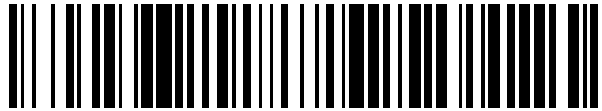


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 054**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2009 E 09751681 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 2303291**

54 Título: **Métodos y composiciones para reducir la inflamación pulmonar en un animal**

30 Prioridad:

**23.05.2008 US 55870 P**

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

**13.05.2013**

73 Titular/es:

**THE LAURIDSEN GROUP, INC. (100.0%)  
2425 Se Oak Tree Ct.  
Ankeny, IA 50021, US**

72 Inventor/es:

**WEAVER, ERIC;  
CAMPBELL, JOY;  
RUSSELL, LOUIS;  
PEDRAGOSA, MIQUEL, MORETO;  
PEREZ-BOSQUE, ANNA;  
POZO, FRANCISCO, JAVIER POLO y  
CRENSHAW, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 403 054 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 reducir la inflamación pulmonar en un animal.

**Antecedentes de la Invención**

5 La fuente principal de nutrientes para el organismo es la sangre, que está compuesta de proteínas sumamente funcionales que incluyen inmunoglobulinas, albúmina, fibrinógeno y hemoglobina. Las inmunoglobulinas son productos de las células B maduras (células plasmáticas), y hay cinco inmunoglobulinas diferentes denominadas como las clases: M, D, E, A, y G. IgG es la clase principal de inmunoglobulina en la sangre. La administración intravenosa de productos de inmunoglobulinas se ha usado durante mucho tiempo para intentar regular o estimular el sistema inmunitario. La mayoría de los indicios en relación a los efectos de la IgG intravenosa sobre el sistema inmunitario sugiere que la porción de la fracción constante (Fc) de la molécula desempeña una función reguladora. Las propiedades de unión al antígeno específico de una molécula de IgG individual son conferidas por una disposición estérica tridimensional intrínseca a las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de dos cadenas ligeras y dos pesadas de la molécula. La región constante se puede separar de la región variable si la molécula intacta se escinde mediante una enzima proteolítica, tal como papaína. Tal tratamiento produce dos fracciones con la especificidad del anticuerpo (fracciones Fab) y una fracción relativamente constante (Fc).

15 sIgA es la clase de inmunoglobulina predominante secretada en las superficies mucosas a través de los fluidos corporales, tales como saliva, lágrimas, leche, líquido broncoalveolar, y otras secreciones. Se ha demostrado previamente que IgA posee características anti-inflamatorias. Véase, p.ej., Wolf HM, et al. (1994), Human serum IgA downregulates the release of inflammatory cytokines (tumor necrosis factor-alpha, Interleukin-6) in human monocytes, Blood 83:1278-1288. En contraste, los mismos autores no demostraron los efectos anti-inflamatorios de una composición que contenía IgG. La IgA no existe a concentraciones en sangre o leche que faciliten una concentración suficiente para la administración oral. Además, una inmunoglobulina de cualquier clase es una molécula demasiado grande para permitir que la absorción consiga efectos terapéuticos tras la administración oral. Se ha demostrado que una inmunoglobulina oral es beneficiosa para el tratamiento de una enfermedad gastrointestinal y otras afecciones gastrointestinales, pero no se han demostrado efectos anti-infecciosos ni anti-inflamatorios en el tejido pulmonar. Así, el hecho de que IgA sea anti-inflamatoria no hace posible que se use como un tratamiento adecuado de la inflamación pulmonar.

20 Numerosas células del organismo tienen diferentes receptores de membrana para la porción Fc de una molécula de IgG (Fcr). Aunque algunos receptores Fcr se unen a IgG libre, la mayoría se unen de manera más eficaz si un antígeno está unido a la molécula de anticuerpo. La unión de un antígeno da como resultado un cambio configuracional en la región Fc que facilita la unión al receptor. Una interacción compleja de señales proporciona un equilibrio y una forma adecuada a una respuesta inmunitaria generada en cualquier momento dado en respuesta a un antígeno. Las respuestas específicas de antígeno se inician cuando las células presentadoras de antígenos especializadas presentan el antígeno, formando un complejo con las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, a los receptores de células T auxiliares inductoras específicas capaces de reconocer ese complejo. IgG parece estar implicada en la regulación de las reacciones alérgicas y autoinmunitarias. Se ha propuesto durante mucho tiempo una inmunoglobulina intravenosa para la manipulación inmunitaria, pero se han alcanzado resultados diversos en el tratamiento de enfermedades. Se describe una revisión detallada del uso de una inmunoglobulina intravenosa como terapia farmacológica para la manipulación del sistema inmunitario en el Vol. 326, N° 2, páginas 107-116, New England Journal of Medicine, Dwyer, John M., cuya descripción se incorpora en la presente memoria como referencia.

35 El lipopolisacárido (LPS), también mencionado habitualmente como endotoxina, un componente de glicolípido proinflamatorio importante de la pared celular de las bacterias gram-negativas, es uno de los agentes presentes de manera ubicua como contaminante en las partículas transportadas por el aire, que incluyen la contaminación del aire, los polvos orgánicos, y el humo del tabaco. Se ha informado que la exposición crónica a niveles significativos de LPS está asociada al desarrollo y/o la progresión de muchos tipos de enfermedades pulmonares, que incluyen asma, bronquitis crónica, y obstrucción irreversible progresiva del flujo de aire, que se caracterizan por procesos inflamatorios crónicos en el pulmón.

45 Existe un esfuerzo y necesidad constantes en la técnica de composiciones y métodos mejorados para reducir los efectos de LPS y otros componentes inflamatorios en los pulmones que no requieran niveles superiores de IgA. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de animales con enfermedades por disfunciones inmunitarias pulmonares.

Otro objetivo de la invención es proporcionar una composición farmacéutica nueva que comprende plasma purificado que incluye niveles concentrados de inmunoglobulinas.

55 Un objetivo adicional de la invención es proporcionar una composición farmacéutica nueva que comprende plasma purificado que está sustancialmente exento de IgA.

Estos y otros objetivos de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

**Sumario de la Invención**

Según la invención, los solicitantes han identificado, purificado y aislado componentes del plasma, y derivados de los mismos, que son útiles como una composición farmacéutica para reducir la inflamación pulmonar en animales, que incluyen los seres humanos.

5 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición de una cantidad eficaz de una fracción plasmática que comprende al menos un 30% en peso de IgG y un 10% o menos en peso de IgA para el uso en la administración a un animal que tiene inflamación pulmonar para reducir dicha inflamación pulmonar.

10 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición de una cantidad eficaz de una fracción plasmática que comprende al menos un 30% en peso de IgG y un 10% o menos en peso de IgA; para el uso en la administración, en un aerosol farmacéuticamente aceptable, a un animal que tiene inflamación pulmonar inducida por LPS para reducir dicha inflamación pulmonar.

15 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición de una cantidad eficaz de una fracción plasmática que comprende al menos un 40% en peso de IgG, y dicha fracción plasmática contiene niveles indetectables de IgA, para el uso en la administración a un animal que tiene una inflamación pulmonar inducida por LPS para reducir dicha inflamación pulmonar.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición para el uso en la reducción de la inflamación pulmonar en un animal que comprende: una fracción plasmática que comprende al menos un 30% en peso de IgG y un 10% o menos de IgA; un agente terapéuticamente activo eficaz en el tratamiento o la reducción de los síntomas de la inflamación pulmonar; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Según la invención, una composición de plasma que comprende inmunoglobulinas que incluye niveles concentrados de IgG, cuando se administra de manera oral, reduce la inflamación pulmonar, e induce una disminución de citocinas pro-inflamatorias, tales como los niveles de TNF- $\alpha$ , respecto de los animales a los que no se proporciona oralmente la inmunoglobulina o las fracciones plasmáticas.

25 La invención incluye la administración de una fracción plasmática (PF) que incluye niveles concentrados de inmunoglobulinas, tales como IgA, IgM, y especialmente IgG. En una realización de la invención, la PF contiene niveles indetectables de IgA. La composición de la invención es sorprendentemente eficaz en la prevención y/o reducción de la inflamación pulmonar, que incluye la activación de monocitos inducida por LPS en el líquido de lavado bronco-alveolar y la estimulación de leucocitos inducida por LPS en el tejido pulmonar, incluso tras la administración oral. Esto ha sido inesperado, ya que tradicionalmente se creía que las proteínas plasmáticas, tales como las inmunoglobulinas, se debían introducir de manera intravenosa para inhibir una enfermedad inflamatoria.

**Breve Descripción de los Dibujos**

La Fig.1 ilustra el protocolo experimental para el Ejemplo 1.

La Fig. 2 es un gráfico que representa la modificación de la activación inducida por LPS de monocitos mediante control, SDPP, PF, LPS, LPS-SDPP, y LPS-PF, de acuerdo con el Ejemplo 1.

35 La Fig. 3 es un gráfico que representa la modificación de la activación inducida por LPS de leucocitos pulmonares de acuerdo con el Ejemplo 1.

La Fig. 4 es un gráfico que representa la modificación de la activación inducida por LPS de monocitos en el líquido de lavado broncoalveolar (LLBA) de acuerdo con el Ejemplo 1.

La FIG. 5 es un gráfico que representa la modificación de TGF $\beta$ 1 total de acuerdo con el Ejemplo 1.

40 La FIG. 6 es un gráfico que representa la modificación de TGF $\beta$ 1 inmaduro de acuerdo con el Ejemplo 1.

La FIG. 7 es un gráfico que representa la modificación de TGF $\beta$ 1 maduro de acuerdo con el Ejemplo 1.

La FIG. 8 es un gráfico que representa la proporción de modificación de TGF $\beta$ 1 maduro respecto del inmaduro de acuerdo con el Ejemplo 1.

45 La FIG. 9 es un gráfico que representa la modificación de las concentraciones de Il-1a en el líquido de lavado broncoalveolar (LLBA) de acuerdo con el Ejemplo 1.

La FIG. 10 es un gráfico que representa la modificación de las concentraciones de Il-1b en LLBA de acuerdo con el Ejemplo 1.

La FIG. 11 es un gráfico que representa la modificación de las concentraciones de Il-2 en LLBA de acuerdo con el Ejemplo 1.

50 La FIG. 12 es un gráfico que representa la modificación de las concentraciones de Il-4 en LLBA de acuerdo con el

Ejemplo 1.

La FIG. 13 es un gráfico que representa la modificación de las concentraciones de IL-6 en LLBA de acuerdo con el Ejemplo 1.

5 La FIG. 14 es un gráfico que representa la modificación de las concentraciones de IL-12 (p40) en LLBA de acuerdo con el Ejemplo 1.

La FIG. 15 es un gráfico que representa la modificación de las concentraciones de TNF- $\alpha$  en LLBA de acuerdo con el Ejemplo 1.

### Descripción Detallada de la Invención

10 Según la invención, el solicitante ha proporcionado en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende componentes de inmunoglobulina purificados y concentrados a partir de plasma animal que son útiles en la reducción de la inflamación pulmonar en animales, que incluye la inflamación pulmonar inducida por LPS.

15 Según la invención, la gamma-globulina aislada a partir de fuentes animales tales como suero, plasma, huevo, o leche se administra de manera oral para el tratamiento de la inflamación pulmonar inducida por LPS. De manera bastante sorprendente, se ha descubierto que la administración oral de esta composición disminuye sustancialmente la activación de monocitos inducida por LPS en el líquido de lavado broncoalveolar (LLBA), y además previene la estimulación de leucocitos inducida por LPS en el tejido pulmonar.

20 Tal como se usa en la presente memoria con referencia a la composición de la invención, se usarán todos los términos "plasma", "globulina", "gamma-globulina", e "inmunoglobulina". Todos estos pretenden describir una composición purificada a partir de fuentes animales que incluyen sangre, huevo, o leche que conserva la región Fc de la molécula de inmunoglobulina. Esto también incluye las inmunoglobulinas recombinantes transgénicas purificadas a partir de bacterias, plantas o animales transgénicos. Estas se pueden administrar mediante plasma secado por pulverización, o una globulina que se ha purificado adicionalmente a partir de él, o cualquier otra fuente de globulina sérica que esté disponible. Además, tal como se usa en la presente memoria, los términos "PF" (o "Fracción Plasmática") e "IgC" ("Concentrado de Inmunoglobulina") son intercambiables, y se refieren a una fracción plasmática en la que se ha eliminado la fibrina y la albúmina del plasma. Así, tanto PF como IgC se refieren a una fracción plasmática en la que se ha eliminado la fibrina y la albúmina del plasma. Una fuente de globulina purificada es ImmunoLin®, disponible de Proliant Inc.

30 La globulina se puede purificar según cualquiera de varios métodos disponibles en la técnica, que incluyen los descritos en Akita, B. M. y S. Nakai. 1993. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *Journal of Immunological Methods* 160:207-214; Steinbuch, M. y R. Audran. 1969. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 134:279-284; Lee, Y., T. Aishima, S. Nakai, y J. S. Sim. 1987. Optimization for selective fractionation of bovine blood plasma proteins using polyethylene glycol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35:958-962; Poison, A., G. M. Potgieter, J. F. Langier, G. E. F. Mears, y F. J. Toubert. 1964. *Biochem. Biophys. Acta.* 82:463-475.

El plasma animal a partir del cual se puede aislar la inmunoglobulina u otras fracciones plasmáticas incluye plasma porcino, bovino, ovino, aviar, equino, o caprino. Además, los solicitantes han identificado que las fuentes de especies cruzadas de las gamma globulinas todavía proporcionan los efectos de la invención.

40 Los concentrados del producto se pueden obtener mediante secado por pulverización, liofilización, o cualquier otro método de secado que no provoque que el plasma pierda su capacidad de reducir la inflamación pulmonar inducida por LPS. Tal como se usa en la presente memoria, el término "SDAP" se refiere a plasma animal secado por pulverización de cualquier fuente. Tal como se usa en la presente memoria, proteína plasmática secada por pulverización (SDPP) es una mezcla compleja de proteínas activas y otros compuestos biológicamente importantes derivados del plasma de cualquier especie que se ha secado mediante pulverización. De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, se pueden usar SDAP y SDPP de manera intercambiable, o se pueden usar por separado o individualmente. Los concentrados se pueden usar también en su forma líquida o congelada.

45 El ingrediente activo también se puede microencapsular, lo cual lo protege y estabiliza de las temperaturas elevadas, oxidantes, pH, humedad, etc. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en comprimidos, cápsulas, ampollas para uso oral, polvo de granulado, crema, tanto en forma de un único ingrediente como asociado con otros excipientes o compuestos activos, o incluso como un aditivo para el pienso.

Un método para conseguir un concentrado de la composición de gamma-globulina de la invención es el siguiente, aunque la globulina se puede administrar en forma de un componente del plasma.

55 El concentrado de inmunoglobulina procede de sangre de un animal. La fuente de la sangre puede ser de cualquier animal que tenga sangre, que incluye plasma e inmunoglobulinas. Por comodidad, se prefiere la sangre procedente de plantas de procesamiento de carne de vaca, carne de cerdo, y aves. Se añade un anticoagulante a la sangre

completa y después la sangre se centrifuga para separar el plasma. Se puede usar cualquier anticoagulante para este fin, lo que incluye citrato sódico y heparina. Los expertos en la técnica pueden apreciar fácilmente tales anticoagulantes. Después se añade al plasma calcio u otro reactivo adecuado para reaccionar con el fibrinógeno para favorecer la coagulación, la conversión de fibrinógeno en fibrina, o para facilitar la eliminación del fibrinógeno; sin embargo, son aceptables otros métodos. Esta mezcla se centrifuga después para eliminar la porción de fibrina.

Una vez que se elimina la fibrina del plasma, lo que da como resultado el suero, se puede usar el suero como fuente principal de Ig. De manera alternativa, se podría inactivar esta parte del mecanismo de coagulación mediante el uso de diversos anticoagulantes.

El plasma desfibrinado se trata a continuación con una cantidad de compuesto salino o polímero suficiente para precipitar la fracción de albúmina o de globulina del plasma. Los ejemplos de los compuestos de fosfato que se pueden usar para este fin incluyen todos los polifosfatos, que incluyen hexametáfosfato sódico y polifosfato potásico. La globulina se puede aislar también por medio de la adición de polietilén glicol o sulfato amónico.

Tras la adición del compuesto de fosfato, se disminuye el pH de la disolución plasmática para estabilizar el precipitado de albúmina. El pH no se debería reducir por debajo de 3,5, ya que esto provocará que las proteínas del plasma resulten dañadas. Se puede usar cualquier tipo de ácido para este fin, con tal de que sea compatible con la disolución plasmática. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente tales ácidos. Los ejemplos de ácidos adecuados incluyen, pero sin limitación, HCl, ácido acético, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ácido cítrico, y H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. El ácido se añade en una cantidad suficiente para disminuir el pH del plasma hasta el intervalo designado. En general, esta cantidad oscilará desde una proporción de alrededor de 1:4 hasta 1:2 de ácido respecto del plasma. El plasma se centrifuga después para separar la fracción de globulina de la fracción de albúmina.

La siguiente etapa del proceso es elevar el pH de la fracción de globulina con una base hasta que ya no sea corrosivo para el equipo de separación. Las bases aceptables para este fin incluyen NaOH, KOH, y otras bases alcalinas. Tales bases son fácilmente determinables para los expertos en la técnica. El pH de la fracción de globulina se eleva hasta que está en un intervalo no corrosivo, que en general estará entre 5,0 y 9,0. Un método preferido de fabricación de la fracción plasmática de la solicitud se expone en la sol. de pat. de EE.UU. de N° de serie 10/470.982, cuya descripción se incorpora en la presente memoria como referencia.

El concentrado de inmunoglobulina final se puede secar opcionalmente por pulverización o liofilizar hasta un polvo. El polvo posibilita un empaquetamiento más sencillo, y el producto permanece estable durante un período de tiempo más largo que el concentrado de globulina en bruto en forma líquida o congelada. Se ha descubierto que el polvo de concentrado de inmunoglobulina preferido contiene aproximadamente un 40-55% en peso de IgG, 1-2% en peso de IgA, y 6-8% en peso de IgM. Como mínimo, el concentrado de inmunoglobulina de la invención debería contener al menos un 50% en peso de IgG, preferiblemente al menos un 50% en peso de IgG, y lo más preferiblemente al menos un 55% en peso. Como mínimo, el concentrado debería contener al menos alrededor de un 30% en peso de IgG y no más de alrededor de un 10% en peso de IgA. En una realización de la invención, el concentrado de inmunoglobulina no contiene niveles detectables de IgA.

Además de la administración con vehículos convencionales, los ingredientes activos se pueden administrar mediante una diversidad de métodos especializados de administración de fármacos que conocen los expertos en la técnica.

Los expertos en las técnicas médicas apreciarán fácilmente que las dosis y los calendarios de la inmunoglobulina variarán dependiendo de la edad, salud, sexo, estatura y peso del paciente más que la administración, etc. Estos parámetros se pueden determinar para cada sistema mediante procedimientos y análisis bien establecidos, p.ej., en ensayos clínicos de fase I, II, y III.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, el concentrado de inmunoglobulina se puede administrar por medio del consumo oral en una cantidad suficiente para reducir, atenuar, o inhibir la inflamación pulmonar inducida por LPS. A este respecto, el concentrado de Ig (IgC) se debería administrar para proporcionar de 10 mg de IgC por kg de peso corporal a 250 mg de IgC por kg de peso corporal. Tal como se usa en la presente memoria, el término "inflamación pulmonar inducida por LPS" significa la inflamación que se da como resultado del LPS, que provoca una elevación de los niveles de uno o más factores inflamatorios en parte de los pulmones, que incluye el tejido pulmonar y el líquido de lavado broncoalveolar (LLBA). Tales factores inflamatorios incluyen los niveles incrementados de monocitos, leucocitos, TGFβ1, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 (p40), y TNF-α.

Para otros modos de administración farmacéutica, tales como oral, intravenosa, intramuscular, intrapulmonar (p.ej. en aerosol para inhalación), intratecal, sublingual, intrabucal, subcutánea, etc., el concentrado de inmunoglobulina se puede dosificar a un nivel suficiente para reducir la inflamación pulmonar inducida por LPS. Un intervalo de dosis típico para un adulto sería de alrededor de 500 mg a 20 g de IgC por día. Las dosis orales diarias se dividen preferiblemente y se administran con una separación de doce horas. Pueden ser necesarios regímenes de dosificación más frecuentes para una eficacia óptima.

La fracción plasmática de la invención se puede usar también en la prevención de la inflamación pulmonar. A este respecto, la fracción plasmática se puede administrar antes de la exposición a un irritante químico, factor ambiental, u otra circunstancia que se espera que desencadene la inflamación pulmonar. Para dicho tratamiento preventivo, la

fracción plasmática se puede administrar hasta varias semanas antes del desencadenante inflamatorio a las mismas dosis descritas anteriormente o menores, para proporcionar al menos cierta protección contra la respuesta inflamatoria esperada.

5 Las composiciones en aerosol para la administración se conocen bien en la técnica, y en general deberían ser estériles, isotónicas, sin conservantes, y con un pH equilibrado a 6,0, similar al epitelio de las vías respiratorias para evitar la irritación bronquial. Las composiciones en aerosol se pueden administrar por medio de un dispositivo de nebulización. Hay disponibles diferentes dispositivos para la terapia de inhalación, que incluyen inhaladores de dosis medidas (MDI), inhaladores de polvo seco, nebulizadores de chorro, y nebulizadores ultrasónicos.

10 El concentrado de globulina se puede combinar con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo o excipiente líquido adecuado y un aditivo o aditivos auxiliares opcionales. Los vehículos y excipientes líquidos son convencionales, y están disponibles comercialmente. Los ejemplos ilustrativos de los mismos son agua destilada, solución salina fisiológica, soluciones acuosas de dextrosa, y similares.

15 La fracción plasmática de esta invención se puede administrar sola o junto con otros agentes terapéuticos usados en el tratamiento de enfermedades y afecciones pulmonares, en un equipo para la terapia de combinación o combinados en la misma forma farmacéutica. Tales agentes terapéuticos adicionales incluirían, pero sin limitación, antihistamínicos, descongestivos, antiinflamatorios, antibióticos, analgésicos, antineoplásicos, antivirales, broncodilatadores, corticoesteroides, NSAIDs, etc. Se puede usar cualquier tipo de medicación a este respecto, con tal de que sea compatible con la fracción plasmática y no limite o disminuya sustancialmente su eficacia en la reducción de la inflamación pulmonar.

20 En general, además de los compuestos activos, las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden contener excipientes y agentes auxiliares adecuados que facilitan el procesamiento de los compuestos activos hasta las preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. Las formas farmacéuticas orales abarcan los comprimidos, grageas, y cápsulas.

25 Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención se fabrican de una manera que es por sí misma muy conocida en la técnica. Por ejemplo, las preparaciones farmacéuticas se pueden hacer por medio de procesos de mezcla convencionales, granulación, producción de grageas, disolución, liofilización. Los procesos a usar dependerán en última instancia de las propiedades físicas del ingrediente activo utilizado.

30 Los excipientes adecuados son, en particular, rellenos tales como carbohidratos, por ejemplo, lactosa o sacarosa, manitol o sorbitol, preparaciones de celulosa y/o fosfatos de calcio, por ejemplo, fosfato tricálcico o fosfato dicálcico, así como aglutinantes tales como almidón, pasta, mediante el uso, por ejemplo, de almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinil pirrolidona. Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes, tales como los almidones anteriormente mencionados, así como carboximetil almidón, polivinil pirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato sódico. Los agentes auxiliares son agentes reguladores del flujo y lubricantes, por ejemplo, tales como sílice, talco, ácido esteárico o las sales del mismo, tales como estearato magnésico o estearato cálcico y/o polietilen glicol. Se pueden proporcionar núcleos de grageas con revestimientos adecuados que, si se desea, pueden ser resistentes a los jugos gástricos.

40 Para este fin, se pueden usar disoluciones concentradas de carbohidratos, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, polietilen glicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Para producir revestimientos resistentes a los jugos gástricos, se pueden añadir disoluciones de preparaciones de celulosa adecuadas, tales como ftalato de acetilcelulosa o ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, tintes y pigmentos al revestimiento del comprimido o gragea, por ejemplo, para la identificación o para caracterizar una combinación diferente de dosis del compuesto.

45 Otras preparaciones farmacéuticas que se pueden usar de manera oral incluyen las cápsulas duras hechas de gelatina, así como las cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los compuestos activos en forma de gránulos que se pueden mezclar con rellenos tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato magnésico y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se disuelven preferiblemente o se suspenden en líquidos adecuados; tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilen glicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes.

55 Se descubrió que las dosis orales de concentrado de globulina según la invención disminuían la inflamación inducida por LPS en el tejido pulmonar. La frase "respuesta inmunitaria inflamatoria," tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la respuesta que provoca inflamación del sistema inmunitario a una enfermedad, patógeno, antígeno o agresión. La frase "respuesta inmunitaria inflamatoria" también puede significar una reacción inflamatoria o una reacción inmunitaria. La respuesta inflamatoria se puede dar en mamíferos, que incluyen seres humanos, y se puede dar en respuesta a una enfermedad respiratoria.

Los usos clínicos del concentrado de globulina incluyen la prevención o el tratamiento de una afección o enfermedad respiratoria que implica la inflamación inducida por LPS. Tales afecciones incluyen, pero sin limitación, asma u otra

constricción de las vías respiratorias hipersensibles; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) u otra enfermedad pulmonar que provoca disnea; bronquitis crónica u otra inflamación y cicatrización permanente de los bronquios; enfisema u otra lesión de las paredes de los alveolos que provoca pérdida de elasticidad; pleuritis u otra inflamación de la membrana pleural que recubre los pulmones y la cavidad torácica; cáncer de pulmón o tumores malignos que se desarrollan en el tejido pulmonar; bronquitis aguda u otra inflamación de los bronquios; inflamación aguda o crónica de los alveolos; gripe u otra infección provocada por el virus de la gripe; neumonía provocada por virus o bacterias; sinusitis u otra inflamación de las cavidades sinusales; resfriado común provocado por virus o bacterias; fibrosis quística; enfermedades respiratorias provocadas por toxinas o contaminantes o causas ambientales; enfermedades respiratorias provocadas por SARS (síndrome respiratorio agudo grave), o RSV (virus sincitial respiratorio) u otros agentes virales; tuberculosis u otra enfermedad respiratoria provocada por micobacterias u otras bacterias; u otra enfermedad respiratoria, que incluye las provocadas por complicaciones que surgen de la infección por HIV o enfermedad auto-inmunitaria.

En ciertas realizaciones de la invención, la respuesta inflamatoria se da en el animal y se puede observar en el tejido pulmonar o LLBA o sangre u otro componente del cuerpo del animal.

Tal como se usa en la presente memoria, la palabra "atenuar" se define para incluir, pero sin limitación, inhibir, debilitar, afectar, reducir, y disminuir.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "antígeno" se refiere a una sustancia que es capaz de provocar o inducir o estimular una respuesta inmunitaria, y/o reacciona de manera específica con anticuerpos y/o células T. Un antígeno puede ser de origen viral o bacteriano, o puede ser una sustancia que es material exógeno respecto de un sistema biológico. Se puede hacer referencia a un antígeno como un inmunógeno. LPS, tal como se proporciona más adelante en la presente memoria, es un ejemplo de un antígeno. En ciertas realizaciones de la invención, una endotoxina es un antígeno. En otra realización de la invención, un antígeno es un componente del agente causante de una enfermedad respiratoria. Por ejemplo, un antígeno puede ser una proteína o componente de la membrana externa de una célula bacteriana, en el que la bacteria es un agente causante de una enfermedad. Un antígeno puede ser también un componente de una envoltura viral, en el que el virus concreto es el agente causante de una enfermedad.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "LPS" es una abreviatura de lipopolisacárido, que es una macromolécula o compuesto que contiene restos lipídicos y polisacáridos. LPS puede referirse también a un grupo de sustancias presentes o halladas habitualmente como constituyentes importantes de las paredes celulares de ciertas bacterias, que incluyen las cepas gram-negativas. LPS puede ser sumamente inmunógeno o antigénico en los sistemas biológicos. Tal como se usa en la presente memoria, LPS se refiere también a macromoléculas o moléculas de lipopolisacárido, o fragmentos de las mismas, o porciones seleccionadas de las mismas.

La administración oral de IgG u otros componentes plasmáticos tiene enormes ventajas sobre la administración parenteral. Las más evidentes son los riesgos asociados a la administración intravenosa, que incluyen: reacciones alérgicas, el riesgo incrementado de transferencia de una enfermedad desde la sangre humana, tal como VIH o hepatitis, la necesidad de la misma especie de origen, el coste de administración, y el beneficio de la IgG oral es la mayor neutralización de endotoxina y la estimulación "basal" del sistema inmunitario; el uso potencial de IgG xenógenas. La invención proporciona un método no invasivo para la modulación de la respuesta inmunitaria inducida por LPS y otros factores inflamatorios. Esto se puede usar para tratar una diversidad de afecciones y enfermedades relacionadas con los pulmones, en las que la inmunomodulación, inmunosupresión o inmunoregulación es el resultado deseado (trasplantes de órganos, trastornos inmunoestimuladores crónicos, etc.).

Se ha descubierto que la fracción plasmática de la invención es eficaz en la atenuación y/o inhibición de la inflamación pulmonar en diversos componentes pulmonares, que incluyen al menos el líquido de lavado broncoalveolar (LLBA) y el tejido pulmonar. A este respecto, se ha descubierto que el PF es eficaz en la reducción de la inflamación pulmonar mediante múltiples modos de acción, que incluyen la reducción de la activación de monocitos y leucocitos.

El siguiente ejemplo pretende ilustrar sin limitación ciertas realizaciones de la invención.

#### Ejemplo 1: Estudio de Inflamación Pulmonar

Efecto de una Proteína Plasmática Secada por Pulverización sobre el Tejido Linfoide Asociado a las Fosas Nasales en un Modelo de Inflamación Pulmonar en Ratones

Debido a que el sistema inmunitario mucoso común conecta los sitios inductivos (placas de Peyer y Tejido Linfoide Asociado a las Fosas Nasales; NALT) con los sitios efectores (lámina propia de los tractos intestinal y respiratorio), se estudió el efecto de las proteínas plasmáticas en la dieta sobre la inflamación pulmonar. Este estudio se llevó a cabo para determinar el grado en el que la complementación con SDPP y PF puede atenuar o inhibir la inflamación pulmonar inducida por LPS.

Protocolo:

Se alimentó a ratones C57BL/6 Hsd con dietas complementadas con un 8% de SDPP (grupo de SDPP), 1,5% de PF (concentrado de inmunoglobulina; grupo de PF) o con proteínas lácteas (grupo de Control) desde el día 19 (destete) hasta el día 33. En el día 32, se administró a los ratones una dosis intranasal de 500 µg de LPS/kg de peso corporal (grupos de LPS, LPS-SDPP y LPS-PF), o PBS (grupos de Control, SDPP y PF), y se sacrificaron 24 h después. (Véase la FIG. 1 para el diagrama del protocolo experimental).

Grupos Experimentales:

- Grupo 1: control: administración de PBS + dieta de control
- Grupo 2: SDPP: administración de PBS + dieta de SDPP
- Grupo 3: PF: administración de PBS + dieta de PF
- Grupo 4: LPS: administración de LPS (EC) + dieta de control
- Grupo 5: LPS-SDPP: administración de LPS (EC) + dieta de SDPP
- Grupo 6: LPS-PF: administración de LPS (EC) + dieta de PF

Muestras:

1. Líquido de lavado broncoalveolar (LLBA)
  - a) Proteína en LLBA
  - b) Células en LLBA
  - c) Caracterización fenotípica
  - d) Liberación de citocinas y quimiocinas
2. Sangre
  - a) Número de células
  - b) Caracterización fenotípica
3. Tejido pulmonar
  - a) Infiltración celular en el pulmón
  - b) Caracterización fenotípica
  - c) Mediadores anti-inflamatorios y pro-inflamatorios

Resultados y Discusión:

Se determinó el porcentaje de las diferentes subpoblaciones de linfocitos y células polimorfonucleares en el líquido de lavado broncoalveolar (LLBA), en el tejido pulmonar, y en la sangre.

En LLBA, la administración de LPS incrementó 27 veces el número de células leucocitarias. LPS también modificó el perfil de las células en LLBA (en el grupo de Control, el 3% fueron linfocitos y el 97% polimorfonucleares; en el grupo de LPS, fueron el 40% y 60%, respectivamente;  $P < 0.001$ ). Las dietas complementadas con SDPP o PF no modificaron la respuesta a LPS, pero SDPP previno en parte la activación inducida por LPS de los monocitos ( $P < 0,05$ ). En LLBA, LPS incrementó la concentración de proteínas 1,5 veces a las 6 horas, y 2,4-4 veces a las 24 horas. Además, en LLBA, LPS indujo el reclutamiento de leucocitos, principalmente linfocitos. LPS también cambió el perfil de las células polimorfonucleares hacia el subgrupo neutrófilo. LPS incrementó además la activación tanto de monocitos como de neutrófilos.

En el tejido pulmonar, LPS incrementó el porcentaje de neutrófilos y monocitos, lo que dio como resultado un incremento del 50% de los granulocitos infiltrados ( $P < 0,05$ ). Las dietas complementadas no modificaron los efectos de LPS. Sin embargo, las dietas de SDPP y de PF redujeron el porcentaje de neutrófilos y monocitos residentes ( $P < 0,05$ ), así como el grado de activación de los neutrófilos del pulmón ( $P < 0,05$ ). (Es decir, la complementación con proteínas plasmáticas redujo las células inmunitarias innatas de NALT sin afectar a la respuesta inmunitaria pulmonar a LPS). El grado de activación de los monocitos infiltrados se redujo en parte mediante SDPP. (FIG. 2). En el tejido pulmonar, LPS indujo el reclutamiento de leucocitos hacia el tejido pulmonar, incrementando el número y la activación de ambas poblaciones polimorfonucleares (p.ej., monocitos y neutrófilos). También en el tejido pulmonar,



la complementación con proteínas plasmáticas previno la estimulación de leucocitos inducida por LPS. (FIG. 3). En las condiciones de control, SDPP redujo el porcentaje de monocitos residentes. (FIG. 4).

5 En la sangre, LPS tuvo poco efecto sobre las poblaciones de leucocitos sanguíneos. Además, en las muestras de sangre, se descubrió que ningún complemento afectó a los efectos inducidos por LPS sobre los leucocitos sanguíneos.

La administración de LPS afecta al procesamiento de TGF $\beta$ 1 (la forma madura se reduce), pero no afecta a la expresión de la proteína precursora (el TGF $\beta$ 1 total no se modifica). (FIGS. 5-8). SDPP previene la reducción inducida por LPS a TGF $\beta$ 1 maduro. (FIG. 7).

10 LPS incrementa la liberación de citocinas pro-inflamatorias, tales como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 a las vías respiratorias pulmonares (LLBA) (FIGS. 9-15). El plasma en la dieta previene el incremento inducido por LPS de citocinas pro-inflamatorias Th1 sin afectar a la producción de IL-12.

LPS también incrementa la concentración de IL-2 (induce la activación de CD4 por medio de IL-2R), lo cual previenen ambos suplementos de la dieta.

15 LPS también estimula la producción de citocinas Th2 (IL-4). Ni SDPP ni PF tienen efectos significativos sobre esta variable.

Estos resultados se detallan adicionalmente en las FIGS. 2-15.

20 Aunque en la anterior memoria descriptiva esta invención se ha descrito con relación a ciertas realizaciones preferidas de la misma, y se han expuesto muchos detalles con fines ilustrativos, será evidente para los expertos en la técnica que la invención es susceptible de realizaciones adicionales, y que algunos de los detalles descritos en la presente memoria se puede variar de manera considerable sin apartarse de los principios básicos de la invención.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas en la presente memoria se incorporan como referencia en la presente memoria.

25 Habiendo descrito la invención con referencia a composiciones particulares, teorías de eficacia, y similares, será evidente para los expertos en la técnica que no se pretende que la invención se limite por tales realizaciones ilustrativas o mecanismos, y que se pueden hacer modificaciones sin apartarse del alcance o espíritu de la invención, tal como se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Se pretende que todas las modificaciones y variaciones evidentes estén incluidas dentro del alcance de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Las reivindicaciones pretenden cubrir los componentes y las etapas reivindicadas en cualquier secuencia que sea eficaz para cumplir los objetivos deseados, a menos que el contexto indique  
30 específicamente lo contrario.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición de una cantidad eficaz de una fracción plasmática que comprende al menos un 30% en peso de IgG y un 10% o menos en peso de IgA para el uso en la administración a un animal que tiene inflamación pulmonar para reducir dicha inflamación pulmonar.
- 5 2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que la fracción plasmática comprende al menos un 40% en peso de IgG y un 2% o menos en peso de IgA.
3. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que la inflamación pulmonar está inducida por LPS.
4. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que la fracción plasmática contiene niveles indetectables de IgA.
- 10 5. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que la fracción plasmática se administra por medio de administración oral para proporcionar un intervalo de dosis de alrededor de 10 mg a 500 mg por kg de peso corporal por día.
6. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que la fracción plasmática se administra de manera oral en una dosis de alrededor de 5 g a 20 g por día.
- 15 7. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que la fracción plasmática se administra de manera intrapulmonar.
8. La composición para el uso de la reivindicación 7, en la que la fracción plasmática se administra en un aerosol farmacéuticamente aceptable.
9. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que el animal es un ser humano.
- 20 10. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que la fracción plasmática se administra en los alimentos.
11. Una composición de una cantidad eficaz de una fracción plasmática que comprende al menos un 30% en peso de IgG y un 10% o menos en peso de IgA; para el uso en la administración, en un aerosol farmacéuticamente aceptable, a un animal que tiene inflamación pulmonar inducida por LPS para reducir dicha inflamación pulmonar.
- 25 12. Una composición de una cantidad eficaz de una fracción plasmática que comprende al menos un 40% en peso de IgG, y dicha fracción plasmática contiene niveles indetectables de IgA, para el uso en la administración a un animal que tiene inflamación pulmonar inducida por LPS para reducir dicha inflamación pulmonar.
- 30 13. Una composición para el uso en la reducción de la inflamación pulmonar en un animal que comprende: una fracción plasmática que comprende al menos un 30% en peso de IgG y un 10% o menos de IgA; un agente terapéuticamente activo eficaz en el tratamiento o la reducción de los síntomas de la inflamación pulmonar; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. La composición para el uso de la reivindicación 13, en la que el agente terapéuticamente activo se selecciona de al menos un miembro del grupo que consiste en antihistamínicos, descongestivos, antiinflamatorios, antibióticos, analgésicos, antineoplásicos, antivirales, broncodilatadores, corticoesteroides, y NSAIDs.
- 35 15. La composición para el uso de la reivindicación 13 que no contiene niveles detectables de IgA.

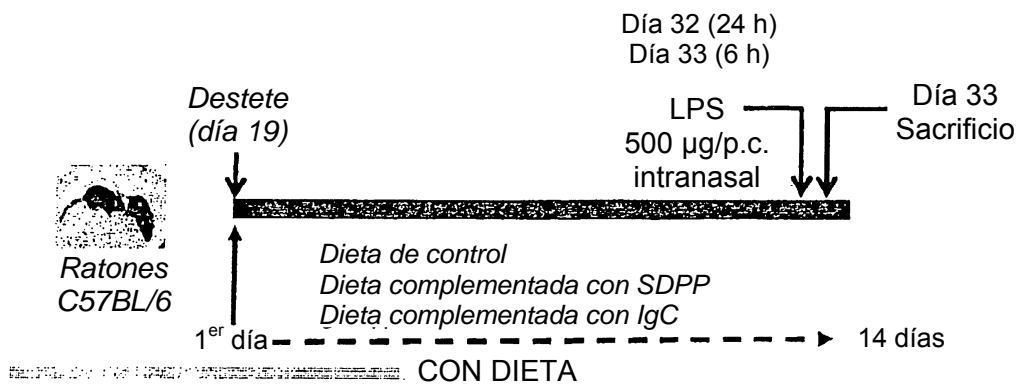


FIG. 1

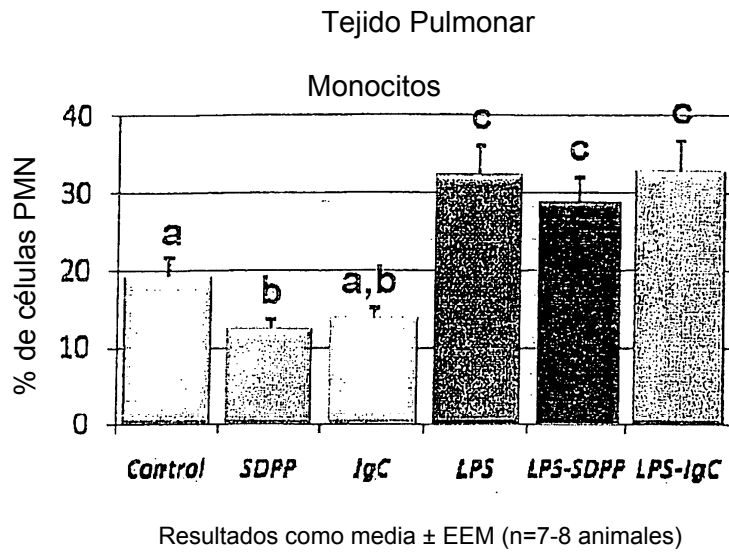
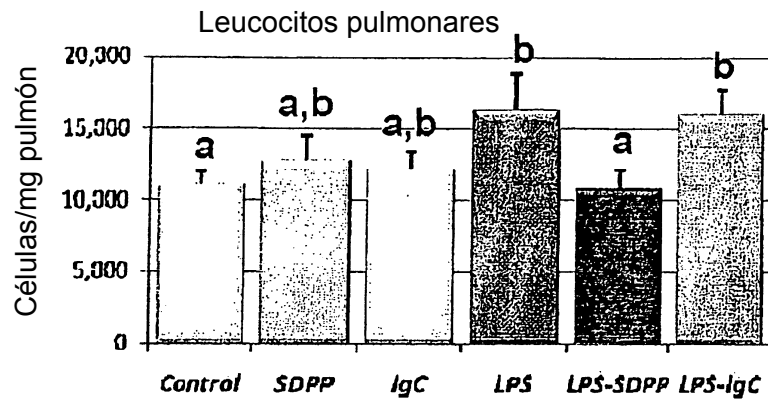


FIG. 2

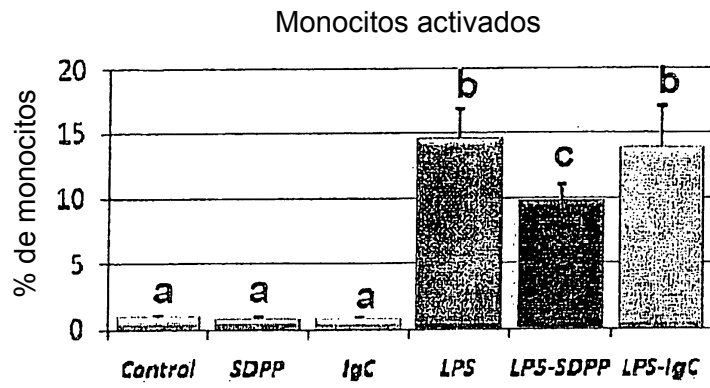
Tejido Pulmonar



Resultados como media  $\pm$  EEM (n=7-8 animales)

FIG. 3

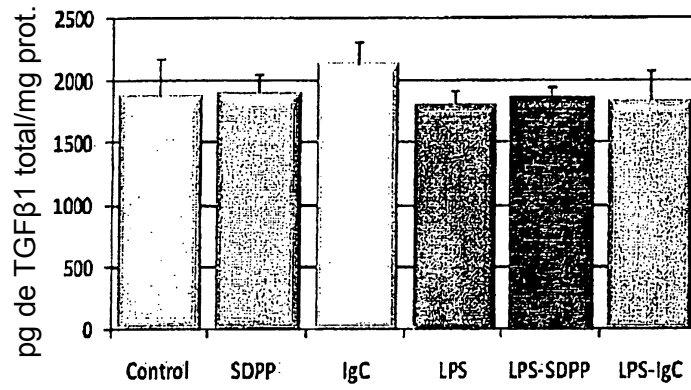
Líquido de lavado broncoalveolar (LLBA) 24 h



Resultados como media ± EEM (n=7-8 animales)

FIG. 4

Tejido Pulmonar  
TGF $\beta$ 1 total

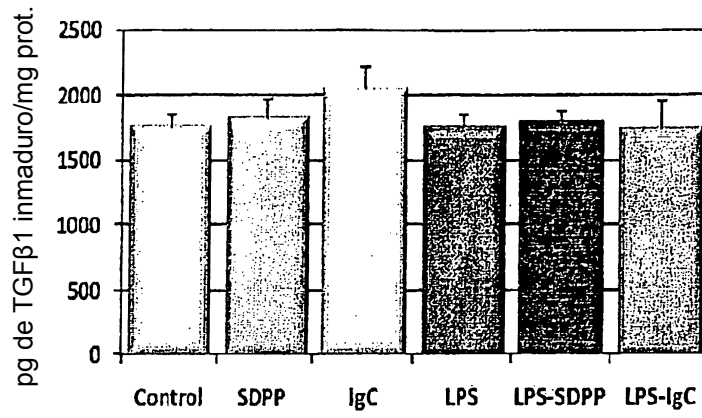


Resultados como media  $\pm$  EEM (n = 4-6 animales)

**FIG. 5**

Tejido Pulmonar

TGF $\beta$ 1 inmaduro

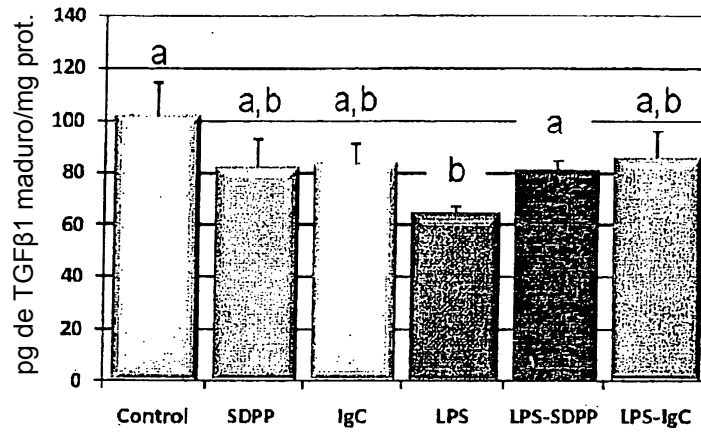


Resultados como media  $\pm$  EEM (n = 4-6 animales)

**FIG. 6**



Tejido Pulmonar  
TGFβ1 maduro

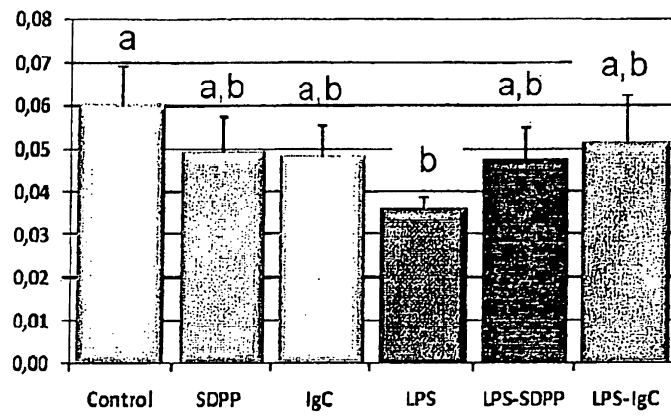


Resultados como media ± EEM (n = 4-6 animales)

FIG. 7

Tejido Pulmonar

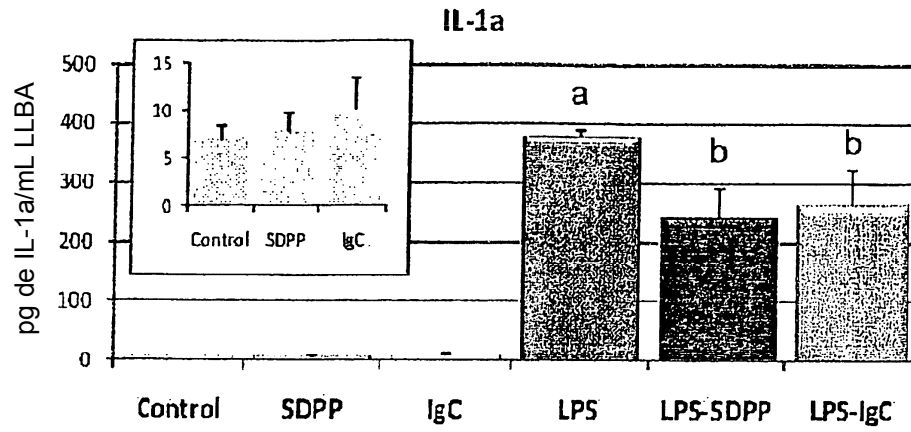
Proporción maduro/inmaduro



Resultados como media  $\pm$  EEM (n = 4-6 animales)

FIG. 8

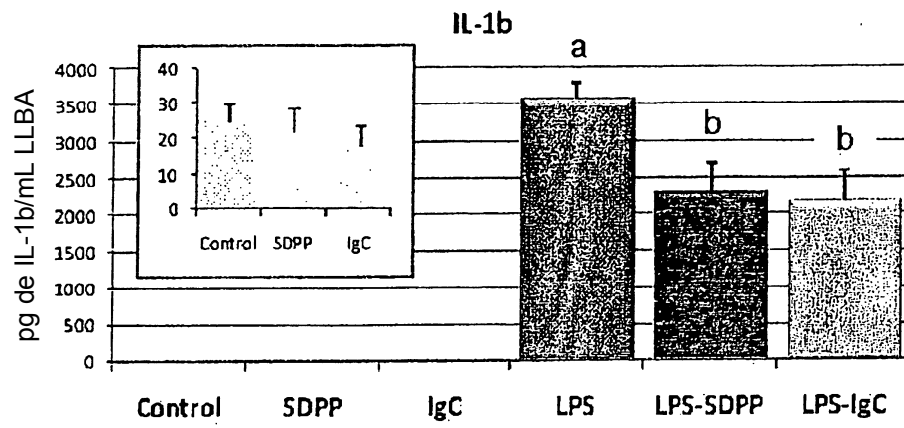
Líquido de lavado broncoalveolar (LLBA)



Resultados como media  $\pm$  EEM (n = 4-6 animales)

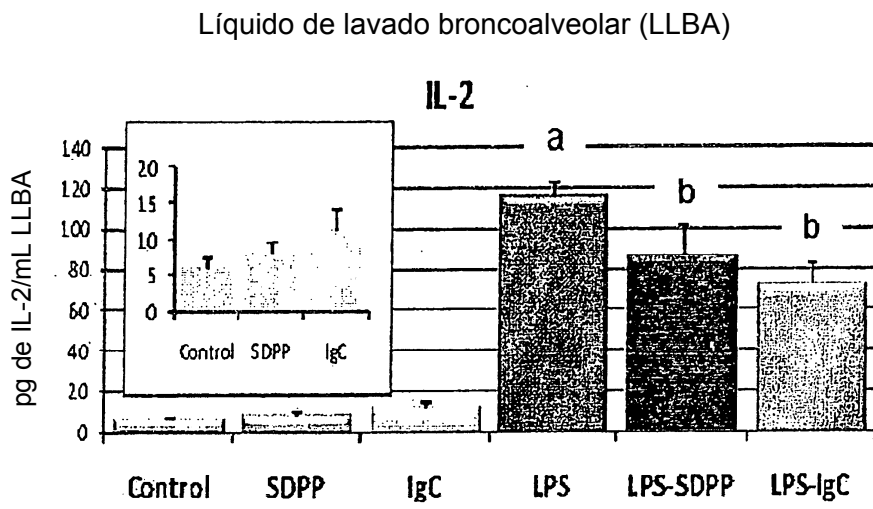
**FIG. 9**

Líquido de lavado broncoalveolar (LLBA)



Resultados como media  $\pm$  EEM (n = 4-6 animales)

FIG. 10

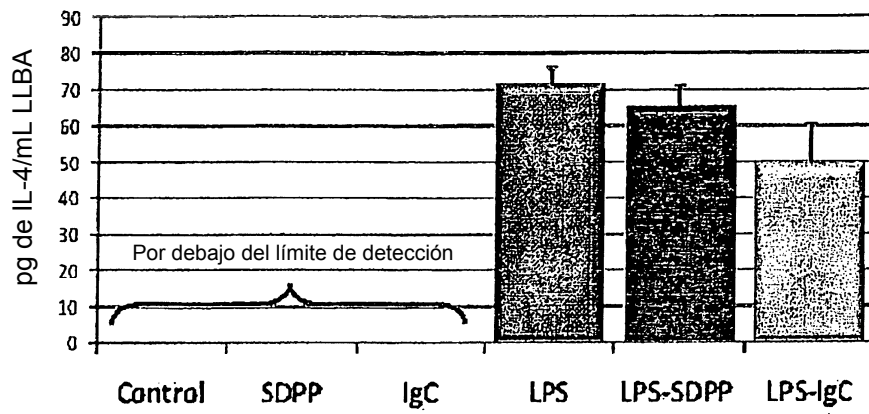


Resultados como media  $\pm$  EEM (n = 4-6 animales)

**FIG. 11**

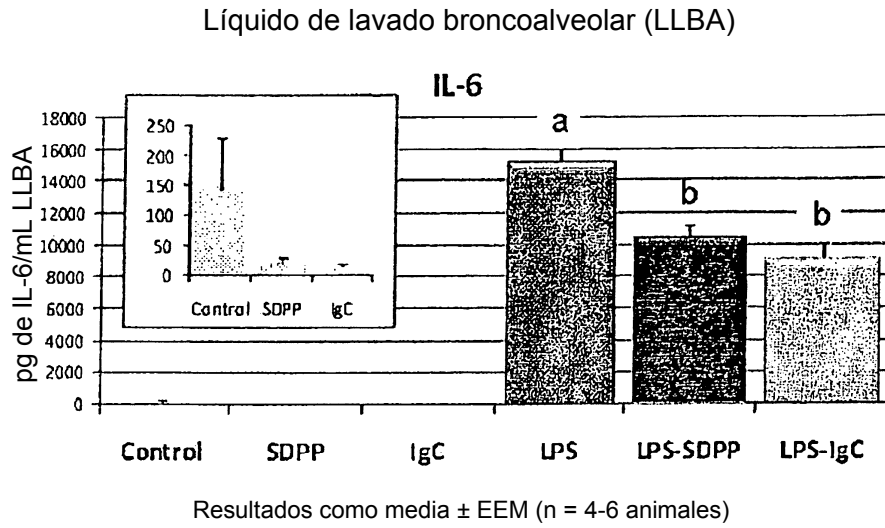
Líquido de lavado broncoalveolar (LLBA)

IL-4



Resultados como media  $\pm$  EEM (n = 4-6 animales)

FIG. 12



**FIG. 13**

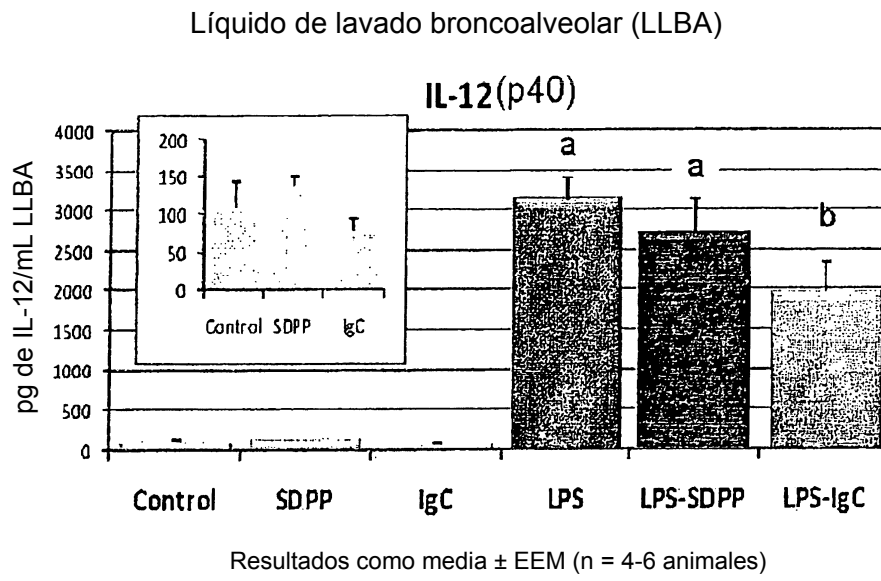
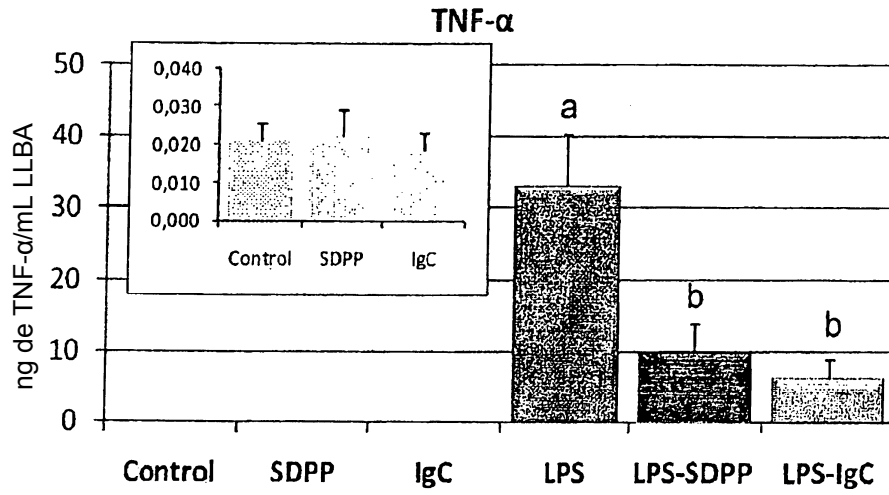


FIG. 14



Líquido de lavado broncoalveolar (LLBA)



Resultados como media  $\pm$  EEM (n = 4-6 animales)

FIG. 15