NPV* y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori NPV*, y tales virus se pueden usar, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

[00285] También se pueden usar como huéspedes cultivos de células vegetales de algodón, maíz, papa, soja, petunia, tomate y tabaco.

[00286] El anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención también se puede incorporar en vectores virales, es decir, el polinucleótido que codifica el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este se introduce en el vector viral y luego se expresa en el cuerpo del paciente después de la infección con el virus.

[00287] En otro aspecto, la expresión del anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención se lleva a cabo en células de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se convirtió en un procedimiento de rutina y las técnicas están ampliamente disponibles. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero 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 crecimiento en cultivo en suspensión, (Graham *et al*., 1977, J Gen Virol. 36: 59), células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10), células de ovario 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).

[00288] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de un anticuerpo anti-C3 o un fragmento de unión al antígeno de este y se cultivan en medios de nutrientes convencionales modificados según corresponda para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[00289] Las células huésped usadas para producir el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención pueden cultivarse en una variedad de 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 de Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma-Aldrich Co.) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, 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, la patente estadounidense N.° 4.767.704; la patente estadounidense N.° 4.657.866; la patente estadounidense N.° 4.927.762; la patente estadounidense N.° 4.560.655; la patente estadounidense N.° 5.122.469, WO 90/103430 y WO 87/00195 se pueden usar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de 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 presentes generalmente en concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se pueden incluir otros suplementos en concentraciones adecuadas que serían conocidas por las personas del oficio de nivel medio. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las que se usaron anteriormente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para la persona del oficio de nivel medio.

[00290] Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo o fragmento de este se puede producir de manera intracelular, en el espacio periplásmico, o segregarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce de manera intracelular, las células se pueden alterar para liberar proteína como una primera etapa. Los residuos de particulados, ya sean células huésped o fragmentos lisados, se pueden eliminar, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al*., 1992, Bio/Technology 10:163-167 describe un procedimiento para aislar anticuerpos

que se secretan en el espacio periplásmico de E. coli. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante alrededor de 30 minutos. Los residuos de células se pueden eliminar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se segrega en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión en general primero se concentran mediante el uso de un filtro de concentración de proteínas disponible en el comercio, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes accidentales. Se puede usar una variedad de métodos para aislar el anticuerpo de la célula huésped.

[00291] La composición de anticuerpo preparada a partir de las células se puede purificar mediante el uso de, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, en donde la cromatografía de afinidad es una técnica de purificación típica. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté 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 suele ser agarosa, pero existen otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tales como el vidrio poroso controlado o poli(estirendivinil)benceno permiten velocidades 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), cromatoenfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio, según el anticuerpo que se desee recuperar.

[00292] Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo o el fragmento de este de interés y los contaminantes puede

someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo mediante el uso de un amortiguador de elución a un pH de entre alrededor de 2,5-4,5, lo cual se realiza, en general, con bajas concentraciones de sal (por ejemplo, sal a alrededor de 0-0,25 M).

[00293] 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 una porción (por ejemplo, la porción que codifica la región variable) de la secuencia de nucleótidos representada por secuencias de polinucleótidos aislados que codifican el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención.La porción de hibridación del ácido nucleico de hibridación generalmente tiene al menos 15 (por ejemplo, 20, 25, 30 o 50) nucleótidos de longitud. La porción de hibridación del ácido nucleico de hibridación 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-C3 (por ejemplo, una región variable de la cadena pesada o de la cadena liviana), o su complemento. Los ácidos nucleicos de hibridación del tipo descrito en la presente se pueden usar, por ejemplo, como una sonda de clonación, un cebador, por ejemplo, un cebador de PCR o una sonda de diagnóstico.

[00294] En una forma de realización, la presente invención se refiere a un polinucleótido o polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia que codifica una región variable de la cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 24, y una secuencia que codifica una región variable de la cadena liviana establecida en SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 y/o SEQ ID NO: 25.

[00295] Debe entenderse que, en dichos anticuerpos anti-C3 y fragmentos de anticuerpos, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica las CDR permanece sin cambios (sin cambios con respecto al aminoácido que codifican; son posibles equivalentes de la secuencia de ADN debido a la degeneración de los codones), pero las regiones circundantes, por ejemplo, las regiones FR, pueden diseñarse por ingeniería genética.

[00296] **Artículos de elaboración**

[00297] En otro aspecto, se incluye un artículo de elaboración que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de elaboración comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados por 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 que tenga un tapón que se pueda perforar con una aguja de inyección hipodérmica. El agente activo en la composición es el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención. La etiqueta del envase o asociada con este indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. El artículo de elaboración puede comprender además un segundo recipiente que comprende un amortiguador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, tal como solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde los puntos de vista comercial y del usuario, incluso otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

[00298] La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la invención.

EJEMPLOS

[00299] **Ejemplo 1: Mecanismos de C3 y etiología de la atrofia geográfica**

[00300] En pacientes con GA, una mayor activación no controlada del sistema del complemento da como resultado la destrucción de la coriocapilar, el daño de las células del RPE y, finalmente, la pérdida de los fotorreceptores.

[00301] La relevancia de la activación del complemento para la fisiopatología de la enfermedad se basa en los siguientes puntos:

[00302] ***A. Expresión de proteínas del complemento y activación del sistema del complemento en la retina en pacientes con AMD***

[00303] Se descubrió que todas las proteínas de la cascada del complemento se expresaban localmente en diferentes tipos de células en la retina. En los pacientes, los niveles de proteína de varios factores del complemento (por ejemplo, C3, CFB y C5) aumentan en las drusas y lesiones de GA. Además, se descubrió que los niveles elevados de los productos de activación del complemento C3a, C4a, C3d, CBb eran mayores en el humor acuoso y el plasma de los pacientes con AMD. La tinción inmunohistoquímica para el complejo de ataque a la membrana (MAC) muestra un aumento del depósito en la membrana de Bruch, la capa de RPE y la coriocapilar cerca de las lesiones de GA en los pacientes.

[00304] ***B. Genética de AMD***

[00305] Los estudios GWAS identificaron el polimorfismo Y402H en el factor H del complemento (CFH) como un principal factor de riesgo para desarrollar AMD. Se

encontró un riesgo hasta 7 veces mayor en individuos homocigotos para esta mutación. CFH es el principal regulador negativo del sistema del complemento. Mejora la descomposición de la C3 convertasa C3bBb y regula la degradación proteolítica del C3b ya depositado. El polimorfismo Y402 da como resultado una disminución de la unión de CFH a otras proteínas y se descubrieron niveles elevados de productos de activación del complemento, así como un mayor depósito del MAC en los pacientes homocigotos. Además, los polimorfismos en otros genes del complemento (por ejemplo, CFB, C3, C7, C9) se relacionaron con el desarrollo de AMD.

[00306] ***C. Estudios clínicos con inhibidores del complemento*** Las estrategias terapéuticas existentes, incluso el tratamiento con un inhibidor de C3 (APL-2) y un inhibidor de C5 (ZIMURA®), redujeron el crecimiento de las lesiones de GA en los ensayos clínicos de fase 2. La inhibición de C3 inhibirá el bucle de amplificación de C3 y, por lo tanto, inhibirá las vías alternativa, clásica y de la lectina del sistema del complemento.

[00307] **Ejemplo 2: Generación y caracterización de la colección de anticuerpos anti-C3**

[00308] Para generar los anticuerpos anti-C3, se inmunizan 3 conejos blancos de Nueva Zelanda con proteína C3 humana nativa. Cada animal recibe 4 inyecciones de la proteína C3 en diferentes puntos temporales con adyuvante de Freund completo o incompleto. La respuesta inmunitaria de cada animal se evalúa con un ELISA y los títulos de anticuerpos específicos en los sueros indican excelentes respuestas inmunitarias.

[00309] Las colecciones de cADN de anticuerpos scFv se construyen a partir del ARN extraído de PBMC de conejo aisladas y linfocitos de bazo mediante amplificación por PCR. Las secuencias codificantes para los dominios livianos y pesados variables se amplifican por separado y se ligan a través de una serie de etapas de PCR superpuestas para obtener los productos finales de scFv.

[00310] Las secuencias de ADN amplificadas que codifican los scFv de conejos se digieren mediante el uso de enzimas de restricción adecuadas y se ligan en los vectores fagémidos. Los vectores fagémidos se transforman en células electrocompetentes TG1 de *E. coli* que son muy adecuadas para la generación de colecciones de expresión en fago de anticuerpos.

[00311] **Ejemplo 3: Cribado de anticuerpo anti-C3 que inhibe las tres vías del complemento**

[00312] Para el cribado de anticuerpos anti-C3 con afinidades altas, los scFv

expresados en fagos se someten a varias rondas de biopaneo (selección) contra el C3 humano nativo. La rigurosidad de la selección aumenta con cada ronda, ya sea al disminuir la concentración de la proteína C3 usada en el biopaneo o al aumentar la rigurosidad de los lavados. Aproximadamente se seleccionan y se criban 380 fagos monoclonales por su capacidad para unirse a C3 en ensayos ELISA.

[00313] En función de los datos de ELISA de fago y la huella de ADN, una selección de los scFv expresados se produce de manera recombinante como proteínas de anticuerpos en un formato Fab. Las proteínas resultantes se evalúan con respecto a su capacidad para unirse a C3 y C3b humanos.

[00314] Para identificar los anticuerpos que bloquean las 3 vías del complemento, los anticuerpos se criban mediante un inmunoensayo enzimático para la determinación cualitativa de las vías del complemento funcional clásica, de la lectina y alternativa en suero humano mediante el uso del cribado del sistema del complemento WEISLAB® (Svar Life Science AB, Malmö, Suecia) El Clon IV (SEQ ID NO: 32) se identificó como capaz de inhibir las tres vías del complemento, como se muestra en la Tabla 6.

[00315] **Tabla 6**. Inhibición de la vía del complemento por parte del Clon IV a una dosis única de 2 μM para la formación de MAC dependiente de CP, LP y AP.

Activación del complemento por parte del Clon IV [%]		
Vía clásica	Vía de la lectina	Vía alternativa
2,9 ± 0,0	0,5 ± 0,9	-0,1 ± 0,2

[00316] La secuencia del Clon IV se muestra en la siguiente Tabla 7.

[00317] **Tabla 7:**

Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
Clon IV	QSVKESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLYNYAMNWVRQAPGKGLEWIG IINTDGNTNYASWAKGRFTISTTSSTTVDLKITSPTTEDTATYFCPRAVGY HHHALDPWGPGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGASELVLTQS PSVSAALGASAKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQQGEAPRYLMQLKSDGS YTKGTGVPDRFSGSSSGADRYLIIPSVQADDEADYYCGTDYGGGYVFG GGTQLTVTG	32

[00318] **Ejemplo 4: Campaña de reformateo, humanización y optimización**

[00319] ***Reformateo y humanización:*** Para la humanización de anticuerpos y el reformateo en el formato de fragmento de anticuerpo scFv, las secuencias de CDR del Clon IV derivadas de conejo se injertan en los dominios variable de la cadena liviana (VL) y variable de la cadena pesada (VH) de las secuencias de línea germinal humana. Para la humanización de la VH, las CDR se injertan en el marco

IMGT_hVH_3_30. Para la humanización de la VL, las CDR se injertan en el marco IMGT_hVL_4-69. Los dominios variables se conectan mediante un ligador $(GGGGS)_4$ (SEQ ID NO: 46) de forma VL-ligador-VH. Para el marco 4, se usa la secuencia del gen de unión (J) IGLJ2*01.

[00320] La variante reformateada y humanizada, el Clon V (SEQ ID NO: 33), retiene su capacidad para inhibir las vías clásica y alternativa del complemento, pero muestra una menor afinidad de unión a C3 y C3b que la molécula parental, el Clon IV.

[00321] La variante se modifica adicionalmente al reemplazar aminoácidos derivados de conejo adicionales con secuencias de línea germinal, lo que crea el Clon VI (SEQ ID NO: 34). Su afinidad hacia C3 y C3b humanos fue comparable a la molécula parental y la estabilidad térmica del constructo aumentó en 11,7 °C.

[00322] Las secuencias del Clon V y el Clon VI se resumen en la siguiente Tabla 8.

[00323] **Tabla 8:**

Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
Clon V	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEKGPR YLMQLKSDGSYTKGTGVPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADYY CGTDYGGGYVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQV QVVESGGGSVQPGRSLRLSCAASGFSLYNYAMNWVRQAPGKGLE WIGIINTDGNTNYASWAKGRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTASY YCPRAVGYHHHALDPWGQGTSVTVSS	33
Clon VI	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEKGPR YLMQLKSDGSYTKGTGVPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADYY CGTDYGGGYVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQV QVVESGGGSVQPGRSLRLSCAASGFSLYNYAMNWVRQAPGKGLE WIGIINTDGNTNYASWAKGRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTASY YCARAVGYHHHALDPWGQGTSVTVSS	34

[00324] ***Maduración por afinidad***

[00325] **Construcción de colecciones**: Para mejorar la afinidad de la molécula, se construyen colecciones de saturación del sitio con el Clon VI (SEQ ID NO: 34) como plantilla. Las aleatorizaciones se realizan en las CDR L1, L2, L3 y H3.

[00326] **Biopaneo:** Las colecciones que comprenden aleatorizaciones de cadenas livianas se combinan en una colección. Del mismo modo, las colecciones que comprenden aleatorizaciones de cadenas pesadas se combinan en otra colección. Las colecciones de cadenas livianas y pesadas se someten a biopaneo contra C3 humano. En las rondas dos, tres y cuatro de biopaneo (ROP2-4), se introduce una competencia contra el Clon IV a 50 µg/ml para aumentar la rigurosidad de la selección y permitir la identificación de aglutinantes con mayor afinidad que la molécula parental. Los aciertos identificados a través del ELISA de fago en ROP2-4 se someten a

secuenciación. Los candidatos más prometedores de ROP4 se expresan y se purifican en formato scFv.

[00327] **Caracterización del acierto**: Todos los aciertos identificados en ROP4 comprenden sustituciones de aminoácidos en CDR L3 o CDR H3.

[00328] Todos los aciertos se expresaron y se purificaron con éxito. Las mejores afinidades de unión a C3 y C3b humanos se observaron para el Clon VII (SEQ ID NO: 35), el Clon VIII (SEQ ID NO: 36) y el Clon IX (SEQ ID NO: 37) con afinidades con C3 de 1,1 nM, 184 pM y 1,3 nM, respectivamente.

[00329] El Clon VII y el Clon IX mostraron una afinidad de unión y una actividad de inhibición del complemento comparables a las de la molécula parental del Clon IV. El Clon VIII mostró un aumento de aproximadamente 10 veces en la afinidad de unión a C3 y C3b, y un rendimiento superior en los ensayos de inhibición del complemento, en comparación con el Clon IV.

[00330] Las secuencias de los Clones VII, VIII y XI se resumen en la siguiente Tabla 9.

[00331] **Tabla 9:**

Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
Clon VII	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEKGP RYLMQLKSEGSYTKGTGVPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDSAV YYCGTEGVGGYVFGCGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCAVSGFSLYNYAMNWVRQAPG KCLEWIGIINVGGGTNYASWAKGRFTISTDNSKNTVYLQMNSLRAE DTASYYCARAVGYHHHALDPWGQGTSVTVSS	35
Clon VIII	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEKGP RYLMQLKSEGSYTKGTGVPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDSAV YYCGTEGVGGYVFGCGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCAVSGFSLYNYAMNWVRQAPG KCLEWIGIINVGGGTNYASWAKGRFTISTDNSKNTVYLQMNSLRAE DTASYYCARAVGYHHSRLDPWGQGTSVTVSS	36
Clon IX	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEKGP RYLMQLKSEGSYTKGTGVPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDSAV YYCGTDGVGGYVFGCGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCAVSGFSLYNYAMNWVRQAPG KCLEWIGIINVGGGTNYASWAKGRFTISTDNSKNTVYLQMNSLRAE DTASYYCARAVGYHHHALDPWGQGTSVTVSS	37

[00332] ***Estabilización del scFv***

[00333] La estabilización del scFv se realizó mediante la introducción de un puente disulfuro (VL 43C, VH 105C). Los anticuerpos naturales tienen un puente disulfuro intercatenario conservado entre los dominios CH1 constantes livianos y constantes pesados que estabiliza fuertemente la interacción entre las cadenas livianas y pesadas. La ausencia de este puente disulfuro intercatenario en un scFv

puede conducir a la desestabilización del dominio variable y a la formación de dímeros, trímeros y especies de oligómeros superiores, especialmente cuando se formulan en concentraciones altas. Por lo tanto, la presencia de un puente disulfuro puede estabilizar la interfaz VH/VL de un scFv.

[00334] La estabilidad del marco de la cadena pesada del Clon VI se exploró mediante la introducción de sustituciones de marco, por lo que se creó, entre otras cosas, el Clon X (SEQ ID NO: 38). El Clon X y su variante estabilizada con puente disulfuro, el Clon XI (SEQ ID NO: 39), se compararon en un estudio de estabilidad a 37 °C y una concentración de proteína >100 mg/ml. La incubación de dos semanas del Clon XI a 37 °C dio como resultado una pérdida de pureza monomérica de solo 3,3 %, mientras que la molécula parental, el Clon X, perdió 60,4 % de contenido monomérico (Tabla 10).

[00335] **Tabla 10**: Estabilidad monomérica dependiente de la concentración del Clon XI de scFv estabilizado con puente disulfuro y la molécula parental, el Clon X, a 37 °C.

Parámetro	Clon XI	Clon X
Concentración al inicio	152 mg/ml	100 mg/ml
Contenido monomérico al inicio	99,8 %	99,7 %
Contenido monomérico después de dos semanas a 37 °C	96,5 %	39,3 %

[00336] Las secuencias del Clon X y XI se resumen en la siguiente Tabla 11.

[00337] **Tabla 11:**

Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
Clon X	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEKGP RYLMQLKSDGSYTKGTGVPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEAD YYCGTDYGGGYVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCTVSGFSLYNYAMNWVRQAPGK GLEWIGIINTDGNTNYASWAKGRFTISTDNSKNTVYLQMNSLRAED TASYYCARAVGYHHHALDPWGQGTSVTVSS	38
Clon XI	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEKCP RYLMQLKSDGSYTKGTGVPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEAD YYCGTDYGGGYVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCTVSGFSLYNYAMNWVRQAPGK GLEWIGIINTDGNTNYASWAKGRFTISTDNSKNTVYLQMNSLRAED TASYYCARAVGYHHHALDPWGCGTSVTVSS	39

[00338] ***Optimización final***

[00339] Las sustituciones de maduración por afinidad más prometedoras y la estabilización con puente disulfuro se combinaron en el Clon XII (SEQ ID NO: 40), el Clon XIII (SEQ ID NO: 41) y el Clon XIV (SEQ ID NO: 42).

[00340] La estabilidad térmica y la afinidad con el C3 y el C3b humanos se

determinan mediante los ensayos de DSF y SPR. El Clon XII, el Clon XIII y el Clon XIV presentaron temperaturas de fusión de 70,4 °C, 67,7 °C y 67,2 °C, respectivamente. La afinidad de unión a C3 y C3b humanos fue de 4,7 nM y 4,8 nM para el Clon XII, 116 pM y 110 pM para el Clon XIII, y 129 pM y 116 pM para el Clon XIV, respectivamente.

[00341] También se evalúan el Clon XII, el Clon XIII y el Clon XIV para determinar su actividad en el ensayo de inhibición del complemento. Los valores de IC50 para la inhibición del complemento en la vía clásica fueron de 0,098 μM, 0,06 μM y 0,05 μM para el Clon XII, el Clon XIII y el Clon XIV, respectivamente, mientras que el Clon IV parental mostró una IC50 de 0,08 μM. Los valores de IC50 para la inhibición del complemento en la vía alternativa fueron de 0,21 μM, 0,26 μM y 0,25 μM para el Clon XII, el Clon XIII y el Clon XIV, respectivamente, mientras que el Clon IV mostró una IC50 de 0,28 μM. En conjunto, el Clon XIII y el Clon IV mostraron propiedades funcionales superiores a las del Clon IV. Además, el Clon XIII y el Clon XIV se compararon en el estudio de estabilidad dependiente de la concentración. El Clon XIII se pudo concentrar a 150 mg/ml sin pérdida en el contenido monomérico y solo 2,2 % de pérdida después de 2 semanas de incubación a 37 °C, mientras que el Clon XIV ya perdió 1,6 % de contenido monomérico con concentración a 50 mg/ml y 2,3 % adicional después de una incubación de 2 semanas a 37 °C.

[00342] Las secuencias del Clon XII, el Clon XIII y el Clon XIV se resumen en la siguiente Tabla 12.

[00343] **Tabla 12:**

Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
Clon XII	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEK CPRYLMQLKSEGSYTKGTGVPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSE DEADYYCGTDYGGGYVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCAVSGFSLYNYAMN WVRQAPGKGLEWIGIINVGGGTNYASWAKGRFTISTDNSKNTV YLQMNSLRAEDTASYYCARAVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	40
Clon XIII	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEK CPRYLMQLKSEGSYTKGTGVPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSE DEADYYCGTEGVGGYVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCAVSGFSLYNYAMN WVRQAPGKGLEWIGIINVGGGTNYASWAKGRFTISTDNSKNTV YLQMNSLRAEDTASYYCARAVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	41
Clon XIV	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQQPEK CPRYLMQLKSEGSYTKGTGVPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSE DEADYYCGTEGVGGYVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCAVSGFSLYNYAMN WVRQAPGKGLEWIGIINVGGGTNYASWAKGRFTISTDNSKNTV YLQMNSLRAEDTASYYCARAVGYHHSRLDPWGCGTSVTVSS	42

[00344] **Humanización final**: La predicción del riesgo de inmunogenicidad a

través de EpiVax revela un riesgo intermedio para el Clon X (el constructo parental del Clon XIII). Se determinaron puntuaciones EpiVax de -39,36 y 14,86 para la VH y VL, respectivamente. Además, el Clon XI mostró una identidad de secuencia de línea germinal humana de 77 % para la VH y 87 % para la VL.

[00345] La evolución del Clon IX al Clon XIII comprendió exclusivamente modificaciones de bucle de CDR, por lo que los problemas identificados en las FR del Clon XI permanecieron sin cambios en el Clon XIII. Por lo tanto, se realiza un atravesamiento de la línea germinal adicional en las regiones marco.

[00346] Además, el análisis *in silico* permite la identificación de los residuos que rara vez se encuentran en el repertorio de anticuerpos humanos y, por lo tanto, albergan un mayor riesgo de inmunogenicidad. En consecuencia, para reducir aún más el riesgo de inmunogenicidad, se incluyeron en los candidatos las siguientes mutaciones VH S61D, W62S, A63V, Y30S y VL T56S.

[00347] En la campaña de humanización y optimización final, los inventores crearon el Clon III, que carecía de los motivos de modificación posteriores a la traducción (PTM) críticos, lo humanizaron adicionalmente (identidad de secuencia humana de 86 % y 89 % para la VL y VH, respectivamente) y lo maduraron por afinidad.

[00348] Además, se exploró el motivo de isomerización (DG) en CDR L2, ya que tenía un gran impacto en el rendimiento y la afinidad del replegamiento. Por lo tanto, el Clon III se modificó al introducir la mutación E50D, lo que dio como resultado el Clon II. El Clon II mostró una identidad de secuencia humana de 87 % y 89 % para la VL y VH, respectivamente.

[00349] Se generó una variante adicional del Clon II mediante el intercambio de CDR H2 completa a una secuencia de línea germinal completamente humana (se aumentó la identidad de secuencia humana con la línea germinal humana en un 7 % adicional en la VH), y se creó así el Clon I.

[00350] Por lo tanto, los inventores se aseguraron de que el anti-C3 de la invención no contenga problemas que puedan causar isomerización, desamidación y oxidación. Verificaron además que el anticuerpo anti-C3 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención tiene una viscosidad aceptable, fuerte estabilidad de almacenamiento, alta afinidad hacia C3, C3b, muestra una potencia similar en las vías clásica, alternativa y de la lectina, muestra difusión a través de la membrana de Bruch porcina y no muestra activación significativa de linfocitos T.

[00351] Los anticuerpos de ejemplo de la invención incluyen:

- **Clon I**: que comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO: 20 y una cadena liviana variable de SEQ ID NO: 21;
- **Clon II**: que comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO: 22 y una cadena liviana variable de SEQ ID NO: 23; y
- **Clon III**: que comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO: 24 y una cadena liviana variable de SEQ ID NO: 25.

[00352] **Inmunogenicidad**

[00353] Los inventores evaluaron además la inmunogenicidad del scFv de la invención. Los inventores evaluaron la inmunogenicidad prevista de anticuerpos de ejemplo de acuerdo con la invención: El Clon I, el Clon II y el Clon III.

[00354] Para este fin, los inventores usaron una herramienta *in silico* para predecir tales epítopos de linfocitos T (EpiMatrix desarrollado por EpiVax).

[00355] 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 activamente tolerogénicos en la mayoría de los sujetos. Estos epítopos de linfocitos T altamente conservados, reguladores y promiscuos se conocen como tregítopos (De Groot *et al*. Blood. 15 de octubre de 2008;112(8):3303-11). El potencial inmunogénico de los neoepítopos contenidos en los anticuerpos humanizados se puede controlar de manera eficaz en presencia de cantidades significativas de tregítopos.

[00356] A los efectos del análisis de inmunogenicidad de anticuerpos, EpiVax incluye una puntuación EpiMatrix ajustada por tregítopos y la predicción correspondiente de la respuesta de anticuerpos antiterapéuticos. Para calcular la puntuación EpiMatrix ajustada por tregítopos, las puntuaciones de los tregítopos se deducen de la puntuación de proteínas EpiMatrix. Se demostró que las puntuaciones ajustadas por tregítopos están bien correlacionadas 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).

[00357] Los resultados en la escala EpiMatrix se resumen en la siguiente Tabla 13.

[00358] **Tabla 13:**

Molécula	VH Identidad de secuencia de línea germinal humana [%]	Epivax (VH)	Epivax (VL)	VL Identidad de secuencia de línea germinal humana [%]
Clon I	96	-55	8	87
Clon II	92	-66	8	87
Clon III	88	-66	19	86
Beovu	80	-66	32	88
Lucentis	76	-49	14	87
Avastin	77	-37	-25	88
Lampalizumab	89	-32	-14	78
Eylea	na	na	-16	na

[00359] Las secuencias del anticuerpo de la invención puntúan en el extremo inferior de la escala EpiMatrix, lo que indica que el scFv de la invención tiene un potencial fuertemente limitado de inmunogenicidad. Dicha escala EpiMatrix es conocida por la persona del oficio de nivel medio y se la puede encontrar, entre otros, en la Figura 2 de la publicación Mufarrege *et al*. Clin Immunol., marzo de 2017;176:31-41.

[00360] **Ejemplo 5: Generación de compuestos comparativos**

[00361] ***A. Sustituto de APL-1 y sustituto de APL-2***

[00362] Con fines comparativos, los inventores desarrollaron varios derivados de compstatina, de la siguiente manera:

- un sustituto de APL-1: un derivado de monocompstatina PEGilado (designado en adelante "Compuesto comparativo A1" o "**Compuesto A1**")
- un sustituto de APL-2: un derivado de compstatina dimerizado PEGilado (designado en adelante "Compuesto comparativo A2" o "**Compuesto A2**")

[00363] Estos compuestos se divulgan como APL-1 y APL-2 en la solicitud de patente US20200282012A1. Se divulgan adicionalmente en:

- Ricklin D, Lambris JD. Compstatin: a complement inhibitor on its way to clinical application. Adv Exp Med Biol. 2008;632:273-292. doi:10.1007/978-0-387-78952-1_20 y
- Mastellos DC, Ricklin D, Lambris JD. Clinical promise of next-generation complement therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 2019;18(9):707-729. doi:10.1038/s41573-019-0031-6.

El Compuesto A1 es un péptido cíclico anti-C3 derivado de compstatina. El Compuesto A2 se desarrolló adicionalmente en función del Compuesto A1 para extender su semivida circulante y mejorar su solubilidad en suero. El Compuesto A2 comprende

dos porciones peptídicas ligadas a través de un ligador de PEG lineal de 40 kDa.

[00364] Las secuencias del Compuesto A1 y el Compuesto A2 se resumen en la siguiente Tabla 14.

[00365] **Tabla 14:**

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Secuencia central	Comentarios
Compuesto A1	Ac-I-[CV-Trp(Me)-QDWGAHRC]-T-NH_2 (SEQ ID NO: 49)	ICVWQDWGAHRCT (SEQ ID NO: 49)	El Compuesto A1 está acetilado en el terminal C El triptófano en la posición 4 es un 1-metiltriptófano . Los corchetes indican la ciclización del péptido a través de los residuos de Cys
Compuesto A2	Gly-I-[CV-Trp(Me)-QDWGAHRC]-T-NH_2 (SEQ ID NO: 50)	GICVWQDWGAHRCT (SEQ ID NO: 50)	El triptófano en la posición 4 es un 1-metiltriptófano Los corchetes indican la ciclización del péptido a través de los residuos de Cys El compuesto se dimeriza a través de NHS-PEG40-NHS

[00366] Los datos adicionales sobre la estructura y la secuencia del Compuesto A1 y el Compuesto A2 están disponibles en Adv Exp Med Biol. 2008; 632: 273-292.

[00367] ***B. Sustituto de NGM621***

[00368] Con fines comparativos, los inventores desarrollaron un compuesto de NGM, como se divulga en WO2019195136A1. Este compuesto de NGM es preferentemente un sustituto de NGM621, denominado en adelante "Compuesto comparativo A3" o "**Compuesto A3**". Dicho Compuesto A3 es IgG anti-C3 con las siguientes características.

[00369] Las secuencias relevantes se resumen en la siguiente Tabla 15.

[00370] **Tabla 15:**

Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
Compuesto A3 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMDWVRQAPGQRLEWMGYIYPHNGGTTYNQQFTGRVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGGFDFDYWGQGTLVTVSS	51
Compuesto A3 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVDTYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYHCGQSHSYPLTFGQGTKLEIKR	52
Compuesto A3 HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMDWVRQAPGQRLEWMGYIYPHNGGTTYNQQFTGRVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGGFDFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN	53

	QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Compuesto A3 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVDTYVSWYQQKPGKAPK LLIYGASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYHCGQSH SYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	54

[00371] Los inventores desarrollaron además un sustituto de NGM621 en formato Fab, en función de la secuencia mencionada anteriormente. Dicho compuesto se denomina "Compuesto A3 Fab".

[00372] **Ejemplo 6: Datos comparativos**

[00373] ***A. Mecanismo de acción diferente***

[00374] El anticuerpo de ejemplo de la invención y los compuestos comparativos tienen mecanismos de acción distintivos y características distintivas, como se resume a continuación:

- el anticuerpo de la invención inhibe C3 y C3b,
- APL-2 inhibe C3 y C3b,
- NGM621 inhibe C3, y
- ZIMURA® inhibe C5.

[00375] Los inventores demostraron que, contrariamente a NGM621, el anticuerpo de ejemplo de la invención, el Clon I, se une a C3 y C3b con afinidad similar, como se ilustra en la siguiente Tabla 16.

[00376] **Tabla 16:**

	Anticuerpo de ejemplo de la invención (Clon I)	**NGM621***
C3 (Kd, nM)	0,16	0,34
C3b (Kd, nM)	0,14	>34

*datos publicados por Alexander Loktev *et al*. "*NGM621 is a potent inhibitory anti-complement C3 antibody in development for treatment of geographic atrophy*", Reunión ARVO 2020, póster B0267.

[00377] ***B. El formato scFv puede administrar más moléculas de fármaco por inyección IVT***

[00378] Los inventores establecieron el peso másico, el volumen de inyección y las dosis potenciales de un anticuerpo de ejemplo de acuerdo con la invención y el Compuesto comparativo A2, el Compuesto comparativo A3 y ZIMURA® (datos disponibles en la literatura), como se ilustra en la siguiente Tabla 17.

[00379] **Tabla 17:**

	Anticuerpo de ejemplo de la invención (Clon I)		**APL-2**	Compuesto comparativo A3	ZIMURA®**
Mw (kDa)	26		43	150	54
Volumen de inyección (ul)	50	100	100	100	100
Dosis (mg)	7,5	15	15	15	2
Dosis (nmol)	287	574	347	100	37

[00380] El anticuerpo de la invención demuestra que proporciona una mayor cantidad de fármaco administrado por IVT al ojo, lo que contribuye a lograr una mayor inhibición del complemento en el ojo.

[00381] ***C. El formato scFv permite una mejor penetración en la retina tras la inyección intravítrea equimolar, en comparación con Fab o IgG.***

[00382] Los inventores compararon la penetración en la retina de un scFv (brolucizumab) y un Fab (ranibizumab) tras una inyección intravítrea equimolar en *Macaca fascicularis*. Los datos indican que el formato scFv permite una penetración en la retina mejorada en comparación con Fab o IgG. Por lo tanto, se espera que los anticuerpos de la invención en formato scFv alcancen niveles superiores de exposición retiniana en comparación con un Fab tras la administración intravítrea (**Figura 1A y 1B**).

[00383] **Ejemplo 7: Potencia y actividad *in vitro* del scFv de la invención y comparación con el Compuesto comparativo A1 y el Compuesto comparativo A3**

[00384] Para la determinación de una potencia funcional y la comparación entre el scFv de ejemplo de la invención, se llevan a cabo los siguientes ensayos: ensayo de inhibición del complemento que mide la generación del complejo de ataque a la membrana y un ensayo hemolítico.

[00385] ***A. Materiales y métodos***

a. Ensayo de inhibición del complemento

[00386] Para monitorear la inhibición del sistema del complemento en suero humano, el scFv de la invención o las moléculas de comparación se evalúan mediante un inmunoensayo enzimático para la determinación cualitativa de las vías del complemento funcional clásica, de la lectina y alternativa en suero humano mediante el uso del cribado del sistema del complemento WEISLAB® (Svar Life Science AB, Malmö, Suecia), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La cantidad de neoantígeno C5b-C9 generado es proporcional a la actividad funcional de las vías del complemento. El scFv de la invención y las moléculas de comparación se evalúan en una curva de respuesta a la concentración y la IC50 para la inhibición se calcula con el

software GraphPadPrism y una regresión de curva no lineal de 4 parámetros.

b. Ensayo hemolítico

[00387] Los fragmentos de anticuerpos anti-C3 se evalúan por su capacidad para inhibir la hemólisis de los eritrocitos de oveja sensibilizados con anticuerpos mediada por la activación de la vía clásica (CP) o la vía alternativa (AP) en suero humano. Para este fin, los eritrocitos de oveja se recubren con hemolisina (anticuerpos anti-oveja de conejo) en la superficie para activar el sistema del complemento en suero humano, lo que da como resultado la activación de C3 y la posterior formación del complejo de ataque a la membrana (MAC). El MAC se ensambla en la membrana de los eritrocitos de oveja, lo que conduce a la lisis celular. El nivel de hemoglobina liberada de los eritrocitos lisados se mide a una OD de 414 nm y es proporcional a la actividad del complemento presente en la muestra de suero. Para determinar la capacidad de las moléculas anti-C3 para inhibir la actividad de CP, se diluyó suero humano en amortiguador GVB++ (tecnología del complemento) para una activación óptima de la vía clásica (requiere iones de calcio y magnesio). Se preparan diluciones en serie de muestras de prueba anti-C3 a partir de esta solución con una concentración final de 1 % de suero humano para cada punto de datos (antes de la adición a los eritrocitos). Las muestras se incuban con eritrocitos de oveja sensibilizados con anticuerpos durante 1 hora a 37 °C y se mide la hemoglobina liberada en el sobrenadante después de una etapa de centrifugación.

[00388] La vía alternativa (AP) en muestras de suero humano se activa espontáneamente por eritrocitos de conejo. Dado que la activación de AP requiere concentraciones más altas de suero, la vía clásica se debe bloquear con MgEGTA para quelar los iones Ca2+ (AP solo requiere iones Mg2+). La activación de AP da como resultado la activación de C3 y la posterior formación del complejo de ataque a la membrana (MAC). El MAC se ensambla en la membrana de los eritrocitos de conejo, lo que conduce a la lisis celular. El nivel de hemoglobina liberada de los eritrocitos lisados se mide a una OD de 414 nm y es proporcional a la actividad del complemento presente en la muestra de suero.

[00389] ***B. Resultados***

[00390] Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 18.

[00391] **Tabla 18:**

IC50 (nM)		**Clon I**	**Clon II**	**Clon III**	**Compuesto A1**	**Compuesto A3**
Vía clásica	Depósito de MAC	79	77	73	402	56
	Hemólisis	74	69	72	709	56
Vía alternativa	Depósito de MAC	344	360	349	333	548

IC50 (nM)		Clon I	Clon II	Clon III	Compu esto A1	Compue sto A3
	Hemólisis	705	668	745	2535	207
Vía de la lectina	Depósito de MAC	67	71	64	222	58

[00392] Los anticuerpos de ejemplo de la invención (Clon I, Clon II y Clon III) son más potentes que el Compuesto A1 (componente activo del Compuesto A2). Es importante destacar que los inventores demostraron que los anticuerpos de ejemplo de la invención inhiben las vías clásica y de la lectina con mayor potencia en comparación con el Compuesto A1.

[00393] El Clon I muestra una actividad similar en la vía alternativa al igual que el Compuesto A1.

[00394] El Clon I muestra una inhibición más potente de la vía clásica en comparación con el Compuesto A1.

[00395] El Clon I muestra una inhibición más potente de la vía de la lectina en comparación con el Compuesto A1.

[00396] Clon I: Los inventores demostraron que un anticuerpo de ejemplo de la invención (Clon I) inhibe todas las funciones efectoras del complemento, con alta afinidad y potencia.

[00397] Compuesto A1: Los inventores ilustraron que el Compuesto comparativo A1 inhibe todas las funciones efectoras del complemento, con alta afinidad y potencia, en comparación con los anticuerpos de la invención.

[00398] NGM621: Los inventores demostraron que el sustituto de NGM621, el Compuesto comparativo A3, no muestra inhibición de C3b.

[00399] ZIMURA®: El compuesto ZIMURA® solo se dirige a C5.

[00400] **Ejemplo 8: Afinidad de unión a C3 y C3b humanos y comparación de la afinidad de unión del anticuerpo de la invención, el Compuesto comparativo A1 y el Compuesto comparativo A3**

[00401] Los inventores evaluaron la afinidad de unión del scFv de ejemplo de la invención a C3 humano, así como la afinidad de unión del Compuesto A1 y el Compuesto A3 a C3 y C3b humanos.

[00402] ***A. Materiales y métodos***

[00403] Los parámetros cinéticos de los candidatos se determinan con una resonancia de plasmones superficiales (SPR) y un dispositivo Biacore T100. C3 y diferentes variantes de este (Tabla 19) se inmovilizan como un ligando en un chip sensor HC30M SPR (XanTec bionanalytics, Alemania) mediante química de ligazón EDC/sulfo-NHC. Se inyectan consecutivamente cinco concentraciones crecientes de

cada molécula (analito) mediante el modo de cinética de ciclo único (SCK) para determinar los parámetros cinéticos. La regeneración entre los candidatos se realiza con glicina*HCl 10 mM, NaCl 2 M, pH 3,5. Los datos se ajustan a un modelo de unión Langmuir 1:1 y se determinaron los parámetros cinéticos de constante de asociación (ka), constante de disociación (kd) y afinidad (K_D).

[00404] Se observó polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en C3 en toda la población y se identificaron ciertos SNP en estudios de asociación de genoma completo (GWAS) para correlacionarlos con un mayor riesgo de desarrollar AMD. Las variantes comunes de SNP incluyen P314L, que se produce en aproximadamente 23,3 % de la población, y R102G, que se informó que se produce en aproximadamente 26-29 % de la población. Las variantes muy raras, que se producen en menos de 2,5 % de la población, incluyen K155Q, R735W, S1619W, K65Q y R161W.

[00405] Por lo tanto, los inventores midieron la afinidad de unión del scFv de la invención a las formas de C3 más comunes, es decir, R102G y P314L. El C3 humano de tipo silvestre, el C3 humano P314L y el C3 humano R102G se expresan en la línea celular CHO con el kit de expresión ExpiFectamine CHO (Thermo Fisher Scientific). Las proteínas se expresan con una etiqueta 6xHis del terminal N y se purifican con una columna HisTrap Excel HP (GE Healthcare), seguido de una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño (SUPERDEX®20010/300GL; GE Healthcare).

[00406] ***B. Resultados***

[00407] Los datos de cinética y afinidad del scFv de la invención, el Compuesto A1 (componente activo del Compuesto A2) y la unión del Compuesto A3 a C3 y C3b humanos, respectivamente, se enumeran en la siguiente Tabla 19.

[00408] **Tabla 19:**

IC50 (nM)	**Clon I**	**Clon II**	**Clon III**	Compuesto A1	Compuesto A3 Fab
Afinidad con C3 humano (nM)	0,152	0,022	0,151	6,2	0,34
Afinidad con C3b humano (nM)	0,149	0,05	0,127	8,6	>34

[00409] El Compuesto A3 se une a C3 con alta afinidad con el C3 humano intacto (KD = 0,34 nM), pero muestra una afinidad significativamente menor (>100 veces) con los fragmentos de escisión de C3 C3b.

[00410] Por el contrario, el anticuerpo de ejemplo de la invención se une a C3 con mayor afinidad que el Compuesto A3. Además, el anticuerpo de ejemplo de la invención tiene una afinidad de unión aproximadamente equivalente con C3 y C3b.

[00411] Cabe destacar que los anticuerpos de la invención se unen con mayor afinidad a C3 y C3b humanos en comparación con el Compuesto A1 y el Compuesto

A3, lo que permite una inhibición más potente de C3. En comparación con el Compuesto A3, los anticuerpos de la invención se unen con mayor afinidad a C3b y, por lo tanto, bloquearán la generación de C3b en el bucle de amplificación de C3, así como la actividad de C3b y C3b ya depositados generados por vías de activación alternativas.

[00412] Los resultados adicionales se resumen en la siguiente Tabla 20.

[00413] **Tabla 20:**

Molécula		**C3**	**C3b**	**C3 de *Macaca fascicularis***	**C3 recombinante**	**C3 SNP1 P314L**	**C3 SNP2 R102G**
Clon II	**K_D (nM)**	**0,022**	**0,05**	**0,07**	**0,035**	**<0,04***	**0,021**
	k_a (x 10^5 $M^{-1}s^{-1}$	2,5	2,5	2,1	3	2,9	3,3
	k_d (x 10^{-6} s^{-1})	5,5	12	15	10	<11	7
Clon I	**K_D (nM)**	**0,152**	**0,149**	**0,267**	**0,148**	**0,14**	**0,135**
	k_a (x 10^5 $M^{-1}s^{-1}$	3,1	3,2	2,4	3,3	3	3,3
	k_d (x 10^{-6} s^{-1})	47	48	63	49	42	45
Clon III	**K_D (nM)**	**0,151**	**0,127**	**0,208**	**0,128**	**0,127**	**0,115**
	k_a (x 10^5 $M^{-1}s^{-1}$	2,4	2,5	2	2,7	2,5	2,8
	k_d (x 10^{-6} s^{-1})	36	31	43	35	32	32
Compuesto A1	**K_D (nM)**	**6,2**	**8,6**	**n.d.**	**12,9**	**13,7**	**n.d.**
	k_a (x 10^5 $M^{-1}s^{-1}$	8,8	10,7		4,99	4,47	
	k_d (x 10^{-6} s^{-1})	5470,9	9202,7		6444,4	6139,1	

[00414] Por lo tanto, los inventores confirmaron que los anticuerpos de la invención que incluyen el Clon I, el Clon II y el Clon III tienen una mayor afinidad con C3 y C3b e inhiben 2/3 de la activación del complemento más potente que el Compuesto A1.

[00415] La alta afinidad de unión de los anticuerpos de ejemplo contribuye a prolongar el tiempo de neutralización de C3 tras la inyección intravítrea y permite además una frecuencia de inyección reducida. La afinidad de unión mejorada y la frecuencia de inyección reducida mejoran considerablemente la eficacia del tratamiento de los pacientes. También proporciona valiosos beneficios para el paciente, especialmente una mejor observancia y cumplimiento del fármaco.

[00416] Cabe destacar además que el scFv de la invención se une a C3 de tipo silvestre, así como a SNP C3 P314L relevante para la enfermedad con una mayor afinidad que el Compuesto A1.

[00417] **Ejemplo 9: Identificación del epítopo de unión al anticuerpo en el complemento C3 humano**

[00418] **Preparación de la proteína:** El componente C3c del complemento es el fragmento principal resultante de la escisión de C3 por la C3 convertasa y el factor I. El C3c aislado de plasma humano se adquiere de Athens Research & Technology (número de producto 16-16-030303), se desglicosila con PNGasa F y se purifica mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna SUPERDEX® 200. Las fracciones pico se agrupan, se concentran con un dispositivo de filtro Amicon con un corte de 50 kDa y se almacenan a -80 °C.

[00419] **Cristalización del scFv:** Los cristales se obtienen con el método de difusión de vapor de gota colgante al mezclar 0,1 µl de la proteína con 0,1 µl de una solución de reserva que contiene acetato de amonio 0,1 M, cloruro de zinc 0,1 M, BIS-TRIS 0,1 M, pH 6,0 y 15 % p/v de frotis de PEG alto. Los cristales con forma de placa aparecen en un día. Los cristales se crioprotegen con la solución de reserva complementada con 30 % v/v de glicerol y se congelan instantáneamente en nitrógeno líquido.

[00420] **Recolección de datos y determinación de la estructura:** Los datos se recolectan a 100 K en la línea de luz X10SA del SLS en Villigen, Suiza. Se recolectan 3600 fotogramas con 0,1 ° por fotograma en un detector EIGER X 16M. Los datos se procesan con autoPROC. Se crea un modelo para el reemplazo molecular con SCULPTOR dentro del paquete de software PHENIX con la estructura de rayos X determinada previamente de un scFv similar como plantilla. El reemplazo molecular se realiza con PHASER con el modelo scFv preparado con SCULPTOR como plantilla. La estructura se refina con Buster, la construcción de modelos y el análisis de ajuste por mínimos cuadrados se realiza con COOT.

[00421] **Preparación de muestras de crio-EM y recolección de datos:** Se mezcla C3c con scFv en una relación de 1:1,2, se incuba durante 16 h a 277 K y se purifica con una columna de aumento SUPERDEX® 200. La fracción del pico se concentra a 36 µM y se aplica a una rejilla EM (Quantifoil-1.2/1.3 Au 300). Las rejillas de crio-EM se preparan con un Leica GP (Leica Microsystems). Las rejillas se transfieren durante 2 s a 4 °C con 85 % de humedad y se sumergieron en etano líquido enfriado con nitrógeno líquido. Las rejillas criogénicas se criban en un microscopio Glacios que opera a una tensión de 200 kV con un detector Falcon III y las rejillas de buena calidad se transfieren a un microscopio Titan Krios que opera a 300 kV. Las imágenes se recolectan en modo de superresolución con un detector Falcon IV

(Thermo Fisher Scientific) montado después de un filtro de energía con un tamaño de píxel calibrado de 0,745 Å por píxel. Las micrografías se exponen con una dosis total de 60 $e^-/Å^2$ y se procesan con CryoSPARC v3.1.1. Las pilas tienen corrección de movimiento y se agrupan dos veces, lo que da como resultado un tamaño de píxel de 1,49 Å por píxel.

[00422] **Análisis de imágenes de crio-EM:** Se seleccionan un total de 1.914.120 partículas con el selector de plantilla CryoSPARC de 3622 micrografías. Las partículas seleccionadas se extraen con un tamaño de cuadro de 348 píxeles y se agrupan en 174 píxeles en CryoSPARC. Las partículas extraídas luego se someten a 3 rondas de clasificación 2D en CryoSPARC-3.1.1. para eliminar hielo, contaminantes y agregados, y se obtienen 421.628 partículas. Las clases con densidades de C3c-scFv claramente definidas se usan para la reconstrucción *ab initio* en CryoSPARC-3.1.0. Se seleccionan 245.993 partículas en función de un umbral de clase 2D de 0,9 y se someten a una ronda de refinamiento uniforme y no uniforme. Las partículas se vuelven a extraer con un tamaño de cuadro de 348 píxeles y se realiza una ronda adicional de refinamiento uniforme y no uniforme. Esto dio como resultado una resolución de capa de Fourier de 2,55 Å.

[00423] **Construcción del modelo**: Las estructuras de rayos X de C3c (pdb 5FOB) y scFv se integran en la densidad de EM con la ayuda de CHIMERA, se refinan en el espacio real con PHENIX y se inspeccionan con COOT. El análisis de la interfaz se realiza con PYMOL.

[00424] La estructura del Clon I se determina mediante cristalografía de rayos X a una resolución de 1,4 Å. La estructura contiene dos moléculas por unidad asimétrica. Todos los residuos estaban bien definidos dentro del mapa de densidad de electrones, excepto los dos residuos del terminal N en la cadena A y B, los residuos de ligador 115-132 en la cadena A y 114-133 en la cadena B y el residuo del terminal C 253 en la cadena B.

[00425] Debido a la orientación preferida de las moléculas complejas en las rejillas de EM, la resolución se limitó a 4-5 Å en la interfaz entre C3c y el scFv, lo que aún permite colocar los modelos derivados de rayos X en el mapa de EM. Los residuos dentro de una proximidad de 6 Å al scFv se determinaron como residuos del sitio de unión, que corresponden a los aminoácidos 366,392-396,413-421,425,427,442,453,478 en el complemento C3 humano (SEQ ID NO: 47). Los resultados mostraron que el Clon I se une a un epítopo que se superpone parcialmente con el sitio de unión de compstatina, pero no se limita a él. Es probable

que la mayor afinidad de unión a C3 exhibida por la molécula de la presente invención en comparación con los derivados de compstatina resulte de esta interfaz de unión extendida. Estos resultados indican que la molécula de la presente invención se une a C3 en un modo diferente en comparación con los inhibidores de C3 del estado de la técnica, lo que probablemente contribuya a su capacidad única para inhibir las tres vías del complemento, que incluyen la vía clásica (CP), la vía de la lectina (LP) y la vía alternativa (AP).

[00426] **Ejemplo 10: Ensayo de permeabilidad de BrM *in vitro* y permeabilidad de BrM**

[00427] La membrana de Bruch forma la capa más interna de la coroides y se cree que los cambios estructurales desencadenan la activación del complemento en pacientes con GA. Dado que la destrucción de la coriocapilar impulsada por el complemento tiene una función importante en la fisiopatología de la GA, la excelente difusión a través de la membrana de Bruch es una característica importante de un inhibidor del complemento para tratar esta enfermedad.

[00428] Por lo tanto, los inventores evaluaron la capacidad del scFv de la invención para difundirse a través de la membrana de Bruch *in vitro* y lo compararon con el Compuesto A2 y el Compuesto A3.

[00429] ***A. Materiales y métodos***

[00430] Para esta medición se usan muestras de membrana de Bruch porcina. Los ojos de porcino se recolectan del matadero no más de 6 horas después de que los animales se sometieron a eutanasia y se almacenan a 4 °C hasta su uso (el mismo día).

[00431] *Preparación de la membrana de Bruch enriquecida (BrM):* Los ojos se colocan en una placa de Petri descartable y se elimina cualquier tejido residual que rodea el globo ocular. Se hace una incisión en el globo ocular junto al iris con un bisturí y la parte frontal del ojo, así como el cristalino, el vítreo y el tejido retiniano se extraen del ocular. La membrana de Bruch enriquecida, incluso la monocapa de RPE supuerpuesta, se retira suavemente de toda la superficie interior del ocular, se coloca en una placa de Petri con PBS y se aplana con cuidado en el líquido. Después de eso, la membrana de Bruch se transfiere a la cámara de Ussing, la cámara de Ussing se cierra y un compartimento se llena con 1 ml de PBS para la prueba de fugas. Si después de 5 min no se observa una acumulación significativa de líquido en el segundo compartimento, la membrana se considera intacta. Para cada cámara de Ussing se usa la preparación de Bruch de 4 ojos diferentes.

[00432] *Incubación de la membrana de Bruch enriquecida con muestras de prueba:* Se prepara una mezcla maestra de sustituto de APL-2 (tal como el Compuesto A2) y scFv anti-C3 o sustituto de APL-2 (tal como el Compuesto A2) y sustituto de NGM621 (tal como el Compuesto A3) en PBS (mezcla de +0,02 % de NaN3 + inhibidor de proteasa (Complete Tablets, Mini EDTA-free, EASYpack; Roche)) suficiente para 4 cámaras de Ussing (1 ml por cámara de Ussing) a una concentración final de 0,1 mg/ml para cada compuesto. Se agrega 1 ml de la mezcla maestra a un compartimento (cámara de muestra designada) por cámara de Ussing. Se agrega 1 ml de PBS (+0,02 % de NaN3 + inhibidores de proteasa) al segundo compartimento (cámara de difusión designada) por cámara de Ussing. Las cámaras de Ussing se sellan con Parafilm y se incuban a temperatura ambiente con agitación suave para facilitar la difusión.

[00433] *Muestreo y análisis de integridad de la membrana:* Para el muestreo en diferentes puntos temporales (4 h, 24 h, 48 h y 72 h), la solución en los compartimentos individuales se mezcla al pipetear hacia arriba y hacia abajo con cuidado y se transfirieron 90 µl por separado de cada muestra y cámara de difusión a los tubos de recolección. Al final del período de incubación, se realiza una prueba de integridad de la membrana con partículas azules de poliestireno de carboxilo Sphero: la suspensión se diluye en una relación 1:10 en PBS y se agregan 200 ul a un compartimento (cámara de muestra designada) por cámara de Ussing y se incuba durante 30 min. Se observa la acumulación de partículas azules en el segundo compartimento y se registran las imágenes de la cámara para controlar la integridad general de la membrana.

Análisis de las muestras: Se cargan con eficacia 15 µl de cada solución de las cámaras de muestra y de difusión en 2 geles de poliacrilamida prefabricados (geles NuPAGE Bis-Tris) junto con una cantidad similar de la mezcla maestra almacenada como control de carga. El primer gel se analiza mediante SDS-PAGE estándar y métodos de tinción basados en Coomassie para la detección de proteínas (scFv anti-C3). El segundo gel se analiza mediante SDS-PAGE y tinción con yoduro de bario para la detección de PEG (Compuesto A2).

[00434] *Evaluación:* Las imágenes de los geles SDS se analizan con el *software* ImageJ2 (Fiji). Las bandas se cuantificaron y representaron como % de compuesto de prueba en la cámara respectiva, donde 100 % se refiere a las intensidades de banda sumadas de la cámara de muestra y la cámara de difusión en el mismo dispositivo Ussing.

[00435] ***B. Resultados***

[00436] La capacidad de atravesar la BrM porcina se comparó para el scFv de la invención y derivados de compstatina , tales como el Compuesto A2 , que se incubaron simultáneamente en preparaciones de BrM de cuatro ojos de porcino diferentes. Cantidades significativamente más altas de scFv atravesaron la BrM en las cuatro preparaciones de membrana en comparación con el sustituto de APL-2. De manera similar, la capacidad de atravesar la BrM porcina se comparó para el sustituto de NGM621 (Compuesto A3) y un sustituto de APL-2 (Compuesto A2), que se incubaron simultáneamente en preparaciones de BrM de cuatro ojos de porcino diferentes.

[00437] El anticuerpo de ejemplo de la invención (Clon I) mostró una capacidad de difusión superior a través de la membrana de Bruch en comparación con el Compuesto A2 y el Compuesto A3 (**Figuras 3 y 4**).

[00438] Compuesto A2: No tiene penetración

[00439] Compuesto A3: Penetración reducida en comparación con el anticuerpo de ejemplo de acuerdo con la invención.

[00440] ZIMURA®**:** La molécula no se evaluó. Dado que contiene la misma porción de PEG grande de 40 kDa que APL-2, se espera un comportamiento similar.

[00441] **Ejemplo 11: Estabilidad térmica de proteína del scFv de la invención**

[00442] ***A. Materiales y métodos***

[00443] *Técnicas usadas: DSF*

[00444] La fluorometría diferencial de barrido (DSF) mide el desplegamiento de proteína mediante el control de cambios en la fluorescencia en función de la temperatura.

[00445] La temperatura de desplegamiento de la proteína (T_m) está ligada a la estabilidad de los anticuerpos, específicamente a la agregación durante el almacenamiento y la estabilidad a largo plazo del producto terapéutico. Las transiciones térmicas de los dominios CH2 y CH3 del anticuerpo monoclonal suelen ser invariantes para diferentes anticuerpos dentro de un isotipo, y el dominio CH2 se despliega antes que el dominio CH3.

[00446] ***B. Resultados***

[00447] Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 21.

[00448] **Tabla 21:**

COMPUESTO	CLON I	CLON II	CLON III
TM DE DESPLEGAMIENTO °C (DSF)	72,0/71,8	69,5/69,4	69.0 /68,5

[00449] Un valor alto de T_m significa que menos moléculas pueblan el estado desplegado a una temperatura dada. Por lo tanto, un valor alto de T_m es beneficioso para los fármacos proteicos terapéuticos, ya que un valor alto de T_m mantiene la conformación activa a temperaturas fisiológicas.

[00450] Estos resultados confirman las excelentes propiedades farmacéuticas de los anticuerpos de ejemplo de la invención: En particular, la propiedad de estabilidad térmica mejorada contribuye a una eficacia terapéutica mejorada al tiempo que permite una dosis y frecuencia de inyección reducidas para los pacientes. Además, los resultados indican una mayor vida útil y una mejor estabilidad en el tiempo del producto terapéutico. La estabilidad mejorada y la actividad prolongada contribuyen a hacer que los anticuerpos de la invención estén altamente adaptados para la administración intravítrea.

[00451] **Ejemplo 12: Riesgo de inmunogenicidad: Cribado para ADA preexistente**

[00452] Los inventores criban sueros de donantes humanos sanos para detectar ADA preexistente contra el Clon I mediante un ELISA puente. Los ADA preexistentes presentes en el suero de donantes humanos sanos se unen al scFv anti-C3 inmovilizado. En una etapa siguiente, los ADA se unen al mismo scFv anti-C3 etiquetado con biotina y se detectan con estreptavidina conjugada con HRP.

[00453] ***A. Materiales y métodos***

[00454] El scFv se etiqueta con biotina con el kit "Biotin Conjugation Kit (Fast, Type A) - Lightning-Link" (Expedeon/Abcam) de acuerdo con las instrucciones de los proveedores. El scFv sin etiquetar se diluye a 0,5 µg/ml en PBS, se transfieren 50 µl por cavidad a una placa de 96 cavidades y se incuba durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, la placa de 96 cavidades se lava con amortiguador de lavado (3x 320 µl, 0,05 % de Tween 20 en PBS pH 7,4) y los sitios de unión no específicos se bloquean con 300 µl/cavidad de amortiguador de bloqueo (SuperBlock Blocking Buffer; ThermoFisher Scientific) durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, las cavidades se lavan con amortiguador de lavado (3x 320 µl/cavidad)

[00455] El suero humano de voluntarios sanos se diluye a 10 % en PBS, se agregan 50 µl/cavidad a la placa de 96 cavidades y la placa se incuba durante 1 h a

temperatura ambiente. A continuación, la placa se lava con amortiguador de lavado (3x 320 µl/cavidad), se agregan 50 µl/cavidad del scFv biotinilado (0,05 µg/ml en PBS) por cavidad y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente.

[00456] La placa se lava (3x 320 µl/cavidad de amortiguador de lavado), se agregan 50 µl/cavidad de Streptavidin-PolyHRP40 (reactivos SDT; 1:5000 en PBS) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente.

[00457] La placa se lava (3x 320 µl/cavidad de amortiguador de lavado), se agregan 50 µl/cavidad de sustrato TMB (Invitrogen) y se incuba durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se detiene la reacción mediante la adición de 50 µl/cavidad de H2SO4 1N. La absorción se mide a 450 nm. Un ADA preexistente conducirá a una mayor absorción.

[00458] ***B. Resultados***

[00459] Para el Clon I, se descubrieron ADA preexistentes en 9 de 50 muestras de suero, lo que muestra un bajo riesgo general de inmunogenicidad. Estos resultados confirman que los anticuerpos de la invención son altamente adecuados y prometedores para el tratamiento de enfermedades oftálmicas u oculares, con solo bajos riesgos de inmunogenicidad.

[00460] **Ejemplo 13: Caracterización biofísica de los anticuerpos de la invención en formulaciones de alta concentración**

[00461] ***Estabilidad de almacenamiento***

[00462] El Clon I, el Clon II y el Clon III se evalúan para determinar la estabilidad de almacenamiento. Las muestras se concentran a 150 mg/ml (dispositivo centrífugo Vivaspin20, 5 kDa MWCO a 3800 x g) y se almacenan a 25 °C y 40 °C durante hasta 4 semanas. Las muestras se analizan para detectar oligomerización (SE-HPLC) y degradación química (IEX-HPLC). La disminución respectiva en el contenido monomérico en comparación con el valor inicial se informa en la Tabla 22. La pureza monomérica inicial según lo determinado mediante SE-HPLC fue de 99,96 % para cada clon. La pureza de carga inicial, según lo determinado mediante IEX-HPLC, fue de 98,07 %, 97,16 % y 96,76 %, respectivamente, para los Clones I, II y III.

[00463] El Clon I, el Clon II y el Clon III mostraron una excelente estabilidad monomérica y de carga a 25 °C y 40 °C durante el período de incubación de 4 semanas.

[00464] ***Viscosidad a altas concentraciones***

[00465] La fuerza de inyección requerida para administrar el fármaco a través

de una aguja intravítrea estándar depende de la viscosidad del producto y debe ser lo suficientemente baja para permitir que el profesional médico inyecte el producto de manera segura. Por lo tanto, se requieren viscosidades bajas, generalmente por debajo de 15 mPa*s a 20 °C en el producto completamente formulado.

[00466] Las mediciones de viscosidad se realizan con las muestras preparadas para el estudio de estabilidad de almacenamiento. Además de las muestras completamente formuladas (His 10 mM, pH 5,5, sacarosa 275 mM, 0,02 % (p/v) de polisorbato 20), también se mide la viscosidad de cada candidato en una formulación mínima (histidina 10 mM, pH 5,5). Esto se realiza para evaluar la procesabilidad del fármaco (por ejemplo, filtración, bombeo, diafiltración, etc.) de los candidatos hasta 125 % de la concentración final del fármaco de 150 mg/ml.

[00467] La viscosidad se mide a 20 °C a una velocidad de cizallamiento de 1000 s^{-1} con un reómetro de placa cónica. Brevemente, se realiza un aumento gradual de la velocidad de cizallamiento hasta 1000 s^{-1} y se recolectan 100 puntos de datos, seguido de un aumento adicional de la velocidad de cizallamiento hasta 2000 s^{-1}, y se recolectan otros 10 puntos de datos. Por último, se realiza una disminución gradual de la velocidad de cizallamiento hasta la velocidad inicial. Los datos de viscosidad obtenidos se presentan en la Tabla 22. Se observaron buenas propiedades de manejo del producto farmacológico para el llenado y la facilidad de inyección para todos los candidatos.

[00468] Las propiedades de viscosidad y estabilidad del Clon I, II y III formulados a >150 mg/ml se resumen en la Tabla 22.

[00469] **Tabla 22**

Candidatos	Clon I	Clon II	Clon III	Formulación
Viscosidad [mPa*s]				
Amortiguador mínimo a 185 g/l	5,4	4,5	3,2	His 10 mM, pH 5,5
Formulado completamente a 150 g/l	3,9	3,9	3,3	His 10 mM, pH 5,5, sacarosa 275 mM, 0,02 % p/v de polisorbato 20
Estabilidad de almacenamiento, SEC				His 10 mM, pH 5,5, NaCl 150 mM
4 semanas a 25 °C [% de D]	0,06	0,11	0,10	
4 semanas a 40 °C [% de D]	0,37	1,59	0,84	
Estabilidad de almacenamiento, IEX				His 10 mM, pH 5,5, NaCl 150 mM
4 semanas a 25 °C [% de D]	1,1	0,5	0,3	
4 semanas a 40 °C [% de D]	2,4	3,3	3,6	

[00470] Los inventores demostraron que los anticuerpos de ejemplo de la invención muestran una estabilidad extraordinaria en formulaciones de alta concentración.