

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 275**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A01N 37/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04752211 .5**
96 Fecha de presentación: **14.05.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1628530**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2006**

54 Título: **Métodos y composiciones para la prevención y el tratamiento de la sepsis**

30 Prioridad:
15.05.2003 US 470681 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.09.2012

73 Titular/es:
Genentech, Inc.
1 DNA Way
South San Francisco CA 94080-4990, US y
MEDINNOVA AS

72 Inventor/es:
FUNG, Sek Chung y
MOLLNES, Tom Eirik

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 387 275 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

Métodos y composiciones para la prevención y el tratamiento de la sepsis.

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere en general a métodos y composiciones para la prevención y el tratamiento de la sepsis y particularmente al uso de una combinación de inhibidores de complemento e inhibidores de la vía de CD14 para prevenir o tratar la sepsis.

10

Descripción de la técnica anterior

Complemento

15

[0002] El sistema inmune protege al cuerpo frente a bacterias patogénicas, virus, parásitos y otros organismos dañinos. El sistema inmune se divide en dos componentes, el sistema humoral y el sistema celular. En general, el sistema humoral incluye el sistema de complemento y la producción de anticuerpos para defenderse contra patógenos. El sistema de complemento, o simplemente complemento, implica la producción de proteínas que ayudan a los anticuerpos en la defensa del huésped. El complemento es un grupo de por lo menos 30 proteínas unidas a superficie y solubles. La actividad de las proteínas solubles se destruye al calentar el suero a 56°C durante 30 minutos. Las proteínas de complemento están implicadas en la opsonización de microorganismos para fagocitosis, eliminación directa de microorganismos mediante lisis, atracción quimiotáctica de leucocitos a sitios de inflamación, activación de leucocitos y procesamiento de complejos inmunes.

20

25

[0003] Las proteínas de complemento trabajan en una cascada en la que la unión de una proteína induce la unión de la siguiente proteína en la cascada. La activación de la cascada conduce a la liberación de péptidos pequeños biológicamente activos llamados anafilatoxinas (C3a, C4a, y la más potente C5a) que contribuyen a la reacción inflamatoria y finalmente en la formación de un complejo de ataque de membrana (C5b-9 o MAC) que puede lisar la célula diana. Las moléculas de complemento diferentes son sintetizadas por diferentes tipos de células, por ejemplo, fibroblastos y células epiteliales intestinales producen C1, mientras que la mayoría de los componentes son sintetizados en el hígado.

30

35

[0004] Los componentes y el mecanismo del sistema de complemento son conocidos. Básicamente, existen tres mecanismos de complementos, el mecanismo clásico, el mecanismo de lectinas y el mecanismo alternativo. El mecanismo clásico se desencadena principalmente mediante complejos inmunes que contienen antígeno e IgG o IgM, pero también mediante otros agentes como proteína reactiva C. El mecanismo de lectinas se desencadena mediante la unión de la lectinas de unión a manosa (MBL) o ficolinas a estructuras de carbohidrato (por ejemplo, manano) en superficies exógenas. El mecanismo alternativo se activa principalmente mediante la repetición de polisacáridos y otras estructuras poliméricas, tales como los hallados en bacterias.

40

45

[0005] El mecanismo clásico se active cuando los dominios globulares de C1q (parte del complejo C1qrs) se unen a los fragmentos de Fc de IgM o moléculas múltiples de IgG. En presencia de iones de calcio, esta unión provoca la activación autocatalítica de dos moléculas de C1r. Las moléculas de C1r activan dos moléculas de C1s. La C1s es una serín proteasa que separa C4a de C4b. C4b se une inmediatamente a proteínas adyacentes o carbohidratos en la superficie de la célula diana y, a continuación, se une a C2 en presencia de iones de magnesio. C1s separa C2b de este complejo, produciendo la C3 convertasa del mecanismo clásico, C4b2a. La C3 convertasa separa varios cientos de moléculas de C3 en C3a y C3b. Algunas moléculas de C3b se volverán a unir a C4b2a para producir la C5 convertasa del mecanismo clásico, C4b2a3b. La C5 convertasa separa C5 en C5a y C5b. C5b se une a la superficie de la célula, iniciando la formación de MAC.

50

55

[0006] C3a, C4a, y C5a son todas anafilatoxinas. C3a y C5a también son quimioattractores. C3a y C5a tiene la capacidad unirse a mastocitos y basófilos. C5a es también un potente activador de neutrófilos, basófilos y macrófagos y provoca la inducción de moléculas de adhesión en células endoteliales vasculares. C5a también regula por descenso los neutrófilos y los monocitos. Cuando C3a y C5a se unen a sus receptores en los mastocitos y basófilos, estas células liberan histamina y otros péptidos altamente activos en la sangre y los tejidos. Estos péptidos incrementan la permeabilidad de las paredes vasculares permitiendo que los neutrófilos migren en el área. Los neutrófilos son inducidos posteriormente a migrar al sitio de activación del complemento debido al potente efecto quimiotáctico (atrayente) de C5a. Los neutrófilos fagocitan los patógenos invasores y también liberan mediadores que atraen macrófagos al sitio de la infección. Estas células también presentan la capacidad de fagocitar células invasoras y posteriormente inducen la respuesta inflamatoria y eliminan de manera eficaz muchos de los microorganismos de las infecciones.

60

65

[0007] El "mecanismo de lectinas" es similar al mecanismo clásico, a excepción de que se inicia mediante la lectina dependiente de calcio MBL que se une a grupos manosa terminales en la superficie de las bacterias. La MBL es análoga a C1q. Cuando la MBL se une a su diana, se libera y, de este modo, activa tres serín proteasas asociadas conocidas como MASP1, MASP2 y MASP3 (serín proteasa asociada a lectina de unión a manosa),

que son análogas a C1r y C1s. Entre ellas, la MASP2 juega el papel clave en la separación de C4 en C4b y C4a y C2 en C2b y C2a. Después de la activación de C4 y C2, el mecanismo de lectinas es idéntico al mecanismo clásico.

5 **[0008]** El mecanismo de complemento alternativo implica un bucle de amplificación utilizando C3b producido por el mecanismo clásico. Algunas moléculas de C3b generadas por la C3 convertasa del mecanismo clásico se canalizaron al mecanismo alternativo. La C3b unida a superficie se une al Factor B para producir C3bB, que se convierte en un sustrato para el Factor D. El factor D es una serín proteasa que separa el fragmento Ba, dejando C3bBb unida a la superficie de la célula diana. C3bBb se estabiliza por properdina (P), formando el complejo C3bBbP, que actúa como la C3 convertasa del mecanismo alternativo. Como en el mecanismo clásico, la C3 convertasa participa en un bucle de amplificación para separar muchas moléculas de C3, dando lugar a la deposición de moléculas C3b en la célula diana. Algunas de estas moléculas de C3b se vuelven a unir a C3bBb para formar C3bBb3b, la C5 convertasa del mecanismo alternativo. La C5 convertasa separa C5 en C5a y C5b. C5b se une a la superficie de la célula para iniciar la formación del complejo de ataque de membrana.

15 **[0009]** Los mecanismos clásicos, de lectinas y alternativo acaban todos con la formación de C5 convertasa. La C5 convertasa conduce al ensamblaje del MAC a través del mecanismo lítico. Los componentes C5-C8 se unen entre sí en tándem e inducen la inserción de uno o más monómeros de C9 en la bicapa lipídica de la célula diana. Esta inserción conduce a la formación de poros que causan el influjo de calcio con la posterior activación celular de células nucleadas o lisis celular y la muerte si el ataque es suficientemente largo.

El mecanismo de CD14

25 **[0010]** CD14 es una glicoproteína unida a glicofosfatidilinositol (GPI) de 53kD y actúa como receptor de endotoxina (LPS) de afinidad elevada en la superficie de monocitos, macrófagos y granulocitos. Dado que CD14 es una proteína unida a GPI no tiene parte transmembrana o intracelular que pueda transmitir señales. CD14 también está presente en forma soluble en suero humano y otros fluidos corporales. CD14 soluble (sCD14) se secreta directamente o deriva de la eliminación dependiente de proteasa de la molécula unida a membrana. sCD14 compete con CD14 unido a membrana (mCD14) por la unión a LPS y es capaz de neutralizar las respuestas inducidas por LPS in vitro e in vivo. sCD14 media en la activación inducida por LPS de células endoteliales, epiteliales y de músculo liso que no expresan CD14. La LBP (proteína de unión a lipopolisacárido) es una glicoproteína de fase aguda de 58 kD y se une a la parte de lípido A de LPS con una afinidad elevada y cataliza la activación celular dependiente de CD14 mediante LPS. MD2 es una proteína de acceso secretada que se une al dominio extracelular del receptor de tipo toll TLR4 y facilita la respuesta a LPS, posiblemente mediante la estabilización de los dímeros de TLR4. El complejo CD14/MD2/TLR4 parece ser el principal, y posiblemente el exclusivo, receptor para LPS aislada de la mayoría de organismos gram negativos.

35 **[0011]** Se sabe que el mecanismo de CD14 es importante en la prevención y el tratamiento de la sepsis y se sabe que anticuerpos anti-CD14 son conocidos por atenuar la sepsis a través de la vía de CD14, por ejemplo, Leturcq DJ, J Clin Invest 1996 Oct 1;98(7):1533-8 y las patentes de Estados Unidos Nos. 6,495,332 y 6,297,049. El mecanismo de CD14 comprende varias etapas. En general, la LPS de la membrana externa de bacterias gram negativas inician la secuencia en el mecanismo mediante la formación de un complejo con la proteína de unión a LPS (LBP) en el plasma. El complejo LPS-LBP transfiere el monómero LPS a CD14 en la membrana celular de fagocito. CD14 y MD2 inducen la unión de LPS a TLR4 que señala el interior de la célula. La unión de LPS por TLR4 recluta la molécula adaptadora MyD88 al dominio citoplasmático del receptor y, a continuación, MyD88 se une al factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF6). TRAF6 se une a la serina-treonina quinasa IRAK. Se cree que el complejo TRAF6/IRAK activa la fosforilación de las dos subunidades de la NFκB quinasa (NIK) y provoca que formen un heterodímero, la IκB quinasa (IKK). El dímero IKK a continuación fosforila IκB y provoca que se disocie de NFκB. A continuación, NFκB puede migrar al núcleo, unirse al ADN y activar la transcripción de genes que codifican mediadores inflamatorios.

Sepsis

55 **[0012]** La sepsis es una enfermedad caracterizada por una respuesta inflamatoria sistémica incontrolable a la infección. La sepsis bacteriana es un síndrome inflamatorio sistémico complejo causado por una infección bacteriana agresiva en la sangre. La sepsis causa una morbilidad y mortalidad elevadas en humanos y otros animales. En los Estados Unidos, la sepsis es la causa principal de muerte nosocomial para humanos (particularmente en la unidad de cuidados intensivos) y muerte de infecciones en ganado joven y otros animales. Cada año, se diagnostican alrededor de 700.000 casos de sepsis en humanos. Extrapolado a la población global, esto representa varios millones de casos de sepsis grave de forma mundial y anual. Las tasas de mortalidad varían desde aproximadamente 20 a 30% y representan por lo menos 150.000 muertes al año en los Estados Unidos.

65 **[0013]** La sepsis puede resultar de muchas causas, pero normalmente se desencadena por episodios, tales como neumonía, traumatismo, cirugía y quemaduras o por afecciones, tales como cáncer o SIDA. La sepsis empieza normalmente con temblores, fiebre, bajada de la presión sanguínea (choque séptico), respiración

rápida, frecuencia cardiaca elevada y lesiones dérmicas. En horas, la sepsis puede causar la coagulación espontánea en vasos sanguíneos, hipotensión grave, fallo orgánico múltiple, conmoción y finalmente la muerte. Habitualmente, estos síntomas están causados por la activación excesiva o incontrolada de los mecanismos de defensa del huésped, tales como citoquinas, leucocitos y complemento.

5 [0014] La sepsis está causada normalmente por infecciones bacterianas (ya sean bacterias Gram negativas o gram positivas), pero también puede estar causada por otros patógenos, tales como hongos, virus y parásitos y estímulos no infectivos, tales como superantígenos. Sin embargo, más frecuentemente, la sepsis está causada por infecciones de bacterias gram-negativas. Sin embargo, la lesión y síntomas atribuibles a la sepsis no sólo
10 están causadas por las bacterias, sino que también están causadas por un componente de la pared celular bacteriana conocida como endotoxina o lipopolisacárido (LPS). Las moléculas de LPS son glicolípidos que están omnipresentes en la membrana externa de todas las bacterias gram-negativas. Aunque la estructura química conocida de la molécula de LPS es compleja y diversa, una característica común es la región de lípido A. El reconocimiento de la región de lípido A de LPS altamente conservada inicia muchos, si no todos, los episodios
15 responsables de la sepsis. Se libera LPS cuando el sistema inmune destruye la bacteria invasora. La LPS liberada se une a monocitos, macrófagos y células endoteliales y desencadena la producción de varios mediadores, tales como el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) e interleuquinas (IL-1, IL-6, e IL-8). La producción de un exceso de TNF- α , IL-1, IL-6, e IL-8 es la causa principal de sepsis.

20 [0015] Los métodos conocidos para tratar la sepsis incluyen antibacterianos, anticuerpos, moléculas pequeñas y péptidos, proteína C, terapia de apoyo con oxígeno, fluidos intravenosos y medicamentos que incrementan la presión sanguínea. Por ejemplo, la solicitud de patente US No. 20030021783 da a conocer la utilización de anticuerpos anti-IL-8 para el tratamiento de la sepsis, la solicitud de patente US No. 20030008822 da a conocer la utilización de anticuerpos anti-IL18 para el tratamiento de la sepsis, la solicitud de patente US No.
25 20020165138 da a conocer la utilización de anticuerpos anti-C5a y péptidos C5a truncados C-terminal para la prevención y el tratamiento de sepsis en animales, la solicitud de patente US No. No. 20020155094 da a conocer la utilización de quimioquinas y fragmentos de quimioquinas para el tratamiento de la sepsis, la solicitud de patente US No. 20020044929 da a conocer la utilización de una combinación de proteína C y proteína BPI para el tratamiento de la sepsis, la solicitud de patente US No. 20020034509 da a conocer la utilización de anticuerpos anti-CD14 para el tratamiento de la sepsis y la solicitud de patente US No. 20020006915 da a conocer la utilización de inhibidores de COX-2 para tratar la sepsis. De manera similar, la patente US No 6,534,648 da a conocer la utilización de lipopolisacáridos de algas para combatir la sepsis, las patentes US No 6,495,332 y 6,297,049 dan a conocer la utilización de anticuerpos anti-CD14 para tratar la sepsis, la patente US No 6,489,296 da a conocer la utilización de la proteína C para reducir la mortalidad en un paciente humano con sepsis grave, la patente US No 6,344,197 da a conocer la utilización de una terapia de combinación sinérgica que combina la proteína C y BPI para tratar la sepsis. La patente no da a conocer la utilización de una combinación de compuestos del complemento y el mecanismo de CD14, la patente US No 6,315,999 da a conocer la utilización de un anticuerpo para el factor- α de necrosis tumoral (anti-TNF α) y un anticuerpo para el lipopolisacárido bacteriano (anti-LPS) juntos para tratar la sepsis. La patente no da a conocer la utilización de una combinación de compuestos del complemento y el mecanismo de CD14, la patente US No. 6,063,764 da a conocer un método para tratar profilácticamente o terapéuticamente la sepsis o choque séptico utilizando inhibidor de coagulación asociado a lipoproteína, la patente US No 6,042,821 da a conocer un método de prevención y tratamiento de la sepsis utilizando quimioquinas, la patente US No 5,354,771 da a conocer un método para el tratamiento de la sepsis utilizando un cetó análogo de un aminoácido de cadena ramificada, y la patente US No 5,093,117 da a
45 conocer composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento o la profilaxis de sepsis que comprenden inmunoglobulinas policlonales contra bacterias Gram-negativas y una cantidad efectiva de proteína C que disuelve coágulos de sangre.

50 [0016] Sin embargo, a pesar de los principales avances en las últimas décadas en el tratamiento de infecciones serias, la incidencia de la sepsis y la mortalidad debida a la sepsis sigue creciendo. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos métodos y composiciones para la prevención y el tratamiento de la sepsis.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

55 [0017] Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos y composiciones para prevenir y tratar la sepsis.

[0018] Otro objetivo de la invención es disminuir la morbilidad y la mortalidad causadas por la sepsis.

60 [0019] Otro objetivo de la invención es proporcionar un kit útil para prevenir y tratar la sepsis.

[0020] Éstos y otros objetivos se consiguen utilizando una composición que comprende un inhibidor de complemento y un inhibidor de la vía de CD14, en la que: (i) dicho inhibidor de complemento comprende un anticuerpo anti-C5a o fragmento funcionalmente equivalente del mismo; y (ii) dicho inhibidor de mecanismo de CD14 comprende nucleótidos antisentido de CD14, un siARN de CD14, un ARNi de CD14 o un anticuerpo anti-CD14 o un fragmento funcionalmente equivalente del mismo. En una realización, la composición comprende

además uno o más adyuvantes, portadores, excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona la utilización de la composición para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la sepsis. También se da a conocer un método para prevenir o tratar la sepsis que comprende administrar conjuntamente una cantidad de un inhibidor de complemento para la prevención o el tratamiento de la sepsis y una cantidad de un inhibidor de mecanismo de CD14 para la prevención o el tratamiento de la sepsis, a un paciente que es probable que desarrolle o sufra de sepsis. El inhibidor de complemento puede ser cualquier inhibidor de complemento conocido, pero es preferiblemente un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente del mismo que se una e inhiba los componentes del complemento. El inhibidor de la vía de CD14 puede ser cualquier inhibidor de la vía de CD14 conocido, pero es preferiblemente un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente del mismo que se una e inhiba CD14.

[0021] Estos y otros objetivos, características y ventajas adicionales de la presente invención serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

[0022] El término "paciente" significa un ser humano u otro animal que probablemente desarrolle o sufra de sepsis, incluyendo animales bovinos, porcinos, caninos, felinos, equinos, aviares y ovinos. Preferiblemente, el paciente es humano.

[0023] El término "conjuntamente" significa que los inhibidores de complemento y los inhibidores de la vía de CD14 se administran a un paciente aproximadamente a la vez (1) por separado en la misma frecuencia o diferente utilizando la misma o diferentes rutas de administración o (2) juntos en una composición farmacéuticamente aceptable o (3) juntos como parte de un anticuerpo biespecífico o fragmento del mismo, particularmente aquellos con un sitio de unión para un componente del complemento y otro sitio de unión para un componente de la vía de CD14. "Aproximadamente a la vez" significa en general que los inhibidores se administran a la vez o en aproximadamente 72 horas uno del otro.

[0024] El término "parenteralmente" significa la administración mediante inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal.

[0025] El término "fragmentos funcionalmente equivalentes" significa fragmentos de anticuerpo que se unen a componentes del sistema de complemento o el mecanismo de CD14 e inhiben la activación del complemento o la función de la vía de CD14 sustancialmente de la misma manera que el anticuerpo completo.

[0026] El término "antagonista" significa cualquier molécula que bloquea, previene, inhibe o neutraliza la función normal de un componente de complemento o un componente de la vía de CD14. Un tipo de antagonista es una molécula que interfiere con la interacción entre CD14 y su ligando LPS, incluyendo un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

[0027] La presente invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares aquí descritos porque pueden variar. Además, la terminología utilizada aquí es para el objetivo de describir realizaciones particulares sólo y no pretende limitar el alcance de la presente invención. Tal como se utiliza aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen la referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario, por ejemplo, la referencia a "una célula huésped" incluye una pluralidad de dichas células huésped.

[0028] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos y cualquier acrónimo utilizado aquí tienen los mismos significados entendidos habitualmente por un experto en la materia en el campo de la invención. Aunque se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los aquí descritos en la práctica de la invención, los métodos, dispositivos y materiales preferidos se describen en el presente documento.

[0029] Todas las patentes y publicaciones aquí mencionadas se incorporan por referencia en la presente invención en el grado permitido por la ley para el objetivo de describir y divulgar los compuestos y metodologías descritos en las mismas que se podrían utilizar con la presente invención. Sin embargo, nada aquí debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a anticipar dicha divulgación en virtud de la invención anterior.

La invención

[0030] El presente documento proporciona un método para prevenir y tratar la sepsis. El método comprende administrar conjuntamente al paciente una cantidad de uno o más inhibidores de complemento para prevenir o tratar la sepsis y una cantidad de uno o más inhibidores de la vía de CD14 para prevenir o tratar la sepsis. La

presente invención se basa en el descubrimiento nuevo de que tanto el componente de complemento del sistema inmune como el mecanismo de CD14 juegan un papel crítico en el desarrollo de la sepsis y que los métodos y composiciones para inhibir o prevenir la activación del complemento se deben utilizar en combinación con métodos y composiciones para inhibir el mecanismo de CD14 para prevenir o tratar de manera efectiva la sepsis. Utilizando los inhibidores de complemento o los inhibidores de la vía de CD14 solos no se prevendrá o tratará de manera efectiva la enfermedad. Los métodos y composiciones son útiles para disminuir la morbilidad y mortalidad para pacientes susceptibles a o que sufren de sepsis.

[0031] Los inhibidores de complemento del presente documento son cualquier molécula conocida que inhibe la activación de complemento en un paciente. En general, los inhibidores de complemento son moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo u otras moléculas que actúan como inhibidores de complemento. Los inhibidores de complemento útiles incluyen compstatina y sus análogos funcionales (inhibe C3), inhibidores de C1q, inhibidor de C1 (se une covalentemente a C1r y C1s), inhibidores de C1r (se une e inhibe a C1r), inhibidores de C1s (se une e inhibe C1s), sCR1 y sus análogos (disocian todas las C3 convertasas), anticuerpos anti-C5 (bloquean la activación de C5), anticuerpos anti-C5a y anti-receptor de C5a y fármacos de molécula pequeña (inhiben el mecanismo de señalización de C5a), anticuerpos anti-C3a y anti-receptor de C3a y fármacos de molécula pequeña (inhiben el mecanismo de señalización de C3a), anticuerpos anti-C6, 7, 8, ó 9 (inhiben la formación o función de MAC), anticuerpos anti-Factor D (inhibe la separación por el factor D del factor B), anticuerpos anti-properdina (desestabilizan las C3 y C5 convertasas en el mecanismo alternativo), Proteína de Cofactor de Membrana (MCP) (cofactor para la separación de C3b y C4b mediada por el Factor I), Factor de aceleración del decaimiento (DAF) (acelera el decaimiento de todas las C3 convertasas), y la proteína de fusión MCP-DAF (CAB-2). Otros inhibidores útiles incluyen C4bp (acelera el decaimiento de la C3 convertasa del mecanismo clásico (C4b2a)), Factor H (acelera el decaimiento de la C3 convertasa del mecanismo alternativo (C3bBb)), Factor I (separa proteolíticamente e inactiva C4b y C3b (cofactores necesarios)), Carboxipeptidasa N (elimina los residuos de arginina terminales de C3a, C4a y C5a), vitronectina (Proteína S) y clusterina (se une al complejo C5b-7 y previene la inserción de membrana), y CD59 (inhibe la lisis de células bystander).

[0032] Preferiblemente, los inhibidores de complemento son anticuerpos o fragmentos funcionalmente equivalentes de los mismos que se unen a e inhiben una o más de las proteínas que actúan en la cascada del complemento, por ejemplo, C1, C2, C4, C3, C3a, C5, C5a, Factor D, factor B, properdina, MBL o sus componentes, MASP o sus componentes, productos de la separación por proteasa y receptores. Los anticuerpos se unen a una proteína complemento seleccionada en la cascada de complemento e inhiben o previenen la activación del complemento cuando un paciente presenta el riesgo de desarrollar sepsis. En un ejemplo, el inhibidor de complemento es un anticuerpo anti-C5 o fragmento funcionalmente equivalente del mismo que se une a C5 e inhibe la formación de C5a y C5b en la cascada de complemento. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo anti-C5a o anti-C5b que se une a estas proteínas e inhibe su acción en la cascada de complemento. Más preferiblemente, el inhibidor de complemento es un anticuerpo anti-C5a o fragmento funcionalmente equivalente del mismo que se une a C5a e inhibe su acción en la cascada de complemento. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales, pero son preferiblemente anticuerpos monoclonales.

[0033] En un ejemplo, los inhibidores de complemento que inhiben las anafilatoxinas en la cascada de complemento, particularmente C5a. Dichos inhibidores incluyen anticuerpos anti-C3a y sus fragmentos funcionalmente equivalentes, anticuerpos anti-C4a y sus fragmentos funcionalmente equivalentes, y anticuerpos anti-C5a y sus fragmentos funcionalmente equivalentes.

[0034] En otro ejemplo, los inhibidores de complemento son antagonistas del receptor de C5a. Estos antagonistas interfieren con la interacción con C5a y su receptor e inhiben la función de la vía de complemento. Los antagonistas del receptor de C5a incluyen, pero sin limitación, F-[oPdChaWR] (Haynes DR et al, Biochem Pharmacol 2000; 60: 729-33; Huber-Lang MS et al., FASEB J 2002; 16: 1567-74)) y los descritos en WO0249993A2 y WO0249993A3.

[0035] Los inhibidores de la vía de CD14 del presente documento son cualquier molécula que inhibe el mecanismo de CD14 en un paciente. En general, los inhibidores de la vía de CD14 son moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos u otras moléculas que actúan como inhibidores de la vía de CD14. Los inhibidores de la vía de CD14 útiles incluyen los antagonistas de la vía de CD14 que interfieren con la función de la vía del CD14 y la transcripción de genes que codifican mediadores inflamatorios. Dichos inhibidores incluyen, pero sin limitación, anticuerpos anti-componentes de la vía de CD14, tales como anticuerpos anti-Cd14 y anticuerpos anti-LPS que inhiben la acción de un componente de la vía de CD14, antagonistas de LPS que se unen a LPS e interfieren con su unión a CD14, antagonistas de LBP que se unen a LBP e interfieren con su capacidad de transferir LPS a CD14, nucleótidos antisentido de CD14 que interfieren con la producción de CD14, siARN de CD14 que interfiere con la producción de CD14, y ARNi de CD14 que interfiere con la producción de CD14.

[0036] En un ejemplo, los inhibidores de la vía de CD14 son anticuerpos o fragmentos funcionalmente equivalentes de los mismos que se unen a e inhiben una o más de las proteínas que actúan en el mecanismo de CD14, por ejemplo, LPS, proteína de unión a lipopolisacárido (LBP), CD14, TLR4, y MD2 para sepsis Gram negativa y CD14, TLR2, y TLR6 para sepsis Gram positiva. Los anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-CD14 incluyen, pero sin limitación, el anticuerpo 4C1 descrito por Tasaka SI (Am J Respir Cell Mol Biol; 2003 Mar 14, publicación en línea antes de imprimir) y el anticuerpo IC14 descrito por Axtelle T (J Endotoxin Res 2001; 7: 310-4). Los anticuerpos se unen a una proteína seleccionada en el mecanismo e inhiben o previenen la señalización de la membrana y la activación de genes responsables de la producción de citoquinas no deseadas. Preferiblemente, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-LPS, anticuerpos anti-LPB, anticuerpos anti-CD14, anticuerpos anti-TLR4, anticuerpos anti-MD2, anticuerpos anti-TLR2, anticuerpos anti-TLR6, y fragmentos funcionalmente equivalentes de los mismos. Más preferiblemente, el inhibidor de la vía de CD14 es un anticuerpo anti-CD14 o fragmento funcionalmente equivalente del mismo que se une a CD14 e inhibe la señalización de membrana y la activación de genes de citoquinas o un anticuerpo anti-LPS que se une a LPS y evita que LPS se una a CD14. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, pero preferiblemente son anticuerpos monoclonales.

[0037] En otra realización, los inhibidores de la vía de CD14 son anticuerpos anti-CD14 que presentan un cambio en la secuencia de aminoácidos en las regiones constantes del anticuerpo anti-CD14, particularmente regiones CH2 y CH3 y más particularmente en la región Fc. Estos anticuerpos anti-CD14 "variantes" presentan una secuencia de aminoácidos que difieren de su homólogo nativo en uno o más aminoácidos, incluyendo modificaciones, sustituciones, inserciones y deleciones. Estas variantes presentan secuencias de aminoácidos alteradas que alteran las funciones efectoras de la región Fc del anticuerpo, por ejemplo, la unión a complemento, la unión a receptores celulares en macrófagos y monocitos, y similares. Preferiblemente, dichos anticuerpos variantes presentan una capacidad reducida de unirse a receptores de Fc y/o de activar el complemento.

[0038] Los métodos para producir anticuerpos y sus fragmentos funcionalmente equivalentes, incluyendo anticuerpos policlonales, monoclonales, monovalentes, humanizados, humanos, biespecíficos y heteroconjugados, son conocidos por los expertos en la materia.

Anticuerpos policlonales

[0039] Los anticuerpos policlonales se pueden producir en un mamífero mediante la inyección de un inmunógeno solo o en combinación con un adyuvante. Habitualmente el inmunógeno se inyecta en el mamífero utilizando una o más inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El inmunógeno puede incluir el polipéptido de interés o una proteína de fusión que comprende el polipéptido y otro polipéptido conocido por ser inmunogénico en el mamífero que se inmuniza. El inmunógeno también puede incluir células que expresan un receptor recombinante o un vector de expresión de ADN que contiene el gen del receptor. Ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas incluyen, pero sin limitación, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Ejemplos de adyuvantes incluyen, pero sin limitación, adyuvante completo de Freund y adyuvante MPLTDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintética). El protocolo de inmunización se puede seleccionar por un experto en la materia sin gran experimentación.

Anticuerpos monoclonales

[0040] Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando los métodos de hibridoma, tales como aquellos descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, un hámster u otro animal huésped adecuado, se inmuniza con un inmunógeno para obtener linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al inmunógeno. De manera alternativa, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. Habitualmente, el inmunógeno incluirá el polipéptido de interés o una proteína de fusión que contiene dicho polipéptido. Generalmente, se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano. Se usan células de bazo o células de nódulos linfáticos si se desean células de mamíferos no de origen humano. Los linfocitos a continuación se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, por ejemplo, polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. Habitualmente las líneas celulares inmortalizadas son células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de roedores, de origen bovino o de origen humano. Habitualmente se usan líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si a las células parentales les falta la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"). El medio HAT evita el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

[0041] Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, que sostienen niveles estables elevados de expresión del anticuerpo por las células seleccionadas productoras de anticuerpo, y que son sensibles a medios tales como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son

líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, Estados Unidos y las células SP2/0 o X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos. También se han descrito para utilizar en la producción de anticuerpos monoclonales humanos líneas celulares de mieloma humano y de heteromiéloma ratón-humano [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc, New York, (1987) pp. 51-63]. La línea celular de mieloma de ratón NS0 también puede utilizarse (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire Reino Unido). Las líneas celulares de mieloma humano y heteromiéloma ratón-humano, conocidas en la técnica, también pueden utilizarse para producir anticuerpos monoclonales humanos.

[0042] El medio de cultivo utilizado para cultivar las células de hibridoma puede ser analizado a continuación para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido de interés. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidos en el sector. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede ser determinada, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

[0043] Después de que las células de hibridoma deseadas hayan sido identificadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y crecer según métodos estándar. Entre los medios de cultivo adecuados para este propósito se incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como ascitis en un mamífero.

[0044] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden ser aislados o purificados a partir del medio de cultivo o del fluido ascítico mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, proteína-G-Sepharose, proteína-A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

[0045] Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse también mediante métodos de ADN recombinante, por ejemplo los descritos en la patente U.S. 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales, por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos (Innis M. et al. In "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 de hibridoma aquí descritas sirven como origen preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede incorporarse en vectores de expresión. Los vectores a continuación se transfectan en células huésped, tales como las células de simio COS, las células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de lo contrario no producirían la proteína inmunoglobulina. Las células huésped recombinantes se utilizan para producir los anticuerpos monoclonales deseados. El ADN puede modificarse también, por ejemplo, substituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes humanos de las cadenas pesada y ligera en lugar de las secuencias murinas homólogas o mediante la unión covalente de la secuencia codificante de inmunoglobulina a toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulina. Dicho polipéptido no inmunoglobulina puede substituirse por los dominios constantes de un anticuerpo o puede substituirse por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

[0046] Los anticuerpos monovalentes se pueden producir utilizando la expresión recombinante de una cadena ligera y cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto de la región Fc para evitar el entrecruzamiento a la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes se substituyen por otro residuo aminoacídico o se eliminan para evitar el entrecruzamiento. De manera similar, se pueden utilizar métodos *in vitro* para producir anticuerpos monovalentes. Se puede utilizar la digestión de anticuerpos para producir fragmentos de anticuerpos, preferiblemente fragmentos Fab, utilizando métodos conocidos.

[0047] Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos se pueden producir utilizando bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas utilizando 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 murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de afinidad elevada (rango de nM) mediante el barajado de cadenas (Marks, et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para la construcción de bibliotecas de fagos muy amplias (Waterhouse, et al., Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales. Además, el ADN se puede modificar, por ejemplo, substituyendo la secuencia codificante por los dominios constantes de cadena pesada y cadena ligera humana en lugar de las secuencias

murinas homólogas (patente de Estados Unidos No. 4,816,567; Morrison, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81:6851 (1984)), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no es inmunoglobulina. Habitualmente, dichos polipéptidos que no son inmunoglobulinas están sustituidos por los dominios constantes de un anticuerpo o están sustituidos por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

[0048] Los anticuerpos también se pueden producir utilizando fusión eléctrica en lugar de fusión química para formar hibridomas. Esta técnica está bien establecida. En lugar de fusión, también se puede transformar una célula B para hacerla inmortal utilizando, por ejemplo, un virus de Epstein Barr, o un gen transformante "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.

15 Anticuerpos humanizados

[0049] Los anticuerpos humanizados se pueden producir utilizando el método descrito por Winter in Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); y Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988). La humanización se realiza sustituyendo las regiones determinantes de complementariedad ("CDR") o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más aminoácidos introducidos en el mismo de un origen no humano. Dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de la región de armazón ("FR") están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. Las formas humanizadas de anticuerpos no-humanos (por ejemplo, murinos o bovinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas, tales como Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno, que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región determinante complementaria (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de un CDR de una especie no humana (anticuerpo donador), tal como ratón, rata o conejo que tengan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan residuos de la región de armazón Fv de la inmunoglobulina humana por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados pueden comprender también residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o en secuencias de la región de armazón. En general, los anticuerpos humanizados comprenden sustancialmente todos o al menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, donde todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia consenso de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanizados comprenderán de manera óptima por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente de una inmunoglobulina humana.

Anticuerpos humanos

[0050] Los anticuerpos humanos pueden producirse utilizando varias técnicas conocidas en el sector, por ejemplo, bibliotecas de expresión de fagos, tal como se describe en Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991). Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden producir utilizando las técnicas descritas en Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boemer et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991). Alternativamente, están disponibles animales transgénicos, por ejemplo, ratones que, tras la inmunización, pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena. Dichos ratones transgénicos están disponibles de Abgenix, Inc., Fremont, California, y Medarex, Inc., Annandale, New Jersey. Se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada (JH) del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal da lugar a la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulinas de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación 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). Los anticuerpos humanos también pueden derivar de bibliotecas de expresión en fagos (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)).

Anticuerpos biespecíficos

[0051] Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante la coexpresión recombinante de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina donde las dos cadenas pesadas presentan especificidades

diferentes. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tiene especificidades de unión para por lo menos dos antígenos diferentes. En la presente invención, un anticuerpo biespecífico tiene una especificidad de unión para CSa y otra para CD14. Debido a la aleatoria variedad de cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, estos hibridomas producen una mezcla potencial de diez anticuerpos diferentes. Sin embargo, sólo uno de estos anticuerpos tiene la estructura biespecífica correcta. La recuperación y purificación de la molécula correcta se realiza habitualmente mediante cromatografía de afinidad.

[0052] Los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación antígeno-anticuerpo) se pueden fusionar con secuencias de dominios constantes de inmunoglobulinas. La fusión preferiblemente se produce con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra, las regiones CH2 y CH3. Preferiblemente, la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera está presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN que codifican para la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina se insertan en vectores de expresión separados, y son co-transfectados en un organismo huésped adecuado. En Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986) se muestran técnicas adecuadas para la producción de anticuerpos biespecíficos.

Anticuerpos heteroconjugados

[0053] Los anticuerpos heteroconjugados se pueden producir utilizando métodos de fusión de proteínas conocidos, por ejemplo, mediante el acoplamiento del grupo amina de un anticuerpo a un grupo tiol en otro anticuerpo u otro polipéptido. Si es necesario, se puede introducir un grupo tiol utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, se pueden producir inmunotoxinas que comprenden un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y una toxina polipeptídica utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este objetivo se incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato. Dichos anticuerpos se pueden utilizar para reconocer complementos inmunes dianas y prevenir y tratar la sepsis.

[0054] Los inhibidores de complemento y los inhibidores de la vía de CD14 se pueden administrar al paciente mediante cualquier medio que permita que el inhibidor alcance las células reconocidas. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, los modos de administración oral, rectal, nasal, tópica, intradérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratraqueal e intraperitoneal. En un ejemplo, los inhibidores se administran colocando los inhibidores directamente en los pulmones, normalmente mediante inhalación o instilación traqueal. Se prefieren las inyecciones parenterales porque permiten el control preciso del ritmo y los niveles de dosificación para la administración. Para la administración parenteral, los inhibidores de complemento se pueden formular, por ejemplo, como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral fisiológicamente aceptable. Entre los ejemplos de dichos vehículos se encuentran el agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5%. También se pueden utilizar liposomas y vehículos no acuosos, tales como aceites fijos. El vehículo o polvo liofilizado puede contener aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol) y la estabilidad química (por ejemplo, tampones y conservantes). La formulación se esteriliza mediante técnicas utilizadas habitualmente. Por ejemplo, se prepara una composición parenteral adecuada para la administración mediante la inyección disolviendo 1,5% en peso de principio activo en una solución de cloruro de sodio al 0,9%.

[0055] En otro aspecto, el presente documento proporciona una composición útil para la prevención y el tratamiento de la sepsis que comprende uno o más inhibidores de complemento, uno o más inhibidores de la vía de CD14, y preferiblemente uno o más adyuvantes, portadores, excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Los adyuvantes, portadores, excipientes y/o diluyentes aceptables para producir las composiciones farmacéuticas son conocidos por los técnicos en la materia, por ejemplo, Hoover, John E., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975. Otra discusión de las formulaciones de fármacos se puede hallar en Liberman, H. A. y Lachman, L., Eds., *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980. Más preferiblemente, los inhibidores se mezclan con portadores farmacéuticamente aceptables para formar una composición que permita una preparación y administración de dosificación fácil. Los vehículos acuosos preparados a partir de agua que no tienen pirógenos no volátiles, agua estéril y agua bacteriostática y que contienen por lo menos sales de tampón 0,025 M, tales como fosfato de sodio, bicarbonato de sodio, citrato de sodio, etc. también son adecuados para formar soluciones de inhibidores de complemento inyectables. Además de estos tampones, se pueden utilizar otros vehículos acuosos. Estos incluyen composiciones isotónicas de inyección que se pueden esterilizar, tales como cloruro de sodio, solución de Ringer, dextrosa, dextrosa y cloruro de sodio, y solución de Ringer lactada. La adición de disolventes miscibles en agua, tales como metanol, etanol o propilenglicol aumenta en general la solubilidad y estabilidad de los inhibidores en estos vehículos. Los vehículos no acuosos, tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo o aceite de cacahuete y ésteres, tales como miristato de isopropilo, también se pueden utilizar como vehículos de suspensión para los inhibidores. Adicionalmente, se pueden añadir varios aditivos que aumentan la estabilidad, esterilidad e isotonicidad de la composición, incluyendo conservante antimicrobianos, antioxidantes,

agentes quelantes y tampones. Sin embargo, cualquier diluyente o aditivo utilizado tendría que ser biocompatible y compatible con los inhibidores según la presente invención.

5 **[0056]** Cuando el inhibidor de complemento o el inhibidor de la vía de CD14 es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, la formulación es cualquier formulación adecuada para la administración de anticuerpos a un paciente, por ejemplo, formulaciones de anticuerpos sólidos, tales como los descritos en la solicitud de patente US No. 20020136719, formulaciones liofilizadas reconstituidas, tales como las descritas en US 6,267,958 o formulaciones acuosas, tales como las descritas en US 6,171,586.

10 **[0057]** La cantidad o dosificación del inhibidor de complemento o inhibidor de la vía de CD14 administrada a un paciente varía dependiendo del tipo de paciente, edad del paciente, complejión del paciente, tipo de inhibidor, frecuencia de tratamiento, objetivo de la administración (terapéutico o profiláctico) y gravedad de la sepsis. En general, los inhibidores de complemento se administran al paciente en dosis de aproximadamente 1 a 50 miligramos por kilogramo de peso corporal (mg/kg) por día, preferiblemente desde aproximadamente 5 a 30
15 mg/kg/day. Cuando se administra por inhalación o instilación traqueal, los inhibidores de complemento se administran al paciente en dosis desde aproximadamente 0,5 a 20 mg/kg dos veces al día. En general, los inhibidores de la vía de CD14 se administran al paciente en dosis desde aproximadamente 10 a 200 miligramos por kilogramo de peso corporal (mg/kg) por día, preferiblemente desde aproximadamente 25 a 100 mg/kg/día. Cuando se administran mediante inhalación o instilación traqueal, los inhibidores de la vía de CD14 se
20 administran al paciente en dosis desde aproximadamente 1 a 40 mg/kg dos veces al día. Los inhibidores de complemento se pueden administrar en una dosis o la dosis se puede dividir en dosis más pequeñas que se pueden administrar más frecuentemente.

25 **[0058]** En una realización preferida, se administra diariamente a un paciente una mezcla de anticuerpo anti-C5a y anticuerpo anti-CD14 que contenía aproximadamente 25 mg/kg de anti-C5a y aproximadamente 40 mg/kg de anti-CD14 para prevenir o tratar la sepsis. De manera similar, la mezcla puede contener aproximadamente 40 mg/kg de anticuerpo anti-LPS en lugar de anticuerpo anti-CD14.

30 **[0059]** Dado que los inhibidores de complemento y los inhibidores de la vía de CD14 se pueden administrar por separado, la presente invención también proporciona en otro aspecto un artículo de fabricación en forma de un kit para administrar una composición para prevenir o tratar la sepsis a un paciente que comprende en recipientes separados en un único envase un inhibidor de complemento y un inhibidor de la vía de CD14, en la que: (i) dicho inhibidor de complemento comprende un anticuerpo anti-C5a o un fragmento funcionalmente equivalente; y (ii) dicho inhibidor de la vía de CD14 comprende nucleótidos antisentido de CD14, un siARN de CD14, un ARNi de
35 CD14 o un anticuerpo anti-CD14 o fragmento funcionalmente equivalente de los mismos. El kit contiene el inhibidor de complemento en cantidades suficientes para suministrar desde aproximadamente 25 mg/kg/día de inhibidor de complemento y el inhibidor de la vía de CD14 en cantidades suficientes para suministrar desde aproximadamente 40 mg/kg/día de inhibidor de la vía de CD14 cuando se administrar a un paciente.

40 Ejemplos

[0060] La presente invención se puede ilustrar adicionalmente mediante los siguientes ejemplos de realizaciones preferidas de la misma, aunque se entenderá que estos ejemplos se incluyen únicamente para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención a menos que se indique específicamente lo contrario.

45 Materiales y Métodos

[0061] Equipamiento: todo el equipamiento y las soluciones utilizadas no llevaban endotoxina según la información de los fabricantes. Se utilizaron tubos de polipropileno para obtener una activación de base baja del
50 complemento.

[0062] Reactivos: La solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) se obtuvo de Life Technologies (Paisley, Reino Unido), Lepirudina (Refludan®) se obtuvo de Hoechst (Frankfurt am Main, Alemania). E. coli opsonizado, 1×10^9 bacterias/mL se obtuvo de ORPEGEN Pharma (Heidelberg, Alemania); la concentración total de endotoxina en la suspensión de E. Coli fue de 7 $\mu\text{g/mL}$ cuando se analizó utilizando ensayo de lisados de amebocitos de limulues. El mAb 137-126 anti- C5/C5a humano de ratón (IgG1 purificado) fue generado por Tanox, Inc. (Houston, TX). El mAb 18D11 anti-CD14 humano de ratón (IgG1 purificado) fue obtenido de Diatec AS (Oslo, Noruega) y su F(ab')₂ se preparó mediante digestión con pepsina. El factor de veneno de cobra (CVF) se obtuvo comercialmente de Quidel. El lipopolisacárido bacteriano (LPS) se obtuvo comercialmente de Hoechst. El conjugado de PE CD11b antihumano de ratón se obtuvo de Becton Dickinson (San Jose, CA). El colorante nuclear LDS-751 se obtuvo de Molecular Probes (Eugene, OR).

Ejemplo 1

65 Activación de complemento por E. coli, pero no LPS, en un modelo de inflamación de sangre completa humana

[0063] Se utilizó un modelo de sangre completa humana en el estudio tal como se ha descrito anteriormente en detalle (Mollnes TE et al. Blood 2002; 100: 1869-1877). La sangre se recogió de voluntarios sanos y se anticoaguló con lepirudina. La lepirudina se analizó para que no interfiriera con la activación de complemento. Se analizaron los efectos de *E. coli* (1×10^8 /mL), *E. Coli* sonificado 1×10^8 /mL) y LPS (0,5 µg/mL) en la activación del complemento en este sistema. Se utilizó CVF (5 U/mL) como control para la activación de complemento en fase fluida. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C. El complejo sC5b-9 terminal (TCC) del plasma formado como resultado de la activación de complemento se determinó mediante inmunoensayos unidos a enzima (ELISA) descrito en detalle (Mollnes TE et al., Scand. J. Immunol. 1985; 22: 197-202). En este ensayo, se recubrió con un mAb específico para TCC la superficie de pocillos en placas de microanálisis. Después de la incubación de la muestra, se detectó el TCC inmovilizado mediante mAb de ratón biotinilado para C6 humana. A continuación, se añadió peroxidasa de rábano conjugada a estreptavidina para el revelado de color con sustrato. La densidad óptica (OD) del producto de reacción se leyó con un lector de placas de ELISA a 450 nm. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Formación de TCC (en unidades arbitrarias/mL) en sangre completa humana inducida por <i>E. Coli</i> , pero no LPS				
	mAb 137-26			
	0	1	10	100
Línea base	0,2			
Espontánea	1,2			
+ <i>E. coli</i> (1×10^8 /mL)	64	48	101	65
+ <i>E. coli</i> sonificado (1×10^8 /mL)	55	53	88	56
+ LPS (0,5 µg/mL)	2,1	2,6	8,7	5,7
+CVF (5 U/mL)	235	235	525	800

[0064] En referencia a la tabla 1, los datos muestran que *E. Coli*, pero no LPS, indujeron la activación de complemento y la formación de TCC. mAb 137-26 no inhibió la formación de TCC de fase fluida inducida por *E. Coli*. El CVF indujo la formación de TCC de fase fluida (a través de la activación de la vía de complemento alternativo). En conjunto, los resultados muestran que las bacterias completas (tales como *E. coli*) activan el complemento, mientras que la endotoxina (LPS) derivada de las bacterias completas no lo hacen. De este modo, se desencadenan dos mecanismos distintos de inflamación mediante bacteremia y endotoxemia en la sepsis.

Ejemplo 2

Distintos mecanismos de activación de granulocitos y monocitos expuestos a *E. coli* o LPS

[0065] El sistema de sangre completa descrito en el ejemplo 1 también se utilizó para estudiar la activación de granulocitos y monocitos por *E. Coli* (a través de C5a formado mediante la activación de complemento) y LPS (a través de la activación de la vía de CD14). La regulación por incremento de CD11b se utilizó como indicador de la activación de granulocitos y monocitos. Las muestras de sangre se preincubaron durante 4 minutos con mAb 137-26 anti-C5/C5a, F(ab')₂ de 18D11 anti-CD14, una combinación de mAb 137-26 y F(ab')₂ de 18D11 anti-CD14 o PBS. Se añadió *E. coli* (1×10^7 bacterias/mL), o *E. coli* sonificado (1×10^7 bacterias/mL), LPS (0,5 µg/mL) o CVF (5 U/mL) a las muestras de prueba. Se utilizó PBS en cambio como control negativo. La muestra de la línea base se procesó de manera inmediata antes de la adición de los activadores. Después de la incubación durante 10 minutos a 37°C, se utilizaron 100 µL de sangre para ensayos citométricos de flujo. La muestra de sangre completa se fijó con paraformaldehído y, a continuación, se tiñó con PE anti-CD11b y el colorante nuclear LDS-751 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). Se midió la expresión de CD11b como la intensidad de fluorescencia mediana (MFI) utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA). Todos los experimentos se realizaron de 3 a 5 veces. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y la tabla 3.

Tabla 2

Inhibición de la regulación por incremento de CD11b inducida por C5a (en intensidad de fluorescencia mediana) por mAb anti-C5/C5a 137-26 en un modelo de sangre completa humana					
		mAb anti-C5/C5a 137-26 (µg/mL)			
		0	1	10	100
Granulocito	Línea base	59			
	Espontánea	74			
	+ <i>E. coli</i> (1×10^8 /mL)	2091	1640	1009	621
	+ <i>E. coli</i> sonificado (1×10^8 /mL)	1972	1582	806	661

	+ LPS (0,5 µg/mL)	121	67	71	70
	+CVF (5 U/mL)	1023	667	64	67
Monocito	Línea base	74			
	Espontánea	97			
	+ E. coli (1x10 ⁸ /mL)	1670	1389	1420	1346
	+ E. coli sonificado (1x10 ⁸ /mL)	1568	1512	1414	1407
	+ LPS (0,5 µg/mL)	982	866	820	835
	+CVF (5 U/mL)	898	580	103	141

Tabla 3

Inhibición de la regulación por incremento de CD11b (en intensidad de fluorescencia mediana) por mAb anti-C5/C5a 137-26 y F(ab') ₂ de 18D11 anti-CD14 en un modelo de sangre completa humana									
		Anti-CD14 (µg/mL)				Anti-C5/C5a (µg/mL)		Anti-CD14 + anti-C5/C5a (µg/mL)	
		0	4	20	40	0	25	0	25/20
Granulocito	Línea base	44							
	Espontánea	47							
	+ E. coli (1x10 ⁸ /mL)	1472	1207	1240	1269	1472	337	1472	62
	+ E. coli (4x10 ⁶ /mL)	178				178	48	178	45
	+ LPS (0,5 µg/mL)	43	43	49	54	43	41	43	43
Monocito	Línea base	68							
	Espontánea	68							
	+ E. coli (1x10 ⁸ /mL)	874	638	562	632	874	750	874	84
	+ E. coli (4x10 ⁶ /mL)	509				509	496	509	62
	+ LPS (0,5 µg/mL)	485	68	67	81	485	463	485	70

5

[0066] En referencia a las tablas y 3, los datos muestran que E. coli activa granulocitos y monocitos, mientras que LPS activa sólo monocitos. El mAb 137-26 anti-C5/C5a inhibe de manera efectiva de una manera dependiente con la dosis la activación de granulocitos inducida por E. Coli, pero sólo presentaba un efecto inhibitor moderado en la activación de monocitos. El mAb 137-26 no presentaba ningún efecto inhibitor significativo en la activación de monocitos inducida por LPS. El CVF de control, que activaba el complemento, indujo la activación de neutrófilos y monocitos. La activación se inhibió de manera efectiva mediante mAb 137-26. F(ab')₂ anti-CD14 presentaba un efecto mínimo en la activación de granulocitos y monocitos inducida por E. Coli (tabla 3). En cambio, inhibió de manera efectiva la activación de monocitos inducida por LPS. La combinación de F(ab')₂ anti-CD14 y mAb 137-26 anti-C5/C5a consiguió una inhibición completa de la activación de neutrófilos y monocitos inducida por E. Coli o LPS.

10

15

[0067] Colectivamente, los resultados de las tablas 2 y 3 indican que E. Coli (bacteremia) inducía la producción de C5a a través de la activación de complemento y, de este modo, activa predominantemente granulocitos y en menor grado, monocitos, mientras que LPS bacteriano activa principalmente monocitos a través de un mecanismo dependiente de CD14 que es independiente de complemento. Por lo tanto, administrar una combinación de inhibidores de complemento e inhibidores de la vía de CD14 a un paciente se puede utilizar como método para prevenir o tratar la sepsis.

20

25

[0068] En la memoria, se han descrito realizaciones preferidas habituales de la invención y, aunque se utilizan términos específicos, se utilizan sólo en un sentido genérico y descriptivo y no para fines de limitación del alcance de la invención establecido en las siguientes reivindicaciones. Obviamente, son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las enseñanzas anteriores. Por tanto, debe entenderse que en el alcance de las reivindicaciones adjuntas, la presente invención se puede realiza de otra manera a la descrita específicamente.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende un inhibidor de complemento y un inhibidor de la vía de CD14, en la que: (i) dicho inhibidor de complemento comprende un anticuerpo anti-C5a o un fragmento funcionalmente equivalente del mismo; y (ii) dicho inhibidor de la vía de CD14 comprende nucleótidos antisentido de CD14, un siARN de CD14, un ARNi de CD14 o un anticuerpo anti-CD14 o un fragmento funcionalmente equivalente del mismo.
- 10 2. Composición, según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de la vía de CD14 comprende un anticuerpo anti-CD14 o un fragmento funcionalmente equivalente del mismo.
3. Composición, según la reivindicación 2, en la que el anticuerpo anti-CD14 es un anticuerpo que tiene una carga en la secuencia de aminoácidos en la región Fc que altera las funciones efectoras del anticuerpo.
- 15 4. Composición, según la reivindicación 1, en la que la composición comprende: (i) un anticuerpo anti-C5a o un fragmento funcionalmente equivalente del mismo; y (ii) un anticuerpo anti-CD14 o un fragmento funcionalmente equivalente del mismo.
- 20 5. Anticuerpo biespecífico que comprende un primer elemento de unión que se une y un segundo elemento de unión que se une.
6. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además uno o más adyuvantes, portadores, excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
- 25 7. Kit que comprende un inhibidor de complemento, tal como se indica en la reivindicación 1, y un inhibidor de la vía de CD14, tal como se indica en la reivindicación 1, en el que el inhibidor de complemento y el inhibidor de la vía de CD14 se suministran por separado.
8. Kit, según la reivindicación 7, en el que el inhibidor de la vía de CD14 comprende un anticuerpo anti-CD14.
- 30 9. Kit, según la reivindicación 7, en el que la cantidad del inhibidor de complemento es suficiente para dosis de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 miligramos por kilogramo de peso corporal por día y la cantidad de inhibidor de la vía de CD14 es suficiente para dosis de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 miligramos por kilogramo de peso corporal por día
- 35 10. Utilización de una composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la sepsis.
- 40 11. Utilización de un inhibidor de complemento, tal como se indica en la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento para utilizar en combinación con un inhibidor de la vía de CD14, tal como se indica en la reivindicación 1, para el tratamiento o la prevención de la sepsis.
- 45 12. Utilización de un inhibidor de la vía de CD14, tal como se indica en la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento para utilizar en combinación con un inhibidor de complemento, tal como se indica en la reivindicación 1, para el tratamiento o la prevención de la sepsis.
- 50 13. Inhibidor de complemento, tal como se indica en la reivindicación 1, para utilizar en combinación con un inhibidor de la vía de CD14, tal como se indica en la reivindicación 1, para el tratamiento o la prevención de la sepsis.
- 55 14. Inhibidor de la vía de CD14, tal como se indica en la reivindicación 1, para utilizar en combinación con un inhibidor de complemento, tal como se indica en la reivindicación 1, para el tratamiento o la prevención de la sepsis.
15. Utilización de un anticuerpo biespecífico, según la reivindicación 5, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la sepsis.
16. Anticuerpo biespecífico, según la reivindicación 5, para utilizar en el tratamiento o la prevención de la sepsis.