



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 283 594**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/36 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02768574 .2**
86 Fecha de presentación : **17.08.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1425042**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **09.06.2004**

54 Título: **Inhibidores de la vía del complemento que se unen a C5 y C5a sin inhibir la formación de C5b.**

30 Prioridad: **17.08.2001 US 313137 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

73 Titular/es: **Tanox, Inc.**
10301 Stella Link
Houston, Texas 77025-5445, US

72 Inventor/es: **Fung, Michael, S., C.;**
Sun, Cecily;
Lu, Meisheng y
Sun, William

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 283 594 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la vía del complemento que se unen a C5 y C5a sin inhibir la formación de C5b.

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de EE.UU. N° 60/313,137 presentada el 17 de agosto de 2001.

10 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a inhibidores de la inflamación que se unen a las proteínas C5 y C5a del sistema del complemento sin inhibir la formación de los complejos de ataque a la membrana (en lo sucesivo abreviadamente MAC, por la expresión inglesa *Membrane Attack Complexes*) denominados C5b y C5b-9.

15 **Fundamento de la invención**

El sistema del complemento juega un papel central en la eliminación de los complejos inmunes y en las respuestas inmunes a agentes infecciosos, antígenos extraños, células infectadas por virus y células tumorales. Sin embargo, una activación inapropiada o excesiva del sistema del complemento puede conducir a consecuencias perjudiciales, incluso potencialmente letales, debido a una inflamación grave que da como resultado la destrucción de tejidos. Estas consecuencias se manifiestan clínicamente en diversos trastornos que incluyen choque septicémico, lesiones miocárdicas así como lesiones intestinales por isquemia/reperfusión, rechazo de injertos, insuficiencia orgánica, nefritis, inflamación patológica y enfermedades autoinmunes. La septicemia, por ejemplo, es la causa principal de mortalidad produciendo, sólo en Estados Unidos, más de 200.000 muertes al año. A pesar de los importantes avances en los últimos años en el tratamiento de las infecciones graves, continúa aumentando la prevalencia y mortalidad por septicemia. Por consiguiente, la inhibición de la activación excesiva o no controlada de la cascada del sistema del complemento podría proporcionar ventajas clínicas a pacientes con dichas enfermedades y estados.

El sistema del complemento está compuesto por un grupo de proteínas que normalmente están presentes en el suero en estado inactivo. La activación del sistema del complemento se realiza principalmente por dos vías distintas, denominadas vía clásica y vía alternativa (V.M. Hokers, en *Clinical Immunology: Principles and Practice*, ed. R.R. Rich, Mosby Press; 1996, 363-391). La vía clásica es una cascada dependiente del calcio/magnesio, que es activada normalmente por la formación de complejos antígeno-anticuerpo. También puede ser activada de manera independiente de los anticuerpos por la unión de proteína C reactiva, complejada con un ligando, y por muchos agentes patógenos incluyendo las bacterias gram-negativas. La vía alternativa es una cascada dependiente del magnesio que es activada por deposición y activación de C3 sobre ciertas superficies sensibles (por ejemplo, polisacáridos de paredes celulares de levaduras y bacterias y ciertos materiales polímeros).

Estudios recientes han mostrado que el complemento también puede ser activado por la vía de la lectina, que implica la unión inicial de la lectina unida a la manosa y la posterior activación de C2 y C4, que son comunes a la vía clásica (Matsushita, M. *et al.*, *J. Exp. Med.* 176:1497-1502(1992); Suankratay, C. *et al.*, *J. Immunol.* 160: 3006-3013 (1998)). Las pruebas acumuladas indican que la vía alternativa participa en el aumento de la actividad tanto de la vía clásica como de la vía de la lectina (Suankratay, C., *ibid*; Farries, T.C. *et al.*, *Mol. Immunol.* 27: 1155-1161(1990)). La activación de la vía del complemento genera fragmentos biológicamente activos de las proteínas del complemento, por ejemplo anafitoxinas C3a, C4a y C5a y complejos de ataque a la membrana (MAC) C5b-9, que median las respuestas inflamatorias a través de la implicación de la quimiotaxia de los leucocitos, la activación de macrófagos, neutrófilos, plaquetas, mastocitos y células endoteliales, el aumento de la permeabilidad vascular, la citolisis y las lesiones de tejidos.

La proteína C5a del complemento es uno de los mediadores pro-inflamatorios más potentes del sistema del complemento. C5a es la forma activada de C5. La proteína C5 del complemento (peso molecular 190 kD) está presente en el suero humano en una cantidad de aproximadamente 80 µg/ml (Kohler, P.F. *et al.*, *J. Immunol.* 99: 1211-1216 (1967)). Está compuesta por dos cadenas polipeptídicas, α y β , con pesos moleculares aproximados de 115 kD y 75 kD, respectivamente (Tack, B.F. *et al.*, *Biochemistry* 18: 1490-1497 (1979)). Biosintetizada como una pro-molécula monocatenaria, la proteína C5 se escinde enzimáticamente en una estructura bicatenaria durante el tratamiento y la secreción. Después de la escisión, las dos cadenas se mantienen juntas por al menos un enlace disulfuro, así como por interacciones no covalentes (Ooi, Y.M. *et al.*, *J. Immunol.* 124: 2494-2498(1980)).

Las estructuras primarias de aminoácidos de C5 de seres humanos y muridos se obtuvieron a partir de los datos de secuenciación del cDNA (Wetsel, R.A. *et al.*, *Biochemistry* 27: 1474-1482 (1988); Haviland, D.L. *et al.*, *J. Immunol.* 146: 362-368 (1991); Wetsel, R.A. *et al.*, *Biochemistry* 26: 737-743 (1987)). La secuencia de aminoácidos deducida de la pre-pro-C5 humana precursora tiene 1676 aminoácidos. Las cadenas α y β de la C5 madura tienen 999 y 655 aminoácidos, respectivamente. C5 está glicosilada en su cadena α , en particular la asparagina del residuo 64.

La C5 se escinde en los fragmentos C5a y C5b durante la activación de las vías del complemento. Las enzimas convertidas responsables de la activación de C5 son complejos de múltiples subunidades de C4b, C2a y C3b para la vía clásica y de (C3b)₂, Bb y P para la vía alternativa (Goldlust, M.B. *et al.*, *J. Immunol.* 113: 998-1007 (1974); Schreiber,

R.D. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 3948-3952 (1978)). La C5 es activada por escisión en la posición 74-75 (Arg-Leu) en la cadena α . Después de la activación, se libera la proteína C5a, de 74 aminoácidos y 11,2 kD, procedente de la porción del extremo amino de la cadena α . Esta proteína C5a presenta propiedades anafilatoxínicas similares a las presentadas por C3a, pero es 100 veces más potente, sobre una base molar, en desencadenar respuestas inflamatorias. Tanto C5a como C3a son potentes estimuladores de neutrófilos y monocitos (Schindler, R. *et al.*, *Blood* 76: 1631-1638 (1990)); Haeffner-Cavaillon, N. *et al.*, *J. Immunol.* 138: 794-700 (1987); Cavaillon, J.M. *et al.*, *Eur. J. Immunol* 20: 253-257 (1990)). Además, se ha demostrado recientemente que el receptor C3a es importante para la protección contra el choque inducido por endotoxinas en un modelo de ratón (Kildsgaard, J. *et al.*, *J. Immunol.* 165: 5406-5409 (2000)).

Además de sus propiedades anafilatoxínicas, la C5a induce la migración quimiotáctica de neutrófilos (Ward, P.A. *et al.*, *J. Immunol.* 102: 93-99 (1969)), eosinófilos (Kay, A.B. *et al.*, *Immunol.* 24: 969-976(1973)), basófilos (Lett-Brown, M.A. *et al.*, *J. Immunol.* 117: 246-252 (1976)) y monocitos (Snyderman, R. *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138: 387-390 (1971)). La actividad de C5a está regulada por la enzima plasmática carboxipeptidasa N (E.C. 3.4.12.7) que elimina la arginina del extremo carboxi de la C5a formando el derivado C5a desArg (Goetzl, E.J. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 53: 591-599 (1974)). Sobre una base molar, el C5a desArg humano sólo presenta el 1% de la actividad anafiláctica (Gerard, C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 1833-1837 (1981)) y la actividad quimiotáctica polimorfonuclear como la de C5a sin modificar (Chenoweth, D.E. *et al.*, *Mol. Immunol.* 17: 151-161 (1980)). Tanto C5a como C5b-9 activan las células endoteliales para expresar las moléculas de adhesión esenciales para el secuestro de los leucocitos activados, que intervienen en la inflamación y lesión de tejidos (Foreman, K.E. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 94: 1147-1155 (1994); Foreman, K.E. *et al.*, *Inflammation* 20:1-9(1996); Rollins, S.A. *et al.*, *Transplantation* 69: 1959-1967 (2000)). La C5a también interviene en reacciones inflamatorias provocando la contracción de la musculatura lisa, aumentando la permeabilidad vascular, induciendo la desgranulación de basófilos y mastocitos e induciendo la liberación de proteasas lisosómicas y radicales libres oxidantes (Gerard, C. *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 12: 775-808 (1994)). Además, la C5a modula la expresión génica hepática en fase aguda y aumenta la respuesta inmune global aumentando la producción de TNF α , IL-1 β e IL-8 (Lambris, J. D. *et al.*, en: *The Human Complement System in Health and Disease*, Volanakis, J. E. ed., Marcel Dekker, New York, pp. 83-118).

Ha sido clonado el receptor de C5a humano (C5aR) (Gerard, N.P. *et al.*, *Nature* 349: 614-617 (1991); Boulay, F. *et al.*, *Biochemistry* 30: 2993-2999 (1991)). Pertenece a una superfamilia de receptores unidos a la proteína G de siete dominios transmembranales. El C5aR se expresa en neutrófilos, monocitos, basófilos, eosinófilos, hepatocitos, células de la musculatura lisa del pulmón y endoteliales y tejidos glomerulares renales (Van-Epps, D.E. *et al.*, *J. Immunol.* 132: 2862-2867 (1984); Haviland, D.L. *et al.*, *J. Immunol.* 154: 1861-1869 (1995); Wetsel, R.A., *Immunol. Lett.* 44: 183-187 (1995); Buchner, R.R. *et al.*, *J. Immunol.* 155: 308-315 (1995); Chenoweth, D.E. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 3943-3947 (1978); Zwimer, J. *et al.*, *Mol. Immunol.* 36: 877-884 (1999)). El sitio de unión al ligando de C5aR es complejo y consiste en al menos dos dominios de unión físicamente separables. Uno une el extremo amino de C5a (aminoácidos 1-20) y el núcleo unido por disulfuro (aminoácidos 21-61), mientras que el segundo une el extremo carboxi de C5a (aminoácidos 62-74) (Wetsel, R.A., *Curr. Opin. Immunol.* 7: 48-53 (1995)).

La C5a desempeña importantes funciones en la inflamación y lesión de tejidos. En la circulación extracorpórea y hemodiálisis, se forma C5a como resultado de la activación de la vía alternativa del complemento cuando la sangre humana se pone en contacto con la superficie artificial de la máquina corazón-pulmón o la máquina de diálisis renal (Howard, R.J. *et al.*, *Arch. Surg.* 123: 1496-1501 (1988); Kirklin, J. K. *et al.*, *J. Cardiovasc. Surg.* 86: 845-857 (1983); Craddock, P.R. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 296: 769-774 (1977)). El C5a provoca un aumento de la permeabilidad y edema capilar, broncoconstricción, vasoconstricción pulmonar, activación de leucocitos y plaquetas e infiltración en los tejidos, en particular en el pulmón (Czermak, B.J. *et al.*, *J. Leukoc. Biol.* 64: 40-48 (1998)). Se demostró que la administración de un anticuerpo monoclonal anti-C5a reduce la circulación extracorpórea y la disfunción endotelial coronaria inducida por cardioplejía (Tofukuji, M. *et al.*, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 116: 1060-1068 (1998)).

La C5a está también implicado en el síndrome de dificultad respiratoria aguda (en los sucesivos abreviadamente ARDS, por la expresión inglesa *Acute Respiratory Distress Syndrome*) e insuficiencia multiorgánica (en lo sucesivo abreviadamente MOF, por la expresión inglesa *Multiple Organ Failure*) (Hack, C.E. *et al.*, *Am. J. Med.* 1989: 86: 20-26; Hammerschmidt DE *et al.*, *Lancet* 1980; 1: 947-949; Heideman M. *et al.*, *J. Trauma* 1984; 4: 1038-1043). La C5a aumenta la producción de monocitos de dos importantes citoquinas pro-inflamatorias, TNF α e IL-1. También se ha demostrado que la C5a juega un importante papel en el desarrollo de la lesión de tejidos y particularmente la lesión pulmonar, en modelos animales del choque séptico (Smedegard G *et al.*, *Am. J. Pathol.* 1989; 135: 489-487). En los modelos de septicemia que utilizan ratas, cerdos y primates no humanos, los anticuerpos anti-C5a administrados a los animales antes del tratamiento con endotoxina o *E. coli* dieron como resultado una disminución de la lesión de tejidos, así como la disminución de la producción de IL-6 (Smedegard, G. *et al.*, *Am. J. Pathol.* 135: 489-497 (1989); Hopken, U. *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 26: 1103-1109 (1996); Stevens, J.H. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 77: 1812-1818 (1986)). Más importantemente, se ha demostrado que el bloqueo de C5a con anticuerpos policlonales anti-C5a mejora significativamente las tasas de supervivencia en un modelo de ligamiento/punción cecal de septicemia en ratas (Czermak, B.J. *et al.*, *Nat. Med.* 5: 788-792 (1999)). Este modelo presenta muchos aspectos de la manifestación clínica de la septicemia en seres humanos (Parker, S.J. *et al.*, *Br. J. Surg.* 88: 22-30 (2001)). En el mismo modelo de septicemia, se demostró que los anticuerpos anti-C5a inhiben la apoptosis de timocitos (Guo, R.F. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 106: 1271-1280 (2000)) y evita la MOF (Huber-Lang, M. *et al.*, *J. Immunol.* 166: 1193-1199 (2001)). Los anticuerpos anti-C5a eran también protectores en un modelo con factor del veneno de cobra de lesión pulmonar en ratas y en lesión

pulmonar inducida por un complejo inmune (Mulligan, M.S. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 98: 503-512 (1996)). La importancia de la C5a en la lesión pulmonar mediada por un complejo inmune fue confirmada posteriormente en ratones (Bozic, C.R. *et al.*, *Science* 26: 1103-1109 (1996)).

5 Se encontró que la C5a era una importante mediadora en la lesión por isquemia miocárdica-reperusión. El agotamiento del complemento redujo el tamaño del infarto de miocardio en ratones (Weisman, H.F. *et al.*, *Science* 249: 146-151 (1990)) y el tratamiento con anticuerpos anti-C5a redujo la lesión en un modelo de ratas de la isquemia-reperusión de la pata trasera (Bless, N.M. *et al.*, *Am. J. Physiol.* 276: L57-L63 (1999)). La lesión por reperusión durante un infarto de miocardio se redujo también notablemente en cerdos que habían sido tratados de nuevo con una
10 IgG monoclonal anti-C5a (Amsterdam, E.A. *et al.*, *Am. J. Physiol.* 268:H448-H457 (1995)). Un antagonista humano recombinante C5aR redujo el tamaño de un infarto en un modelo porcino de revascularización quirúrgica (Riley, R.D. *et al.*, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 120: 350-358 (2000)).

15 Los niveles del complemento son elevados en pacientes con artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico. Los niveles de C5a están relacionados con la gravedad del estado morbozo (Jose, P.J. *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.* 49: 747-752 (1989)); Porcel, J.M. *et al.*, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 74: 283-288 (1995)). Por consiguiente, la inhibición de la C5a y/o el C5aR podría ser útil en el tratamiento de estas enfermedades crónicas.

20 La expresión del C5aR está sobre-regulada en astrocitos reactivos, células microgliales y endoteliales en un sistema nervioso central humano inflamado (Gasque, P. *et al.*, *Am. J. Pathol.* 150: 31-41(1997)). La C5a podría estar implicada en enfermedades neurodegenerativas, tal como la enfermedad de Alzheimer (Mukherjee, P. *et al.*, *J. Neuroimmunol.* 105: 124-130 (2000)). La activación del C5aR neuronal puede inducir apoptosis (Farkas I *et al.*, *J. Physiol.* 1998; 507: 679-687). Por consiguiente, la inhibición de C5a y/o C5aR también podría ser útil en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

25 Actualmente se sabe que la psoriasis es una enfermedad mediada por los linfocitos T (Gottlieb, E.L. *et al.*, *Nat. Med.* 1: 442-447(1995)). Sin embargo, los neutrófilos y mastocitos pueden estar también implicados en la patogénesis de la enfermedad (Terui, T. *et al.*, *Exp. Dermatol.* 9: 1-10; 2000); Werfel, T. *et al.*, *Arch. Dermatol. Res.* 289: 83-86 (1997)). En las escamas psoriásicas se encuentran altos niveles de C5a desArg, lo que indica que está implicada la
30 activación del complemento. Los linfocitos T y los neutrófilos son atraídos químicamente por C5a (Nataf, S. *et al.*, *J. Immunol.* 162: 4018-4023 (1999); Tsuji, R.F. *et al.*, *J. Immunol.* 165: 1588-1598 (2000); Cavaillon, J.M. *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 20: 253-257 (1990)). Por consiguiente, la C5a podría ser una importante diana terapéutica para el tratamiento de la psoriasis.

35 Los complejos inmunes (en lo sucesivo abreviadamente IC, *Immune Complexes*) que contienen la inmunoglobulina G contribuyen a la patofisiología en un número de enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Goodpasture y alveolitis alérgica (Madaio, M.P., *Semin. Nephrol.* 19: 48-56 (1999); Korganow, A.S. *et al.*, *Immunity* 10: 451-459 (1999); Bolten, W.K., *Kidney Int.* 50: 1754-1760 (1996); Ando, M. *et al.*, *Curr. Opin. Pulm. Med.* 3: 391-399 (1997)). El modelo animal clásico para la respuesta inflamatoria en estas enfermedades por IC es la reacción de Arthus, que pone de relieve la infiltración de células polimorfonucleares, hemorragias y exudación plasmática (Arthus, M., *C.R. Soc. Biol.* 55:817-824 (1903)). Estudios recientes muestran que los ratones deficientes en C5aR están protegidos de la lesión de tejidos inducida por IC (Kohl, J. *et al.*, *Mol. Immunol.* 36: 893-903 (1999); Baumann, U. *et al.*, *J. Immunol.* 164: 6560-6565 (2000)). Los resultados están de acuerdo con
40 la observación final de que un pequeño péptido antagonista anti-C5aR inhibe la respuesta inflamatoria causada por la deposición de IC (Strachan, A. J. *et al.*, *J. Immunol.* 164:6560-6565 (2000)). Junto con su receptor, C5a juega un importante papel en la patogénesis de enfermedades causada por IC. Los inhibidores de C5a y C5aR podrían ser útiles en el tratamiento de estas enfermedades.

45 El documento WO 01/15731A1 describe composiciones y métodos para el tratamiento de septicemia usando anticuerpos para C5a. Estos anticuerpos reaccionan sólo con la región del extremo N del péptido C5a y no presentan reacción cruzada con C5.

50 El documento WO 86/05692 describe el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) con un anticuerpo específico para C5a o su derivado desArg. También describe el tratamiento de la septicemia por administración de este anticuerpo. Este anticuerpo se produjo en respuesta al derivado C5a desArg debido a ser más inmunógeno, pero se obtendrán anticuerpos de reacción cruzada con C5a. La Patente de EE.UU. N° 5.853.722 describe anticuerpos anti-C5 que bloquean la activación de C5 y por consiguiente, la formación de C5a y C5b.

60 La Patente de EE.UU. N° 6.074.642 describe el uso de anticuerpos anti-C5 en el tratamiento de la glomerulonefritis. Estos anticuerpos bloquean también la generación de C5a y C5b, inhibiendo tanto el efecto de C5a como la formación de C5b-9. La Patente de EE.UU. N° 5.562.904 describe anticuerpos anti-C5a que bloquean completamente la formación de MAC.

65 En otros estudios de anticuerpos anti-C5, los anticuerpos descritos bloquean la activación de C5 y su escisión formando C5a y C5b (Vakeva, A.P. *et al.*, *Circulation* 97:2259-2267 (1998); Thomas, T.C. *et al.*, *Mol. Immunol.* 33:1389-1401 (1996); Wang, Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:8563-8568 (1996); Kroshus, T. *et al.*, *Transplantation* 60:1194-1202 (1995); Frei, Y. *et al.*, *Mol. Cell Probes* 1:141-149 (1987)).

Se han estudiado anticuerpos monoclonales de reacción cruzada con C5, C5a o C5a desArg (Schulze, M. *et al.*, *Complement 3*: 25-39 (1986); Takeda, J. *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 101:265-270 (1987); Inoue, K., *Complement Inflamm.* 6: 219-222 (1989). También se ha descrito que los anticuerpos monoclonales de reacción cruzada con C5 y C5a inhibían la liberación de ATP mediada por C5a de las plaquetas de cobaya (Klos, A. *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 111: 241-252 (1988); Oppermann, M. *et al.*, *Complement Inflamm.* 8: 13-24 (1991)).

Sumario de la invención

La activación de C5 normalmente da como resultado la escisión de C5 en C5a y C5b. Las moléculas inhibidoras de la presente invención se unen con gran afinidad a C5 y C5a, no inhiben la activación de C5 ni evitan la formación de C5b ni inhiben su actividad. Un ejemplo de dicho inhibidor es el anticuerpo monoclonal denominado MAb 137-26, que se une a un epítipo compartido por C5 y C5a humanas. El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 137-26 ha sido depositado en The American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, con el N° de Registro PTA-3650 el 17 de agosto de 2001.

Las moléculas inhibidoras de la invención incluyen también: (i) otros anticuerpos o sus fragmentos, péptidos, oligonucleótidos o peptidomiméticos que se unen con gran afinidad a C5 y C5a, pero no inhiben la activación de C5 ni evitan la formación de C5b ni inhiben su actividad, o (ii) cualquier anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 137-26. Los fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, F(ab')₂, Fv, o Fv monocatenario, y los anticuerpos y fragmentos monoclonales de la invención incluyen anticuerpos y fragmentos quiméricos, DelImmuni-zed™, anticuerpos y fragmentos humanos o humanizados y otras formas aceptables para uso humano. Las moléculas inhibidoras pueden constituir parte de una composición farmacéutica.

Las moléculas inhibidoras de la invención son útiles en el tratamiento de enfermedades y estados que impliquen una producción excesiva o descontrolada de C5a, o para uso diagnóstico en la detección de la presencia, o cuantificación, de C5a.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra la unión de MAb 137-26 (anti-C5a, cuadrados negros) y MAb 137-76 (cadena β de anti-C5, círculos blancos) a la C5a humana purificada por ELISA. Como control negativo se usó un anticuerpo monoclonal irrelevante de isotipo similar. El eje Y representa la reactividad de los MAb con C5a expresada en densidad óptica (DO) a 450 nm y el eje X representa la concentración de los MAb. El MAb 137-26 reaccionó con C5a humana mientras que no reaccionaron el MAb 137-76 y el anticuerpo control irrelevante.

La Fig. 2 muestra la unión de MAb 137-26 (cuadrados negros) y MAb 137-76 (círculos blancos) a C5 humano purificado por ELISA. Se usó como control negativo un anticuerpo monoclonal irrelevante de isotipo similar. El eje Y representa la reactividad del MAb con C5 expresada en densidad óptica (DO) a 450 nm y el eje X representa la concentración de los anticuerpos monoclonales. Tanto MAb 137-26 como MAb 137-76 reaccionaron con C5 humano, mientras que no lo hizo el anticuerpo irrelevante.

La Fig. 3 muestra la incapacidad del MAb 137-26 anti-C5a para inhibir la hemólisis mediada por el complemento de eritrocitos de pollo sensibilizados por la vía clásica (abreviadamente en lo sucesivo CP por la expresión inglesa *Classical Pathway*). El MAb 175-62 anti-C2 inhibía eficazmente la hemólisis. Un anticuerpo monoclonal irrelevante de isotipo similar no producía ese efecto. El eje Y representa el porcentaje de inhibición de la hemólisis, como ya se ha descrito en el texto. El eje X representa la concentración de los anticuerpos monoclonales.

La Fig. 4 muestra la incapacidad del MAb 137-26 anti-C5a para inhibir la hemólisis mediada por el complemento de eritrocitos de conejo por la vía alternativa (abreviadamente en lo sucesivo AP por la expresión inglesa *Alternative Pathway*). El MAb 166-32 anti-factor D inhibía eficazmente la hemólisis. Un anticuerpo monoclonal irrelevante de isotipo similar no producía ese efecto. El eje Y representa el porcentaje de inhibición de la hemólisis, como ya se ha descrito en el texto. El eje X representa la concentración de anticuerpos monoclonales.

La Fig. 5 muestra la inhibición de la unión de C5a humana radioyodada con (¹²⁵I) a neutrófilos humanos purificados. El control positivo, C5 humana recombinante (rHuC5a) purificada, inhibía la unión. Un anticuerpo monoclonal irrelevante de isotipo similar no producía ese efecto. El eje Y representa el porcentaje de inhibición de la unión de ¹²⁵I-C5a, como ya se ha descrito en el texto. El eje X representa la concentración de los agentes competidores.

La Fig. 6 muestra el epítipo de unión de MAb 137-26 en C5a humano cartografiado solapando péptidos sintéticos sobre una membrana de celulosa.

La Fig. 7A muestra la expresión de CD11b sobre neutrófilos humanos estimulada por *E. coli* opsonizada en un modelo de sangre completa anti-coagulada con lepirudina. El MAb 137-26 anti-C5/C5a (círculos negros) inhibía la expresión de CD11b más eficazmente que el MAb561 anti-C5a (del Dr. Jurg Kohl, cuadrados negros) y que el MAb 137-30 anti-C5 (triángulos negros). Este último anticuerpo inhibía la activación de C5. El MAb irrelevante (triángulos negros invertidos) no producía ese efecto. El eje Y representa la intensidad media de fluorescencia (abreviadamente en lo sucesivo MFI por la expresión inglesa *Mean Fluorescence Intensity*) medida por inmunofluorocitometría. El eje X representa la concentración de los anticuerpos (μg/ml). T-0 = muestra de sangre completa en el minuto 0 (línea base).

T-10 = sangre completa incubada sólo con PBS durante 10 min sin *E. coli*. A otras muestras, con o sin inhibidores, se les había añadido *E. coli*.

La Fig 7B muestra la expresión de CD11b en neutrófilos humanos estimulada por *E. coli* opsonizada en un modelo de sangre completa anti-coagulada con lepirudina. El MAb 137-26 anti-C5/C5a (círculos negros) inhibía la expresión de CD11b más eficazmente que un antagonista peptídico C5aR (del Dr. Stephen Taylor) (cuadrados negros). El péptido irrelevante (triángulos negros invertidos) no producía ese efecto. El eje Y representa la intensidad media de fluorescencia (MFI) medida por inmunofluorocitometría. El eje X representa la concentración de los anticuerpos/péptido ($\mu\text{g/ml}$). T-0 = muestra de sangre completa en el minuto 0 (línea base). T-10 = sangre completa incubada sólo con PBS durante 10 min sin *E. coli*. A otras muestras, con o sin inhibidores, se les había añadido *E. coli*.

La Fig. 7C muestra la aparición súbita (*burst*) oxidante de neutrófilos humanos estimulada por *E. coli* opsonizada en un modelo de sangre completa anti-coagulada con lepirudina. Tanto el MAb 137-26 anti-C5/C5a (círculos negros) como el MAb 137-30 anti-C5 (triángulos negros) inhibía la aparición súbita oxidante más eficazmente que el MAb561 anti-C5a (cuadrados negros). El anticuerpo irrelevante (triángulos negros invertidos) no producía ese efecto. El eje Y representa la intensidad media de fluorescencia (MFI) medida por inmunofluorocitometría. El eje X representa la concentración de los anticuerpos ($\mu\text{g/ml}$). T-0 = muestra de sangre completa en el minuto 0 (línea base). T-10 = sangre completa incubada sólo con PBS durante 10 min sin *E. coli*. A otras muestras, con o sin inhibidores, se les había añadido *E. coli*.

La Fig. 7D muestra la aparición súbita oxidante de neutrófilos humanos estimulada por *E. coli* opsonizada en un modelo de sangre completa anti-coagulada con lepirudina. El MAb 137-26 anti-C5/C5a inhibía más eficazmente la aparición súbita oxidante que un antagonista peptídico C5aR (cuadrados negros). El péptido irrelevante no producía ese efecto. El eje Y representa la intensidad media de fluorescencia (MFI) medida por inmunofluorocitometría. El eje X representa la concentración de los anticuerpos en nM. T-0 = muestra de sangre completa en el minuto 0 (línea base). T-10 = sangre completa incubada sólo con PBS durante 10 min sin *E. coli*. A otras muestras, con o sin inhibidores, se les había añadido *E. coli*.

La Fig. 8 muestra la eliminación mediada por MAC de *Neisseria meningitides* en un modelo de sangre completa anti-coagulada por lepirudina. Las bacterias fueron eliminadas eficazmente por incubación con la sangre humana completa en presencia de MAb 137-26 anti-C5/C5a (círculos negros), un MAb irrelevante (triángulos negros) o PBS (cuadrados blancos). En contraste, las bacterias no fueron eliminadas cuando la sangre completa fue tratada con MAb 137-30 anti-C5 (rombos blancos) que inhibían la activación de C5 y por consiguiente la formación de MAC. El eje Y representa las unidades formadoras de colonias (UFC) por $100 \mu\text{l}$ de sangre completa incubada durante 24 horas a 37°C en agar-sangre. El eje X representa diferentes tiempos en la recogida de muestras de sangre en el experimento de cultivo de sangre completa.

Descripción detallada

1. Ventajas de la invención

Los inhibidores de la invención, incluyendo el anticuerpos monoclonal MAb 137-26, son ventajosos con relación a los inhibidores a base de anticuerpos monoclonales conocidos en el tratamiento de inflamación y lesión de tejidos mediadas por el complemento. El MAb 137-26 es capaz de unirse a C5 antes de que sea activado. A continuación es activada la C5 formando la C5a y el anticuerpo puede neutralizar C5a, que es una anafilatoxina. Normalmente, una vez que se ha formado C5a, se une rápidamente a C5aR en las células, desencadenando con ello la cascada de transducción de señales que conduce a inflamación. El MAb 137-26 no inhibe la escisión de C5 para formar C5a y C5b, sino que C5a permanece unida a MAb 137-26 después de producirse e inhibe la unión de C5a a C5aR. La formación de C5b-9 no se ve afectada, sin embargo, y debido a que C5b-9 es necesario para la formación del MAC, que está implicado en la eliminación de las bacterias, es importante mantener la producción de C5b-9 para una respuesta inmune protectora.

El MAb 137-26 puede neutralizar eficazmente los efectos inflamatorios de C5a, e incluso permitir que otros componentes de la cascada del complemento, incluyendo C3 y C5b-9, medien en las funciones anti-bacterianas. Esta propiedad farmacológica es excepcionalmente importante en el tratamiento de la septicemia bacteriana, las enfermedades por CI crónicas y la psoriasis.

2. Realización y utilización de la invención

A. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando el método del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o pueden prepararse por métodos de DNA recombinante (Patente de EE.UU. Nº 4.816.567).

En el método del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal hospedador apropiado como se ha descrito anteriormente para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Los animales pueden también inmunizarse con construcciones de DNA que expresan las proteínas codificadoras *in vivo* para inducir anticuerpos específicos. Alternativamente, los linfocitos

pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos que se fusionan con las células del mieloma utilizan un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula del hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

5 Las células del hibridoma así preparadas se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parenterales no fusionadas. Por ejemplo, si a las células de mieloma parenterales les falta la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosilo-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluiría típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), las cuales evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

10 Las células de mieloma preferidas son las que se fusionan eficazmente, soportan una producción estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio, tal como medio HAT. Entre estas líneas de células de mieloma están las líneas de mieloma de múridos, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 proporcionadas por The Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA, y las células SP2/0 o X63-Ag8-653 proporcionadas por The American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA. También están descritas las líneas de células de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133-3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). También pueden usarse la línea de célula de mieloma de ratón NS0 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire UK).

20 Se valora la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno del medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células del hibridoma puede determinarse por inmunoprecipitación o por una valoración *in vitro* de la unión, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoenzimático (ELISA).

30 Después de identificar las células del hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por métodos de dilución limitante y cultivarse por métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, el medio D-MEM o PRMI-1640. Además, las células del hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

35 Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, tales como por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

40 El DNA que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente por procedimientos convencionales (Innis M. *et al.*, en *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, Academic, San Diego, CA (1990), Sanger, F.S. *et al. Proc. Nat. Acad. Sci.* 74: 5463-5467 (1977)). Las células del hibridoma sirven como fuente de dicho DNA. Una vez aislado, el DNA puede ser colocado en vectores de expresión, que son transfectedos a continuación a células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células del mieloma que de otra manera no producen la proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. A continuación se describirá con más detalle la producción recombinante de anticuerpos.

45 En una realización adicional, pueden aislarse anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de colección de anticuerpos de fagos generados usando las técnicas descritas en McCafferty, *et al.*, *Nature* 348: 552-554 (1990). Clackson, *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991) y Marks, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos humanos y de múridos, respectivamente, usando colecciones de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por mezclado de las cadenas (Marks, *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para la construcción de colecciones muy amplias de fagos (Waterhouse, *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993)). Así, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridomas de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

55 El DNA también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificadora de los dominios constantes humanos de cadenas pesada y ligera en lugar de las secuencias de múridos homólogas (Pat. de EE.UU. N° 4.816.567; Morrison, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81:6851 (1984)) o uniendo covalentemente a la secuencia codificadora de la inmunoglobulina todo o parte de la secuencia codificadora de un polipéptido no inmunoglobulina.

60 Típicamente, los dominios constantes de un anticuerpo son sustituidos por dichos polipéptidos que no son inmunoglobulinas o son sustituidos por los dominios variables de un sitio de un anticuerpo en el que se combina con el antígeno para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación con el antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio en de combinación con el antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

65 Otra alternativa es utilizar una fusión eléctrica en lugar de una fusión química para formar hibridomas. Esta técnica está bien establecida. En lugar de fusión, también se puede transformar una célula B para hacerla inmortal usando, por

ejemplo, un virus de Epstein Barr, o un gen transformante. (Véase, por ejemplo, “Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity”, Zurawaki, V.R. *et al.*, en *Monoclonal Antibodies*, ed. por Kennett R.H. *et al.*, Plenum Press, N.Y. 1980, pp 19-33).

5 B. Anticuerpos humanos y humanizados

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente, que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia residuos “de importación”, que son obtenidos típicamente de un dominio variable “de importación”. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988); Verheyen, *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano por las secuencias CDR o CDR de roedores. En consecuencia, en dichos anticuerpos “humanizados”, ha sido sustituido un dominio variable humano sustancialmente menor que el intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son anticuerpos típicamente humanos en los que algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos FR están sustituidos por residuos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se usan para formar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado “mejor ajuste”, se selecciona la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor de la colección completa de secuencias humanas de dominio variable conocidas. A continuación se acepta la secuencia humana que esté más próxima a la del roedor como el marco (FR) humano para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro método utiliza un marco particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede usarse el mismo marco para diversos anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Además es importante que los anticuerpos sean humanizados de forma que mantengan la alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados por un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están fácilmente disponibles y son familiares a los expertos en la técnica. Existen programas de ordenador que ilustran y presentan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del probable papel de los residuos en la función de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata a unirse a su antígeno. De este modo, pueden seleccionarse los residuos de FR y combinarse a partir de las secuencias receptoras y de importación para conseguir la característica deseada del anticuerpo, tal como mayor afinidad por el(los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en la unión con el antígeno.

Alternativamente, el experto puede producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que sean capaces, por inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Dichos ratones transgénicos son proporcionados por Abgenix, Inc., Fremont, California y Medarex, Inc., Annandale, New Jersey. Se ha descrito que la supresión (delección) homocigótica del gen de la región de unión (JH) de cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la disposición de genes de inmunoglobulina humanos de línea germinal en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos por inoculación de antígenos. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); y Duchosal *et al.*, *Nature* 355:258 (1992). De las colecciones que presentan fagos también pueden derivarse anticuerpos humanos (Hoogenboom *et al.*, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991); Vaughan, *et al.*, *Nature Biotech* 14:309 (1996)).

55 C. Anticuerpos desinmunizadosTM

Los anticuerpos desinmunizadosTM son anticuerpos en los que han sido eliminados los epítomos potenciales del linfocito T, como se ha descrito en la Solicitud de Patente PCT/GB98/01473. Por consiguiente, se espera que sea eliminada o sustancialmente reducida la inmunogenicidad en seres humanos cuando se multiplican *in vivo*.

Adicionalmente, los anticuerpos pueden modificarse químicamente por conjugación covalente a un polímero para aumentar su semivida en circulación. Los polímeros y métodos para unirlos a los péptidos preferidos se muestran en las Patentes de EE.UU. N^{os} 4.766.106; 4.179.337; 4.495.255; y 4.509.546. Los polímeros preferidos son polioles polioxiethylados y polietilenglicol (PEG). El PEG es soluble en agua a la temperatura ambiente y tiene un peso molecular medio preferido entre 1000 y 40.000, más preferiblemente entre 2000 y 20.000, más preferiblemente entre 3.000 y 12.000.

ES 2 283 594 T3

D. Generación de los MAb anti-C5/C5a

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser generados por métodos de hibridoma tradicionales muy conocidos en la técnica. En resumen, los ratones son inmunizados con C5 purificada procedente de sueros humanos como inmunógeno emulsionado en coadyuvante completo de Freund e inyectado subcutánea e intraperitonealmente en cantidades que varían entre 10-100 μg . Después de 10 a 15 días, los animales inmunizados son revacunados con más C5, emulsionado en coadyuvante completo de Freund. A continuación los animales son periódicamente revacunados en un programa de inmunización semanal a bisemanal.

Para cada fusión, se prepararon suspensiones de una sola célula a partir del bazo de un ratón inmunizado y se usaron para fusión con células de mieloma SP2/0. Las células SP2/0 (1×10^8) y las células de bazo (1×10^8) se fusionaron en un medio que contenía polietilenglicol al 50% (Peso molecular = 1450) (Kodak, Rochester, NY) y dimetilsulfóxido al 5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). A continuación se ajustaron las células hasta una concentración de $1,7 \times 10^5$ células de bazo/ml de la suspensión en medio DMEM (Gibco, Grand Island, NY), complementado con suero bovino fetal al 5% y HAT (hipoxantina sódica 10 nM, aminopterina 40 μM y timidina 1,6 mM). Se añadieron 250 μl de la suspensión celular a cada pocillo de aproximadamente 50 microplacas de 96 pocillos. Después de aproximadamente 10 días se retiraron los líquidos sobrenadantes del cultivo para clasificar la reactividad con C5 humano purificado por ELISA.

Pocillos de microplacas de ensayo Immulon II (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA) se revistieron durante una noche con C5 humano a 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (50 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$). A continuación se saturaron los sitios de unión no específicos en los pocillos por incubación con 200 μl de BLOTTO al 5% (leche desnatada en polvo) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante una hora. A continuación se lavaron los pocillos con tampón PBST (PBS que contiene TWEEN[®] 20 al 0,05%). Se añadieron 50 μl de líquido sobrenadante de cada pocillo de fusión al pocillo revestido junto con 50 μl de BLOTTO durante una hora a la temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con PBST. A continuación se detectaron los anticuerpos unidos por reacción con IgG (Fc específico) anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) durante una hora a la temperatura ambiente. A continuación se lavaron los pocillos con PBST. Se añadió a los pocillos disolución de sustrato de peroxidasa que contenía 3,3,5,5-tetrametilbencidina al 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) y peróxido de hidrógeno al 0,003% (Sigma, St. Louis, MO) en acetato de sodio 0,1M a pH 6,0 para el desarrollo de color durante 30 minutos. Se terminó la reacción por adición de 50 μl de H_2SO_4 2M por pocillo. Se leyó la densidad óptica (DO) a 450 nm con un lector ELISA (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA).

Los hibridomas en pocillos positivos a la reactividad de C5 se clonaron en una sola célula por un método de dilución limitante. A continuación se ampliaron los hibridomas monoclonales y se recogieron los líquidos sobrenadantes del cultivo para purificación por cromatografía con la proteína A. A continuación se caracterizó la reactividad de los anticuerpos purificados con C5 y C5a humanos por ELISA, para la determinación de las constantes de afinidad y unión cinética por BIACORE, para los efectos sobre la hemólisis mediada por el complemento, tanto por la vía clásica como por la vía alternativa y para la inhibición de la fijación de ^{125}I -C5a a neutrófilos humanos purificados.

Los anticuerpos también pueden seleccionarse por el método de selección o clonación (denominado *panning*) de una colección de scFv humanos a los que se une C5 (Griffiths *et al.*, EMBO J. 12:725-734 (1993)). La especificidad y actividad de clones específicos pueden evaluarse por ensayos conocidos (Griffiths *et al.*; Clarkson *et al.*, *Nature*, 352: 642-648 (1991)). Después de una primera etapa de exploración, se obtiene una colección de fagos que contienen una pluralidad de diferentes anticuerpos monocatenarios sobre el fago mejorando la unión al C5. Etapas de exploración subsiguientes proporcionan más colecciones con mayores afinidades de unión. Cuando los efectos de avidéz son un problema, pueden usarse colecciones que presentan fagos monovalentes en las que menos del 20%, menos del 10% o menos del 1% del fago presenta más de una copia de un anticuerpo sobre la superficie del fago. La presentación monovalente puede realizarse con el uso de un fagémido y un fago auxiliar. El fago adecuado incluye el fago filamentoso M13, fl y fd. También se conoce la presentación de la proteína de fusión con las proteínas del revestimiento del virus y pueden usarse en esta invención.

Adicionalmente se caracterizó el MAb 137-26, que se une tanto a la C5 como a la C5a con afinidad comparable. El MAb 137-26 no inhibe la activación de C5, pero inhibe con gran potencia la unión de C5a a C5aR en neutrófilo humanos purificados. Los experimentos que demuestran estas propiedades se explican con más detalle en los Ejemplos siguientes.

Para seleccionar anticuerpos que se unen a un epítipo particular en el antígeno de interés (por ejemplo, los que bloquean la unión de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria al C5), puede realizarse una valoración habitual de bloqueo cruzado, tal como la descrita en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Alternativamente, puede realizarse la cartografía del epítipo, por ejemplo como describen Champe *et al.*, en *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 (1995) para determinar si el anticuerpo se une al epítipo de interés.

E. Preparación de otros inhibidores de la invención

Pueden aislarse o seleccionarse otras moléculas adecuadas para uso en la invención de colecciones (quimiotecas) de compuestos por medios convencionales, por ejemplo, determinando si se unen a C5/C5a, y realizar a continuación una

selección funcional para determinar si inhiben la actividad de C5b. Las Patentes de EE.UU. N° 5.901.069 y 5.463.564 describen un sistema automatizado para generar y seleccionar una colección de compuestos. Métodos más centrados implican una selección competitiva frente al MAb 137-26, o realizar un modelo tridimensional del sitio de unión y a continuación preparar una familia de moléculas que se adaptan al modelo. Se seleccionan entonces las que presentan características de unión óptimas. Además, pueden identificarse otras moléculas por valoración de la competición o una selección funcional de inhibidores con las mismas propiedades que MAb 137-26.

F. Utilización de los inhibidores de la invención

Las moléculas de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía y a una concentración que sea terapéuticamente eficaz para la indicación o finalidad buscada. Para conseguir este objetivo, los anticuerpos pueden formularse empleando una variedad de excipientes aceptables conocidos en la técnica. Típicamente, los anticuerpos se administran por inyección. Los métodos para realizar esta administración son conocidos por los expertos en la técnica. También puede ser posible obtener composiciones que puedan ser administradas por vía tópica u oral, o que puedan ser capaces de transmitirse por las membranas mucosas.

La dosificación y modo de administración dependerá del paciente y del agente que se va a administrar. La dosificación puede determinarse por experimentación habitual en ensayos clínicos o extrapolación de modelos animales en los que fue eficaz el anticuerpo.

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en el tratamiento de enfermedades y estados mediados por la producción excesiva o no controlada de C5a. A continuación se describe la prueba de la utilidad de los inhibidores de la invención en el tratamiento de estas enfermedades y estados.

Ejemplo 1

Reactividad del MAb 137-26 con C5 y C5a humanas

Se analizó la reactividad de MAb 137-26 con C5 y C5a recombinante humanas purificadas (Sigma, St. Louis, MO). Los procedimientos del ELISA se describieron anteriormente. MAb 137-26 se une a C5a de manera dependiente de la dosis con gran potencia (Fig. 1). Otro MAb 137-76 anti-C5, específico de la cadena β de C5 humano, no se une a C5a, debido a que C5a reside en la cadena α de C5. Un anticuerpo irrelevante de isotipo similar usado como control negativo tampoco reacciona con C5a. Por otro lado, tanto MAb 137-26 como MAb 137-76 se unen a C5 (Fig. 2).

La constante de equilibrio de afinidad y las constantes cinéticas de unión (asociación y disociación) de MAb 137-26 con C5a y C5 se determinaron también por un instrumento BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden). Todas las medidas de unión se realizaron en solución salina tamponada de HEPES (HBS) (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM, Tensioactivo P20 al 0,005%) a 25°C. Para medir las constantes del índice de unión de C5 y C5a a MAb 137-26, se inmovilizaron anticuerpos IgG(Fc) anti-ratón de conejo en un chip sensor CM5 por acoplamiento amínico usando N-hidroxisuccínico y N-etil-N'-(3-dietilaminopropil)carbodiimida. A continuación el chip sensor recubierto capturó MAb 137-26 antes de la inyección de C5 a concentraciones diferentes. Los datos se resumen en la Tabla 1. El MAb 137-26 tiene una alta afinidad de unión tanto para la C5a como para la C5 en solución. Los resultados también indican que MAb 137-26 se une a un epítipo compartido tanto por C5a como por C5.

TABLA 1

Constantes cinéticas de C5 y C5a que se unen a MAb 137-26

	k_{ON} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{OFF} (s^{-1})	k_D (M)
C5	$1,42 \times 10^5$	$6,97 \times 10^{-5}$	$4,92 \times 10^{-10}$
C5a	$3,7 \times 10^6$	$2,25 \times 10^{-4}$	$6,09 \times 10^{-11}$

k_{ON} , constante cinética de asociación

k_{OFF} , constante cinética de disociación

k_D , constante de equilibrio de disociación = k_{ON}/k_{OFF}

ES 2 283 594 T3

Ejemplo 2

Hemolisis mediada por el complemento

5 Para estudiar los efectos de MAb 137-26 sobre la activación de C5 en suero humano, se analizó el anticuerpo para determinar la inhibición de la hemolisis mediada por las vías clásica y alternativa del complemento.

Para los experimentos por la vía clásica, se sensibilizaron eritrocitos de pollo (5×10^7 células/ml) en solución salina tamponada de gelatina/veronal (GVB⁺⁺) que contenía MgCl₂ 0,5 mM y CaCl₂ 0,15 mM con inmunoglobulinas purificadas de eritrocitos anti-pollo de conejo a 8 µg/ml (Inter-Cell Technologies, Hoperwell, NJ) durante 15 minutos a 4°C. A continuación se lavaron las células con GVB⁺⁺. Las células lavadas se volvieron a poner en suspensión en el mismo tampón a $1,7 \times 10^8$ células/ml. En cada pocillo de una microplaca de fondo redondo de 96 pocillos, se mezclaron 50 µl de suero humano normal (5,2%) con 50 µl de GVB⁺⁺ de MAb 137-26 diluido en serie o un MAb 175-62 anti-C2 como control positivo. A continuación se añadieron a los pocillos que contenían las mezclas 30 µl de la suspensión de eritrocitos de pollo sensibilizados y lavados. Se mezclaron 50 µl de suero humano normal (5,2%) con 80 µl de GVB⁺⁺ para obtener el fondo de color del suero. Como control negativo se empleó un MAb anti-VIH-1 gp 120 de isotipo similar. La concentración final en el suero humano usada fue 2%. Se incubó la mezcla a 37°C durante 30 minutos. Se agitó la placa en un microagitador de placas durante 15 segundos. A continuación se centrifugó la placa a 300 x g durante 3 minutos. Se recogieron los líquidos sobrenadantes (80 µl) y se transfirieron a pocillos de una microplaca de fondo plano de 96 pocillos para medir la DO a 405 nm por un lector de placas ELISA. El porcentaje de inhibición de la hemolisis se define como:

$$25 \quad 100 \times \frac{[(DO_{\text{sin MAb}} - DO_{\text{fondo de color del suero}}) - (DO_{\text{con MAb}} - DO_{\text{fondo de color del suero}})]}{(DO_{\text{sin MAb}} - DO_{\text{fondo de color del suero}})}$$

La Fig. 3 muestra que MAb 137-26 y el MAb G3-519 control irrelevante no inhiben la hemolisis por la vía clásica de eritrocitos de pollo sensibilizados, mientras que el control positivo, MAb 175-62, inhibe eficazmente la hemolisis. La C2 está implicada específicamente en la vía clásica del complemento.

Para la vía alternativa, se lavaron tres veces eritrocitos de conejo no sensibilizados con solución salina tamponada de gelatina/veronal (GVB/Mg-EGTA) que contenía MgCl₂ 2mM y EGTA 1,6 mM. Se usó EGTA a una concentración de 10 mM para inhibir la vía clásica (K. Whaley *et al.*, en A.W. Dodds (Ed.), *Complement: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, 1997, pp 19-47). Los procedimientos de valoración son similares a los de la valoración de la hemolisis por la vía clásica antes descritos. La concentración final del suero humano utilizado en la valoración era del 10%. Se usó MAb 166-32 anti-factor D como control positivo. Como control negativo se usó el mismo MAb anti-VIH-1 gp 120 irrelevante del mismo isotipo antes descrito.

La Fig. 4 muestra que MAb 137-26 no inhibe la hemolisis por la vía alternativa de eritrocitos de conejo no sensibilizados, mientras que el MAb 166-32 anti-factor D inhibe fuertemente la hemolisis. El factor D es específico para la vía alternativa del complemento. El anticuerpo control negativo no produce ningún efecto.

Considerados juntos, los resultados verifican que MAb 137-26 no inhibe la activación de C5 y por consiguiente no es inhibida la formación de C5a y C5b-9. el MAb-137-26 no inhibe la activación de las vías clásica y alternativa del complemento.

Ejemplo 3

Inhibición de la unión de ¹²⁵I-C5a a neutrófilos humanos purificados por MAb 137-26

Se purificaron neutrófilos humanos a partir de sangre completa humana y se diluyeron con Dextran T-500/solución salina. La mezcla se incubó a la temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos o hasta que apareció una capa superficial claramente definida. Esta capa superficial se transfirió a un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 ml. Después de la centrifugación, el sedimento celular se puso en suspensión en 30 ml de PBSB frío (BSA al 1% en PBS). La suspensión celular se extendió en capas sobre la parte superior de 10 ml de Histopaque-1077 (Sigma, St. Louis, MO) en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 ml. Después de otra centrifugación, el sedimento celular se volvió a poner en suspensión en 20 ml de NaCl al 0,2% frío durante 30 segundos para lisar los eritrocitos. A continuación, se añadieron 20 ml de NaCl al 1,6% frío a la suspensión celular, se volvió a centrifugar y a continuación se volvieron a poner en suspensión los neutrófilos en PBSB. Se mantuvieron los neutrófilos en hielo hasta que se utilizaron para la unión ¹²⁵I-C5a.

El MAb 137-26 se diluyó en serie en tubos de centrifuga Eppendorf de 1,5 ml con un tampón de unión (medio BSA al 1% en RPMI1640) obteniendo concentraciones finales que variaban de 640 nM a 0,04 nM. Se añadieron 4 µl de ¹²⁵I-C5a 4 nM (NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA) a 36 µl de MAb 137-26 diluido para incubación a la temperatura ambiente durante 15 minutos. Como control positivo se usó C5a humana recombinante purificada (Sigma, St. Louis, MO), mientras que como control negativo se usó anticuerpo monoclonal irrelevante de isotipo similar. Para

ES 2 283 594 T3

la unión máxima de ^{125}I -C5a, se usaron en cambio $36\ \mu\text{l}$ del tampón de unión sin los anticuerpos o C5a. Para incubación en hielo se añadieron a cada tubo $50\ \mu\text{l}$ de la suspensión de neutrófilos. Al final de un periodo de incubación de 40 minutos, se transfirió la mezcla de cada tubo a la parte superior de un otro tubo Eppendorf que contenía $800\ \mu\text{l}$ de un tampón de separación (BSA al 6% en PBS). A continuación se centrifugaron los tubos a $2000\ \times\ g$ durante 3 minutos a la temperatura ambiente. Después que se aspiró el líquido sobrenadante, el sedimento celular se volvió a poner en suspensión en $0,5\ \text{ml}$ de agua desionizada para lisar las células. A continuación se mezcló el lisado celular con $3\ \text{ml}$ de fluido de centelleo Ulmina Gold (Packard Instrument, Meriden, CT) para recuento radiactivo.

El porcentaje de inhibición de la unión de ^{125}I -C5a se define como:

$$[\text{Cpm}_{\text{max}} - \text{Cpm}_{\text{fondo}}] - [\text{Cpm}_{\text{ac}} - \text{Cpm}_{\text{fondo}}] \times 100$$

en donde:

Cpm_{max} = recuento máximo por minuto sin agentes competidores;

$\text{Cpm}_{\text{fondo}}$ = recuento máximo del fondo sin adición de ^{125}I -C5a; y

Cpm_{ac} = recuento máximo con agentes competidores.

La Fig. 5 muestra la inhibición de la unión de (^{125}I)-C5a humana radioyodada a neutrófilos humanos purificados. El MAb 137-26 es más potente que la C5a no marcada para inhibir la unión de ^{125}I -C5a a neutrófilos humanos purificados. La dosis para inhibir el 50% (DI_{50}) para el MAb 137-26 fue $0,45\ \text{nM}$ en comparación con C5a $30\ \text{nM}$.

Ejemplo 4

Cartografiado del epítipo de unión del MAb 137-26 a C5a humana por péptidos obtenidos por la denominada síntesis SPOT¹ (en lo sucesivo péptidos SPOT) sobre membrana de celulosa

El epítipo de unión del MAb 137-26 a la C5a humana se cartografió por una técnica que usaba péptidos SPOT sintetizados por Sigma Genosys (The Woodlands, TX). Se sintetizaron péptidos solapantes (12-mero) que abarcan la C5a humana completa sobre una membrana de celulosa. En la misma valoración, se trató en primer lugar la membrana con una solución de bloqueo TBSTB (Tris-cloruro $10\ \text{mM}$, cloruro de sodio $250\ \text{mM}$, albúmina de suero bovino al 1% y TWEEN 20 al 0,05%) durante 1 hora a la temperatura ambiente para saturar todos los sitios de unión no específicos. A continuación se añadió MAb 136-26 a $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ en la solución de bloqueo a la membrana durante 1 hora a la temperatura ambiente. A continuación se lavó completamente la membrana con un tampón de lavado TBST (Tris-cloruro $10\ \text{mM}$, cloruro de sodio $250\ \text{mM}$ y TWEEN[®] 20 al 0,05%). A continuación se trató la membrana con anticuerpo IgG (Fc) anti-ratón de cabra conjugado con HRP (diluido 1:5.000 en el tampón de bloqueo) (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) durante 1 hora a la temperatura ambiente. La membrana se lavó de nuevo. La unión de MAb 137-26 a cada uno de los péptidos SPOT de C5a se detectó por incubación con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Pico (Pierce, Rockford, IL). La intensidad de la quimioluminiscencia se detectó a continuación por exposición a una película Kodak X-OMAT AR (Rochester, NY). La Figura 6 muestra la secuencia del epítipo unido por MAb 137-26.

Ejemplo 5

*Modelo de sangre completa humana ex vivo para estudiar la inflamación mediada por el complemento: Efecto del MAb 137-26 sobre la activación de los neutrófilos por *E. coli* y sobre la eliminación de *Neisseria meningitidis**

Para investigar el papel del complemento en el retículo inflamatorio complejo, necesitan estar presentes todos los potenciales mediadores celulares de la fase fluida y por consiguiente poder interactuar simultáneamente. Para idear dicho estado experimental *in vitro*, se utilizó sangre completa humana. En este modelo, se usó como anticoagulante lepirudina (REFLUDAN[®]), un análogo de hirudina específico de la trombina, en lugar de heparina. Igual que la heparina, la lepirudina no interfiere con la activación del complemento.

En este sistema modelo, el MAb 137-26 bloqueó los efectos inflamatorios de la C5a formada como resultado de la activación del complemento por *E. coli*. El anticuerpo no inhibía la eliminación de *N. meningitidis* mediada por MAC. Por consiguiente, el MAb 137-26 neutraliza C5a sin inhibir la activación de C5 y la formación subsiguiente de MAC. Esto es un aspecto importante de los anticuerpos monoclonales de la presente invención.

Se recogió sangre completa en tubos de polipropileno que contenían lepirudina ($50\ \mu\text{g}/\text{ml}$). La sangre completa anticoagulada se incubó previamente con PBS o inhibidores anti-C5 durante 4 minutos a 37°C . Para los estudios de la expresión de CD11b y la aparición súbita oxidante en los neutrófilos, se añadió la cepa de *E. coli* opsonizada LE392 (ATCC 33572) a las muestras de sangre completa durante 10 minutos a 37°C . La concentración de *E. coli* era $1 \times 10^7/\text{ml}$ de sangre en los experimentos de CD11b y $1 \times 10^8/\text{ml}$ en los experimentos de la aparición súbita

¹ Se trata de una síntesis simultánea de múltiple péptidos en sitios separados sobre una membrana portadora homogénea

ES 2 283 594 T3

oxidante. Se trató inmediatamente la muestra en la línea base T-0. Después de incubación, se utilizaron 100 μ l de las muestras para medir la expresión de CD11b en neutrófilos por inmunofluorocitometría. La aparición súbita oxidante de los neutrófilos activados se midió usando el sustrato dihidro-rodamina 123 y procediendo como se ha descrito en el método de ensayo de aparición súbita (ORPEGEN Pharma, Heidelberg, Germany).

5

Las figuras 7A - 7D representan los resultados de las valoraciones por citometría de flujo de la activación de neutrófilos para la expresión de CD11b y la aparición súbita. El MAb 137-26 anti-C5/C5a inhibía eficazmente la activación de neutrófilos inducida por *E. coli* en el modelo de inflamación con sangre completa humana. En estas valoraciones, el MAb 137-26 es más potente que el Mab561 anti-C5a (Dr. Jurg Kohl) y un antagonista C5aR peptídico (Dr. Stephen Taylor).

10

Para las valoraciones bactericidas, se cultivó *N. meningitidis* H44/76-1 durante una noche sobre BHI-agar, se subcultivó y se desarrolló en fase logarítmica durante 4 horas. Se añadieron 5000 - 10000 unidades formadoras de colonias (UFC) a 1,1 ml de muestras de sangre completa anti-coagulada con lepirudina incubadas previamente durante 5 minutos con PBS o anticuerpo. En cada periodo de tiempo, se sembraron 100 μ l de sangre completa sobre placas microbiológicas de Petri que contenían agar con sangre y se incubaron durante 24 horas a 37°C. El desarrollo bacteriano se expresó como UFC/100 μ l de sangre completa añadida. Se obtuvo la muestra T-0 inmediatamente después de añadir la bacteria.

15

20

La Fig. 8 muestra que el MAb 137-26 no inhibía la supresión de *Neisseria meningitidis* mediada por MAC. En contraste, el MAb 137-30 inhibía la supresión de *Neisseria meningitidis* por la sangre completa humana. Este anticuerpo inhibe la activación de C5.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 283 594 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o uno de sus fragmentos que se une al C5 y C5a, pero no evita la activación de C5 ni evita la formación ni inhibe la actividad de C5b.
2. Un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 1, que se une a C5a libre con igual o mejor afinidad que a C5.
- 10 3. Un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 1, que inhibe la unión de C5a a C5aR.
4. Un anticuerpo o uno de sus fragmentos que se une al mismo epítipo de C5 que el anticuerpo monoclonal 137-26 que se produce a partir del hibridoma depositado en ATCC y denominado PTA-3650.
- 15 5. Un anticuerpo o fragmento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
6. Un fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fv y Fv monocatenario.
- 20 7. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo en el que han sido eliminados los epítopos potenciales de los linfocitos T, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 25 8. El anticuerpo monoclonal 137-26 producido a partir del hibridoma depositado en ATCC y denominado PTA-3650.
9. La línea celular del hibridoma que se cita en la reivindicación 8.
- 30 10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el fragmento de acuerdo con la reivindicación 6 o el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, y un vehículo, excipiente, estabilizador o diluyente farmacológicamente aceptable.
- 35 11. El uso del anticuerpo o fragmento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de C5a.
- 40 12. El uso del anticuerpo o fragmento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o estado que está mediado por la producción excesiva o no controlada de C5a.
- 45 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, en el que el medicamento ha de administrarse por infusión intravenosa, inyección intravenosa rápida, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, subcutánea, intranasal, intra-traqueal, intraespinal, intracraneal o por vía oral.
- 50 14. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la enfermedad o estado es el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS).
- 55 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la enfermedad o estados es lesión por isquemia miocárdica-reperusión.
16. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la enfermedad o estado es septicemia.
17. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la enfermedad o estado es una enfermedad autoinmune.
18. El uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la enfermedad autoinmune es artritis reumatoidea, lupus eritematoso sistémico o psoriasis.
19. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la enfermedad o estado es lesión de los tejidos o una respuesta inflamatoria inducida por complejos inmunes (IC).
- 60 20. Un método de diagnóstico que comprende detectar la cantidad de C5 o C5a que está presente en una muestra con el anticuerpo o fragmento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 65 21. El método de diagnóstico de la reivindicación 20, en el que el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 137-26 que se produce a partir del hibridoma depositado en ATCC y denominado PTA-3650.
22. Un procedimiento *ex vivo* para identificar un inhibidor que se une a C5 y C5a, pero no evita la activación de C5 ni evita la formación ni inhibe la actividad de C5b, comprendiendo dicho procedimiento:

ES 2 283 594 T3

(i) determinar si un compuesto se une a C5 y C5a; y

(ii) determinar si el compuesto de ensayo inhibe la actividad de C5b.

5 23. Un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende el procedimiento de la reivindicación 22 y además combinar el compuesto de ensayo con un vehículo, excipiente, estabilizador o diluyente.

10

15

20

25

30

35

40

45

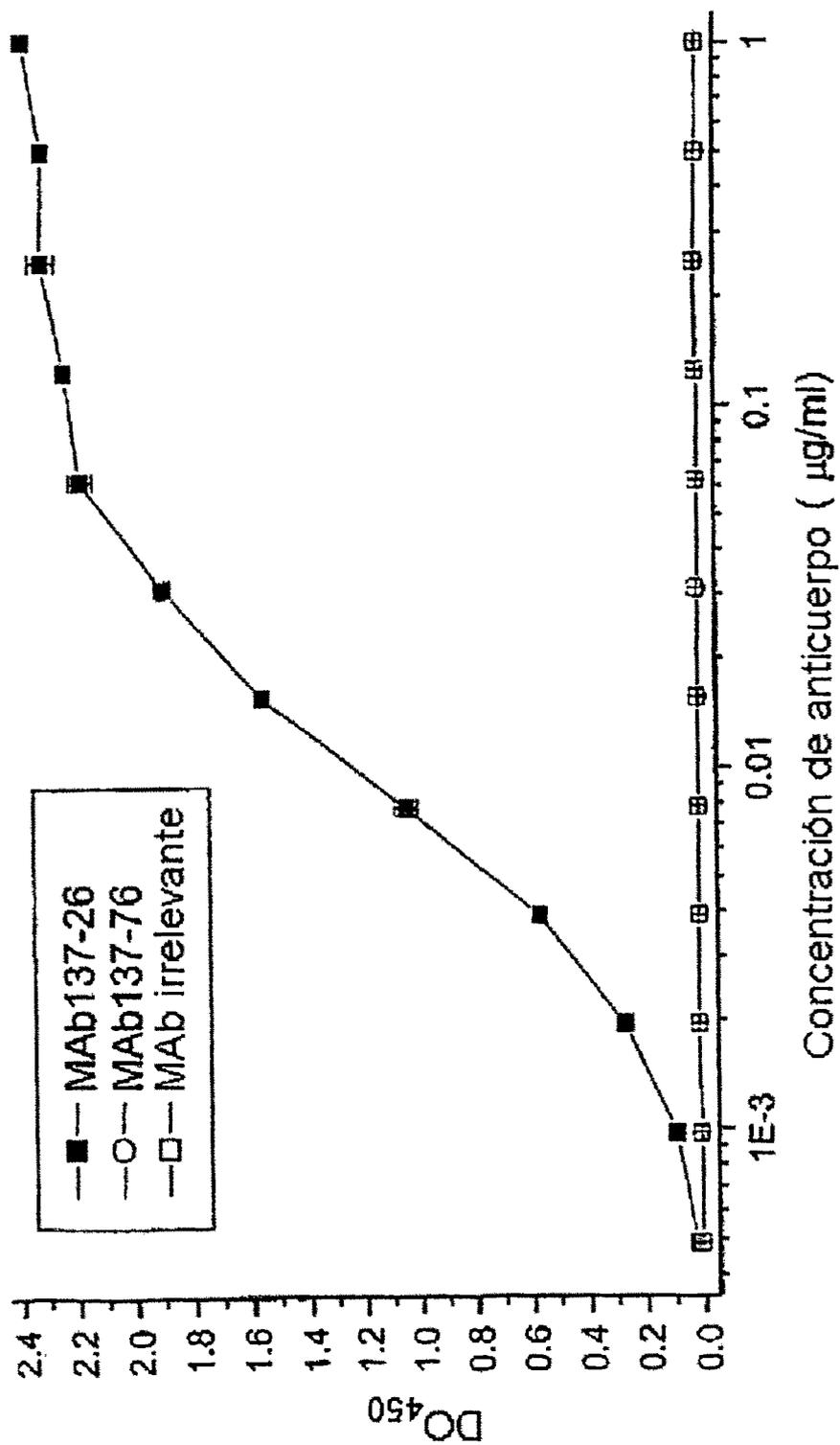
50

55

60

65

Fig. 1 Reactividad del MAb137-26 con la proteína C5a en ensayo ELISA



**Fig. 2 Reactividad del MAb137-26 con la proteína C5 en
en ensayo ELISA**

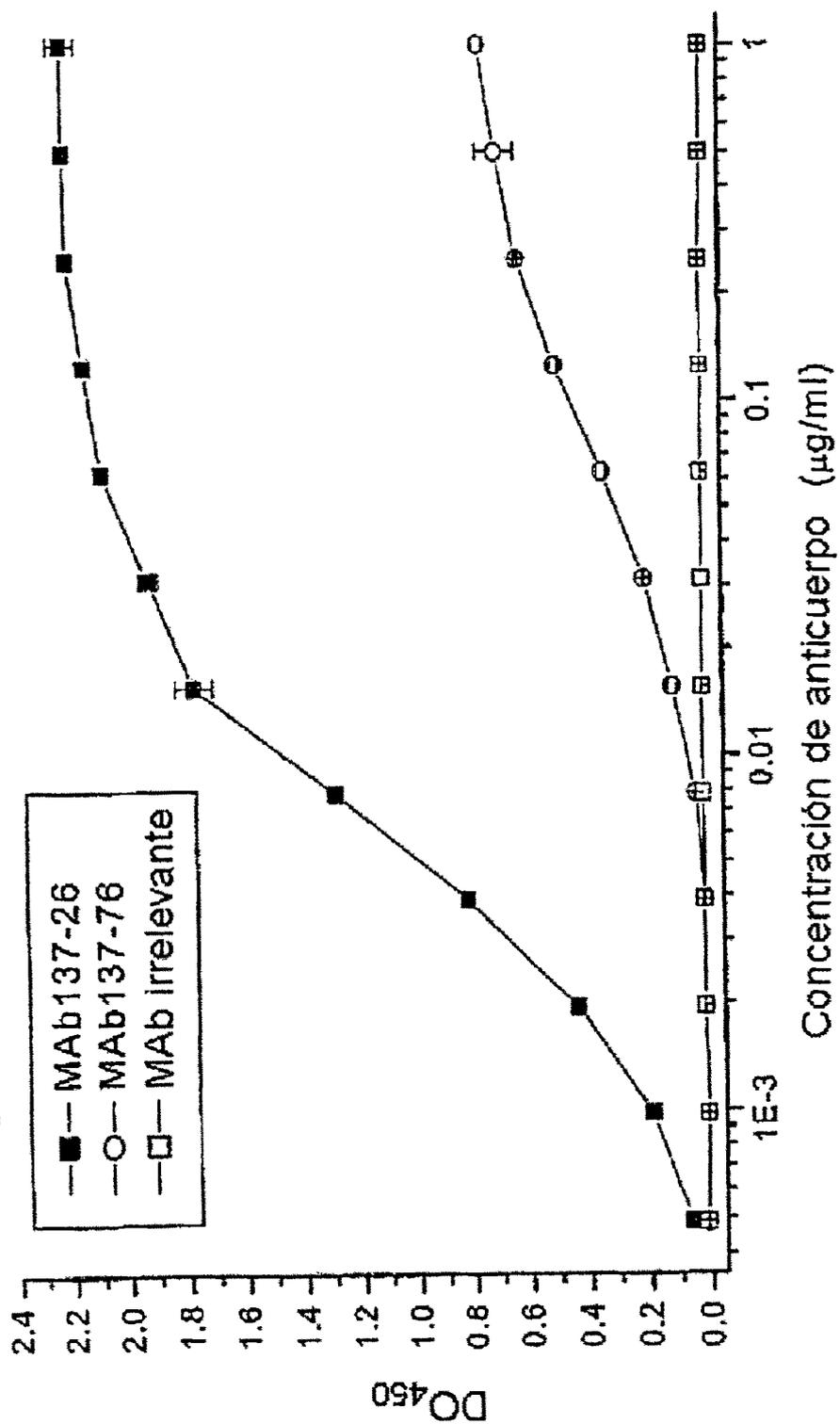


Fig. 3 No inhibición de la hemólisis por CP del complemento mediante MAb137-26

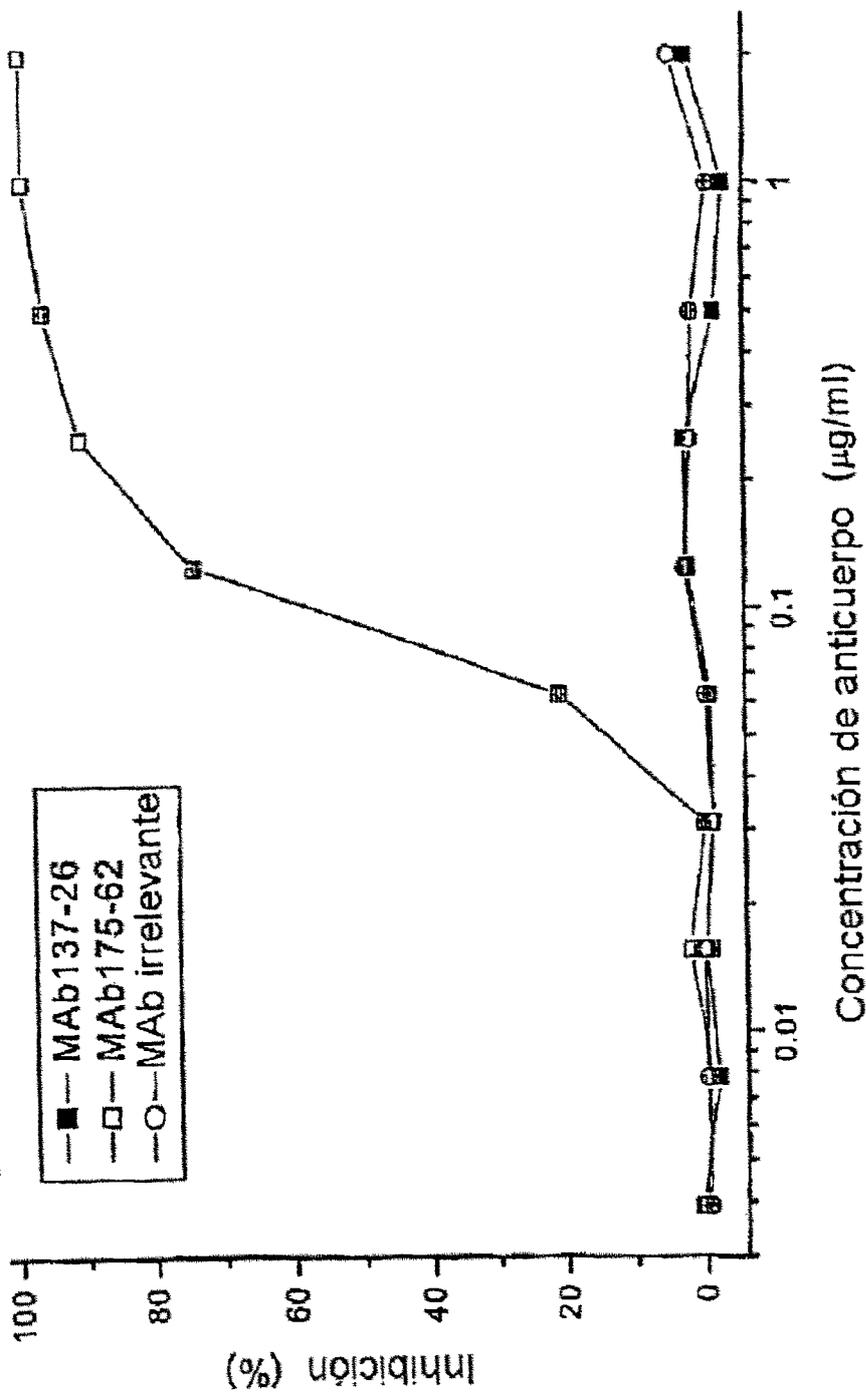


Fig. 4 No inhibición de la hemólisis por AP del complemento mediante MAb137-26

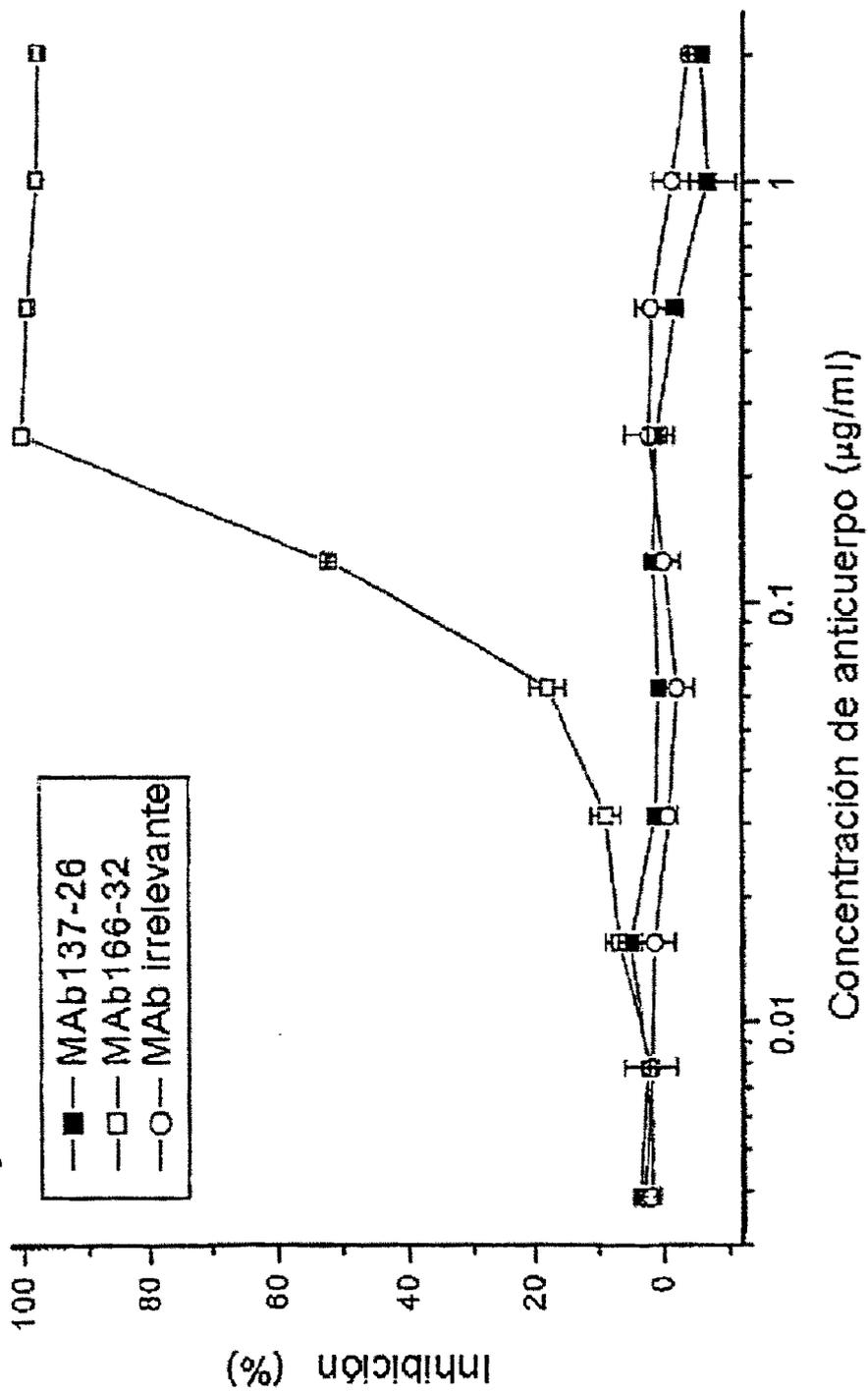


Fig. 5 Inhibición de la unión de ¹²⁵I-C5a a neutrófilos humanos por el MAb137-26

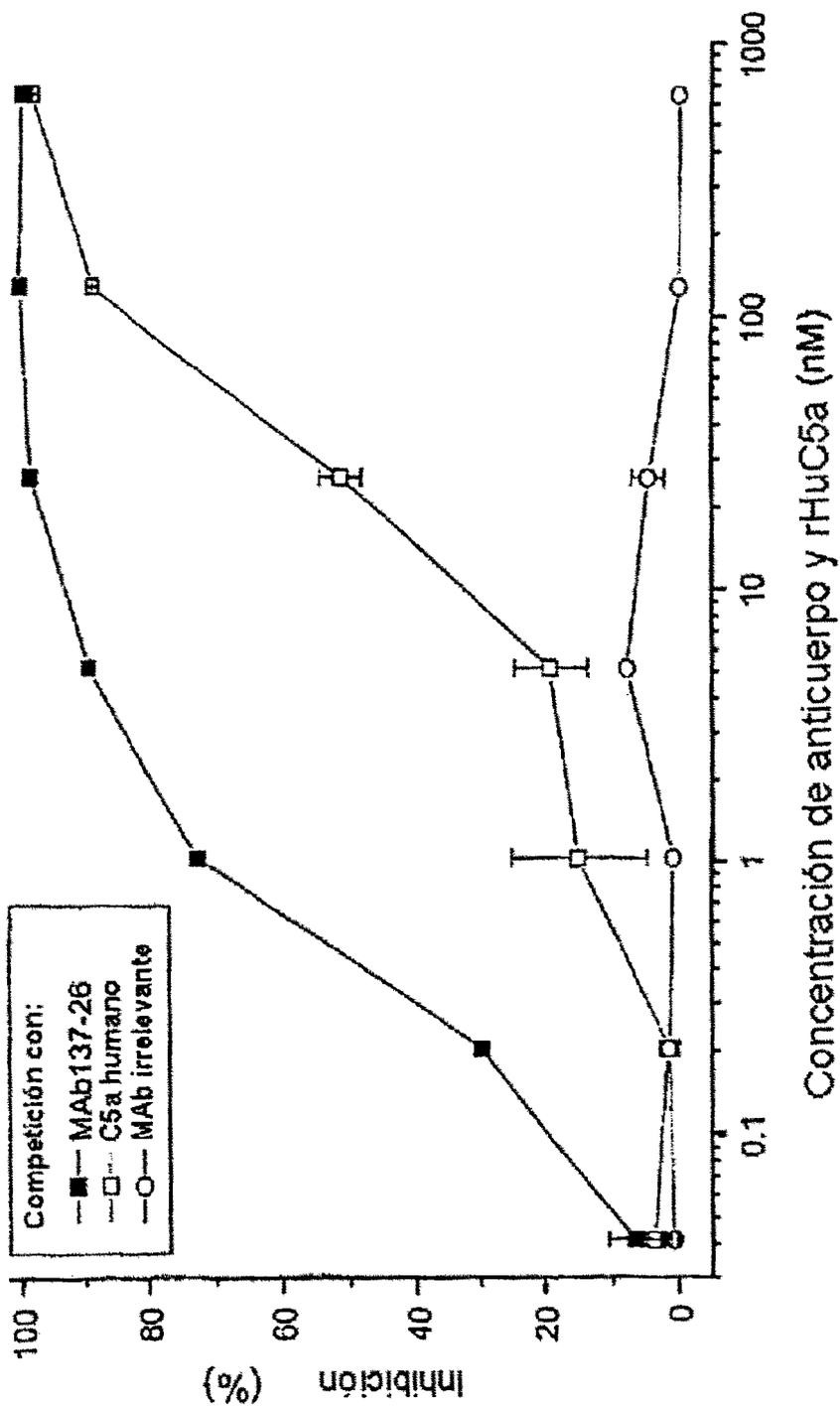


Figure 7A
El MAb137-26 anti-C5/C5a inhibe la expresión de CD11b en
neutrófilos humanos estimulados por E. coli en un modelo de
sangre completa

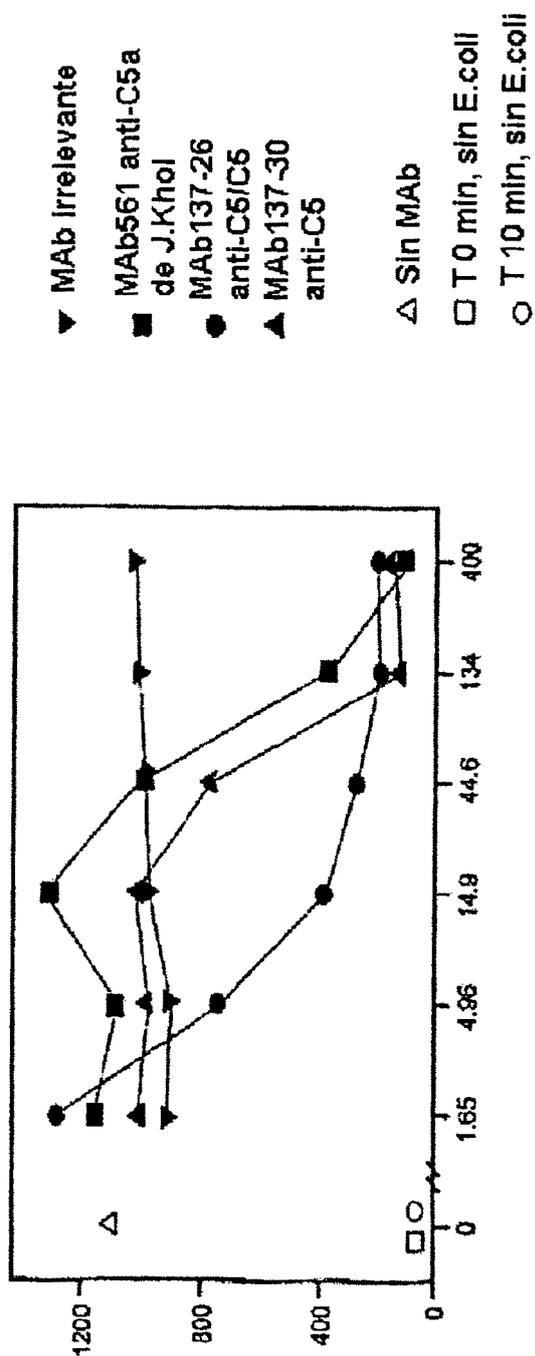


Figura 7B. El MAb137-26 anti-C5/C5a inhibe la expresión de CD11b en neutrófilos humanos estimulados por E.coli en sangre completa

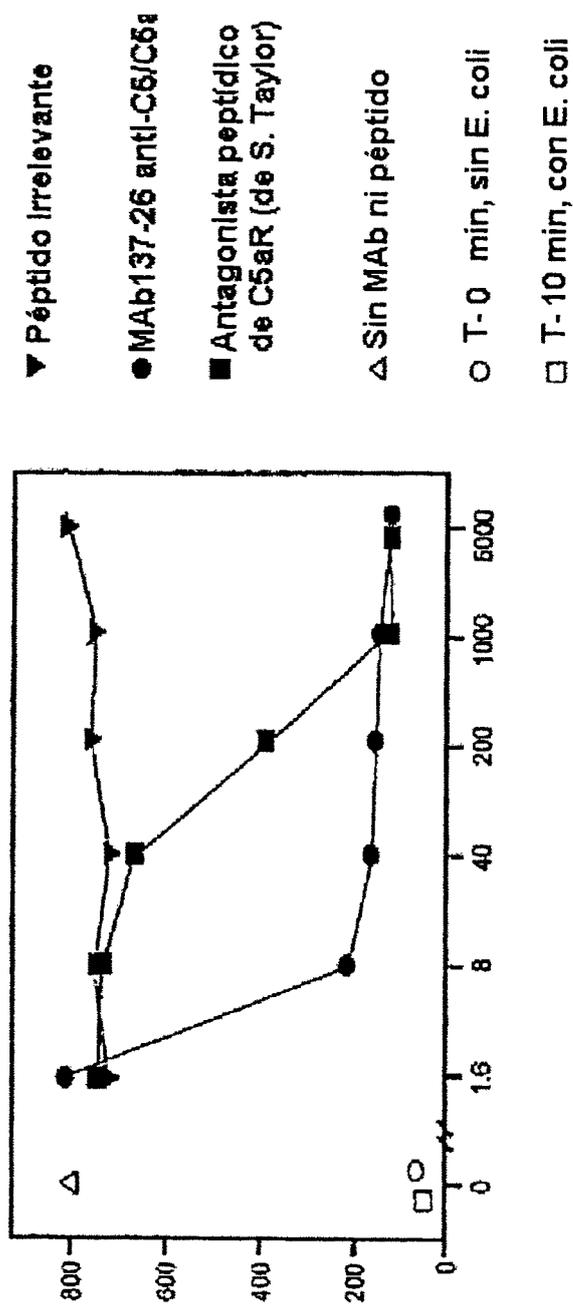


Figura 7c. El MAb anti-C5/c5a Inhibe la aparición súbita oxidante de neutrófilos humanos por E. coli en un modelo de sangre completa

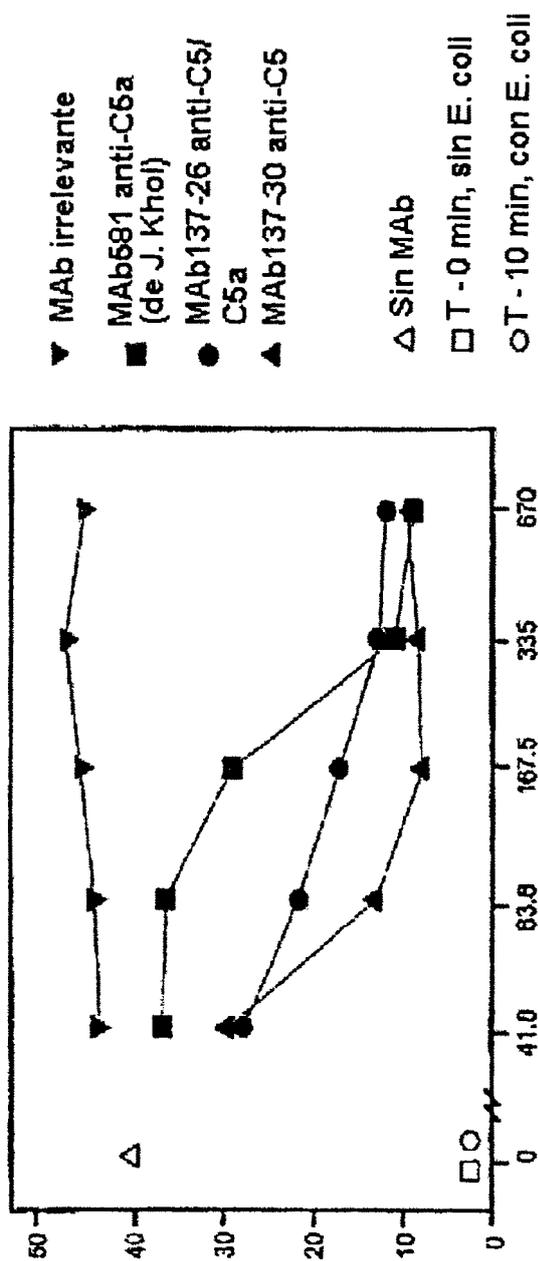
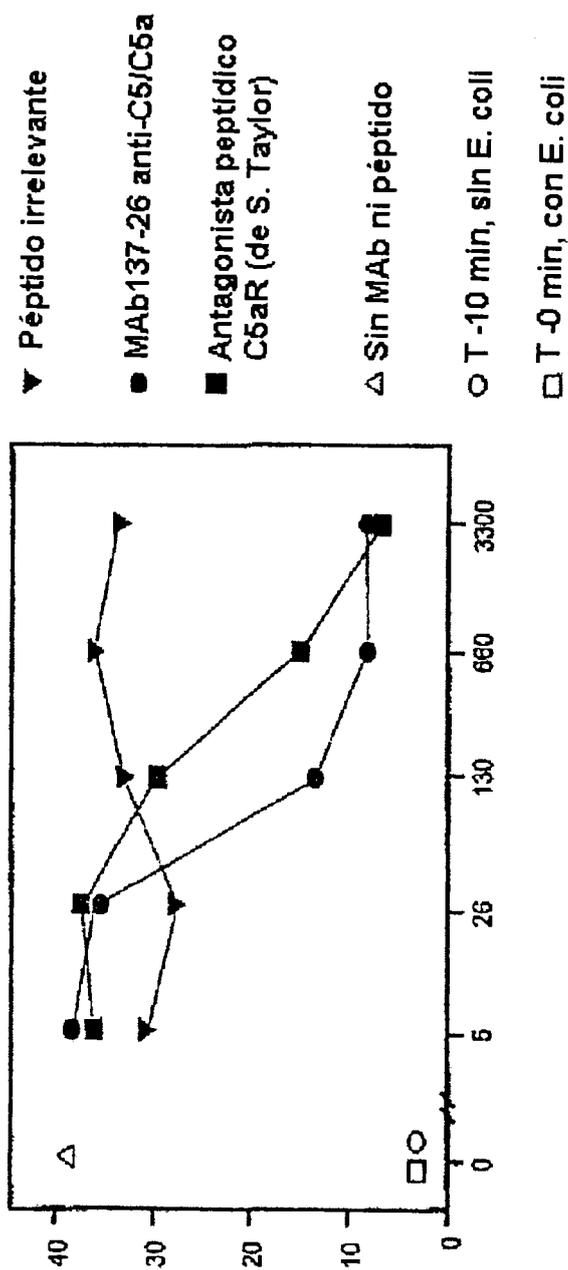
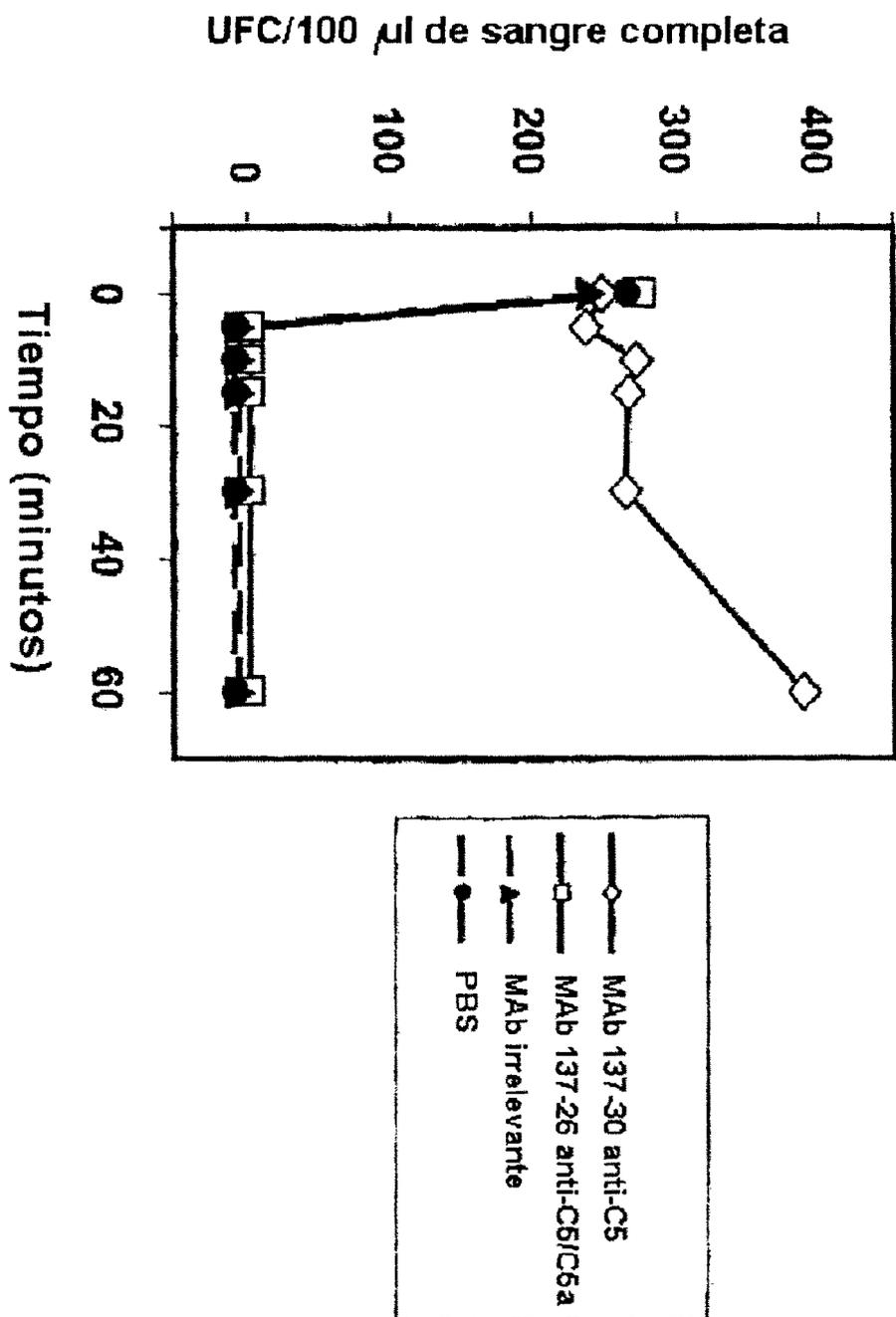


Figura 7D. El MAb137-26 anti -C5/C5a inhibe la aparición súbita oxidante de neutrófilos humanos estimulada por E. coli en un modelo de sangre completa





ES 2 283 594 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> TANOX, INC.

5 <120> INHIBIDORES DE LA VÍA DEL COMPLEMENTO QUE SE UNEN A C5 Y C5a SIN IMPEDIR LA FORMACIÓN DE C5b

10 <130> P26272EP-PCT

<140> EP02768574.2

<141> 17 de agosto de 2002

15 <150> US60313137

<151> 17 de agosto de 2001

20 <160> 7

<170> PatentIn versión 32

<210> 1

25 <211> 74

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1) .. (74)

35 <223>

<400> 1

40 Thr Leu Gln Lys Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala Lys Tyr Lys His Ser
1 5 10 15

45 Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu
20 25 30

50 Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu Gly Pro Arg Cys Ile
35 40 45

55 Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser Gln Leu Arg Ala Asn
50 55 60

60 Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg
65 70

<210> 2

60 <211> 12

<212> PRT

<213> *homo sapiens*

65 <220>

<221> PÉPTIDO

ES 2 283 594 T3

<222> (1) .. (12)
<223> Fragmento de C5a humana desde el aa 29 hasta el aa 40

5 <400> 2
Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg
1 5 10

10 <210> 3
<211> 12
<212> PRT
15 <213> *Homo sapiens*

<220>
<221> PÉPTIDO
20 <222> (1) .. (12)
<223> Fragmento de C5a humana desde el aa 32 hasta el aa 43

<400> 3
25 Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu
1 5 10

30 <210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <220>
<221> PÉPTIDO
40 <222> (1) .. (12)
<223> Fragmento de C5a humana desde el aa 35 hasta el aa 46

<400> 4
45 Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu Gly Pro Arg
1 5 10

<210> 5
50 <211> 12
<212> PRT
<212> *Homo sapiens*

55 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1) .. (12)
60 <221> Fragmento de C5a humana desde el aa 29 hasta el aa 40

<400> 5
65 Ala Ala Arg Ile Ser Leu Gly Pro Arg Cys Ile Lys
1 5 10

ES 2 283 594 T3

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1) .. (12)

<223> Fragmento de C5a humana desde el aa 32 hasta el aa 43

15 <400> 6

Ile	Ser	Leu	Gly	Pro	Arg	Cys	Ile	Lys	Ala	Phe	Thr
1				5					10		

20 <210> 7

<211> 12

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> PÉPTIDO

30 <222> (1) .. (12)

<223> Fragmento de C5a humana desde el aa 35 hasta el aa 46

<400> 7

35

Gly	Pro	Arg	Cys	Ile	Lys	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys
1				5					10		

40

45

50

55

60

65