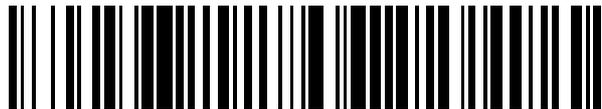


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 965**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2005 E 05763460 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 1734996**

54 Título: **Métodos y composiciones para tratar y prevenir enfermedad asociada con integrina alfa V beta 5**

30 Prioridad:

02.04.2004 US 559175 P

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

09.07.2013

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
OFFICE OF TECHNOLOGY TRANSFER, 1111 FRANKLIN STREET, 12TH FLOOR
OAKLAND, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**SHEPPARD, DEAN y
ATAKILIT, AMHA**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 411 965 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 tratar y prevenir enfermedad asociada con integrina alfa V beta 5

5 **Antecedentes de la invención**

El edema pulmonar ("PE") afecta a millones de personas cada año, provocando morbilidad y mortalidad sustancial. En pacientes con PE, los alvéolos se llenan de líquido de los capilares pulmonares lo que deteriora la transferencia de oxígeno a la circulación sistémica (Hall, *et al.* en CURRENT THERAPY IN RESPIRATORY MEDICINE (R. Chemiack, Ed., 1986), páginas 222-227). Esta secuencia de acontecimientos da como resultado hipoxemia, hipercapnia y muerte si no se toman medidas correctivas.

Cualquier afección o agente que altere la homeostasis de líquidos en los pulmones puede dar como resultado PE, que puede dividirse en general en PE cardiogénica y no cardiogénica (véase, por ejemplo, Kakouros y Kakouros, Hellenic J. Cardiol. 44:385-391 (2003)). Por ejemplo, el síndrome de dificultad respiratoria (aguda) del adulto/lesión pulmonar aguda o "SDRA", que puede desarrollarse como resultado de lesión pulmonar debido a, por ejemplo, neumonía, choque séptico, traumatismo, aspiración de vómito o inhalación química, se asocia con frecuencia con PE no cardiogénico. El PE no cardiogénico se caracteriza por un cambio en la permeabilidad vascular del tejido pulmonar que conduce a un aumento de los niveles de fluido en los pulmones. El PE cardiogénico se provoca con frecuencia por insuficiencia cardíaca del lado izquierdo y puede ser una complicación de un ataque cardíaco, filtración o válvulas cardíacas estrechadas (válvulas mitrales o aórticas), o cualquier enfermedad del corazón que da como resultado debilitamiento y/o agorrotamiento del músculo cardíaco (cardiomiopatía). El corazón con insuficiencia transmite su presión aumentada a las venas pulmonares. A medida que aumenta la presión en las venas pulmonares, el fluido se impulsa hacia los espacios aéreos (alvéolos). Este fluido se convierte después en una barrera al intercambio de oxígeno normal, dando como resultado apnea. El PE cardiogénico se caracteriza por presión hidrostática capilar aumentada que conduce a un aumento de los niveles de fluido en los pulmones.

El PE está provocado, por ejemplo, por permeabilidad capilar alterada; infección; toxinas inhaladas o en circulación; sustancias vasoactivas (por ejemplo, histamina, quininas); coagulación intravascular diseminada; reacciones inmunológicas; neumonía asociada con radiación; uremia; casi ahogamiento; inhalación de humo; y síndrome de dificultad respiratoria aguda; insuficiencia ventricular izquierda; estenosis mitral, endocarditis bacteriana; fibrosis venosa pulmonar; estenosis congénita del origen de las venas pulmonares, enfermedad venooclusiva pulmonar; sobreinfusión de fluidos; hipoalbuminemia (por ejemplo, de enteropatía renal, hepática, nutricional o de pérdida de proteínas); alta altitud; sobredosis de fármacos, traumatismo del SNC, hemorragia subaracnoidea, embolia pulmonar, enfermedad parenquimal pulmonar, eclampsia, anestesia y operaciones de derivación cardiopulmonar.

Los síntomas de EP pueden incluir, por ejemplo, apnea, respiración rápida y/o trabajosa, taquicardia, hipertensión, presión en el pecho, extremidades frías acompañado o no de cianosis, tos con esputo espumoso o rosado, uso extensivo de músculos de respiración accesorios, crepitaciones húmedas con o sin sibilancia y combinaciones de los mismos. Los ensayos para diagnosticar PE incluyen análisis de sangre tales como recuento sanguíneo completo (CBC), nitrógeno de urea en sangre (BUN), creatinina y proteína en suero. Se usan análisis de orina, gases sanguíneos arteriales (ABG), rayos x del pecho y electrocardiograma (ECG) todos para ayudar al médico a restringir el diagnóstico a PE.

El tratamiento de PE cardiogénico implica típicamente colocar el paciente con 100% de oxígeno, morfina para calmar la ansiedad y proporcionar algunos efectos cardíacos beneficiosos, furosemida para diuresis, vasodilatadores para reducir el trabajo frente al que el miocardio debe bombear, y fármacos inotrópicos tales como doptamina para aumentar la contractilidad cardíaca. Otras medidas que se han usado son torniquetes rotatorios en tres de las cuatro extremidades y reducir el volumen sanguíneo en 500 ml.

Desafortunadamente, no está disponible ningún tratamiento específico o satisfactoriamente eficaz para PE. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de terapias más eficaces y específicas para PE. La presente invención aborda éste y otros problemas.

55 **Breve resumen de la invención**

La presente invención proporciona anticuerpos y composiciones para tratar o prevenir edema pulmonar o lesión pulmonar aguda.

La presente invención proporciona un anticuerpo producido por el hibridoma depositado con el N° de depósito de ATCC PTA-5817. La invención también proporciona un anticuerpo que se une específicamente a una integrina $\alpha v \beta 5$ y es una forma humanizada del anticuerpo producido por el hibridoma depositado con el N° de depósito de ATCC PTA-5817. La invención también proporciona un anticuerpo humanizado que se une específicamente a integrina $\alpha v \beta 5$ y comprende las CDR de cadena pesada y ligera de un anticuerpo producido por el hibridoma depositado con el N° de depósito de ATCC PTA-5817.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 La invención también proporciona dichos anticuerpos para su uso en el tratamiento o prevención de edema pulmonar. La invención proporciona además dichos anticuerpos para su uso en el tratamiento o prevención de lesión pulmonar aguda. Los anticuerpos pueden usarse con un segundo agente terapéutico para tratar edema pulmonar o lesión pulmonar aguda. El segundo agente terapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en: un inhibidor de ruta de TGF β , proteína C activada, un esteroide, GM-CSF, un inhibidor de plaquetas, un agente diurético; un agente broncodilatador, un anticuerpo que se une a integrina $\alpha\text{v}\beta 5$, un anticuerpo que se une a $\beta 5$, un segundo antagonista de integrina $\alpha\text{v}\beta 5$, un antagonista de integrinas $\alpha\text{v}\beta 5$, un agonista de $\beta 2$ o un tensioactivo. Los anticuerpos pueden administrarse por vía intravenosa, vía intranasal o vía intrabronquial. El sujeto tratado es un sujeto mamífero, por ejemplo, un primate tal como un ser humano, un mono o un chimpancé, un canino o un felino.

10 La invención también proporciona uso de los anticuerpos de la invención para la fabricación de un medicamento para tratar edema pulmonar. La invención proporciona además el uso de los anticuerpos para la fabricación de un medicamento para tratar lesión pulmonar aguda.

15 La invención también proporciona kits para tratar o prevenir PE. Los kits comprenden los anticuerpos descritos anteriormente y un segundo agente terapéutico para tratar o prevenir PE. El segundo agente terapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en: un inhibidor de ruta de TGF β , proteína C activada, un esteroide, GM-CSF, un inhibidor de plaquetas, un agente diurético, un agente broncodilatador, un anticuerpo que se une a integrina $\alpha\text{v}\beta 5$, un anticuerpo que se une a $\beta 5$, un segundo antagonista de integrina $\alpha\text{v}\beta 5$, un antagonista de integrina $\alpha\text{v}\beta 6$, un agonista de $\beta 2$, o un agente tensioactivo.

20 La invención también proporciona un hibridoma depositado con el N° de depósito de ATCC PTA-5817.

Estas y otras realizaciones de la invención se ilustran adicionalmente por la descripción detallada a continuación.

25 Breve descripción de los dibujos

30 La Figura 1 ilustra los resultados de experimentos *in vivo* que demuestran que los ratones $\beta 5^{-/-}$ están protegidos de PE inducido por lesión pulmonar.

35 La Figura 2 ilustra los resultados de experimentos *in vivo* que demuestran que un anticuerpo que se une específicamente a $\beta 5$ (es decir, ALULA) reduce la gravedad de PE inducido por reperfusión por isquemia.

40 La Figura 3 ilustra los resultados de experimentos *in vivo* que demuestran que un anticuerpo que se une específicamente a $\beta 5$ (es decir, ALULA) reduce la gravedad de inducido por lesión pulmonar de ventilación de volumen corriente grande.

45 La Figura 4 ilustra los resultados de experimentos *in vitro* que demuestran que un anticuerpo que se une específicamente a $\beta 5$ (es decir, ALULA) bloquea la adhesión de células que expresan integrina $\alpha\text{v}\beta 5$ a placas recubiertas con un intervalo de concentraciones del ligando de integrina $\alpha\text{v}\beta 5$, vitronectina.

50 Descripción detallada de la invención

Introducción

55 La presente invención se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de que el tratamiento de animales con agentes que se unen a integrinas $\alpha\text{v}\beta 5$ reduce los síntomas de PE. Más particularmente, el bloqueo de la unión de ligandos con integrina $\alpha\text{v}\beta 5$ puede reducir la gravedad de PE. Los inventores han demostrado que un anticuerpo que se une a integrina $\alpha\text{v}\beta 5$ bloquea la unión de vitronectina, un ligando de integrina $\alpha\text{v}\beta 5$, con integrina $\alpha\text{v}\beta 5$. Los inventores han demostrado además que la administración de un anticuerpo que se une a integrina $\alpha\text{v}\beta 5$ reduce la gravedad de PE. En consecuencia, la invención se refiere al tratamiento o prevención de PE en un sujeto administrando una cantidad eficaz de este anticuerpo que se une a integrina $\alpha\text{v}\beta 5$.

60 El anticuerpo divulgado se designa "ALULA". La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos. Como se describe en más detalle en los ejemplos posteriormente, ALULA se une a integrina $\alpha\text{v}\beta 5$ y la administración de ALULA a un sujeto mamífero reduce la gravedad de PE en el sujeto.

Definiciones

Un "antagonista de $\alpha\text{v}\beta 5$ " es cualquier agente que compita con un ligando de $\alpha\text{v}\beta 5$ por los sitios de unión a ligando disponibles en integrinas $\alpha\text{v}\beta 5$. Los antagonistas de $\alpha\text{v}\beta 5$ incluyen agentes que se unen específicamente a $\alpha\text{v}\beta 5$, $\beta 5$,

así como un agente que se une a $\alpha\nu\beta 5$ o $\beta 5$ y al menos otra integrina tal como, por ejemplo, $\alpha\nu\beta 3$ o $\alpha\nu\beta 6$.

Una integrina $\alpha\nu\beta 5$ es un miembro de una familia de moléculas de adhesión que comprende heterodímeros α/β asociados de forma no covalente que median, entre otros, en las interacciones célula-célula, interacciones de matriz extracelular-célula, e interacciones célula-patógeno. $\alpha\nu\beta 5$ es la única integrina que contiene la subunidad $\beta 5$. $\alpha\nu\beta 5$ reconoce la secuencia peptídica RGD y se une a vitronectina (véase, por ejemplo, Hynes, Cell 69:11-25 (1992)) y se ha implicado en múltiples trastornos incluyendo apoplejía, infarto de miocardio, cáncer (es decir, angiogénesis) y enfermedad de neovascularización ocular (véase, por ejemplo, Friedlander *et al.*, Science 270(5241): 1500-2 (1995); Friedlander *et al.*, PNAS USA 93(18): 9764-9 (1996); Elicieri *et al.*, J. Cell Biol. 157 (10):149-159 (2002); Heba *et al.*, J. Vasc. Res. 38(3):288-300 (2001); Soeki *et al.*, Cardiology 93(3):168-74 (2000); y Li *et al.*, Am. J. Physiol. 270 (5 Pt 2):H1803-11 (1996)). Tanto $\alpha\nu$ como $\beta 5$ se han secuenciado y caracterizado (véase, por ejemplo, Hynes, 1992 mencionado anteriormente y patente de Estados Unidos N° 5.527.679, respectivamente).

Una "dosis terapéutica" o "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" de un antagonista de integrina $\alpha\nu\beta 5$ es una cantidad del antagonista que evita, alivia, disminuye o reduce la gravedad de síntomas de enfermedades asociadas con integrina $\alpha\nu\beta 5$ incluyendo, por ejemplo, apoplejía, infarto de miocardio, cáncer (es decir, angiogénesis), enfermedad de neovascularización ocular y PE (por ejemplo, acumulación de líquido en los pulmones, aumento de la presión hidrostática capilar pulmonar o apnea) en un paciente.

El término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido codificado por un gen de inmunoglobulina o fragmentos funcionales del mismo que se une específicamente a y reconoce un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon, y mu, así como los múltiples genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Por lo tanto, las expresiones "cadena pesada variable" " V_H " o "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo un Fv, scFv, dsFv o Fab; mientras que las expresiones "cadena ligera variable", " V_L " o "VL" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, incluyendo de un Fv, scFv, dsFv o Fab.

Los ejemplos de fragmentos funcionales de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, moléculas de anticuerpo completo, fragmentos de anticuerpo, tales como Fv, Fv de cadena sencilla (scFv), regiones determinantes de complementariedad (CDR), VL (región variable de cadena ligera), VH (región variable de cadena pesada), Fab, F(ab)₂' y cualquier combinación de estas o cualquier otra parte funcional de un péptido de inmunoglobulina capaz de unirse a antígeno diana (véase, por ejemplo, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 4ª ed. 2001)). Como apreciará un experto en la materia, pueden obtenerse diversos fragmentos de anticuerpo por una diversidad de métodos, por ejemplo, digestión de un anticuerpo intacto con una enzima, tal como pepsina; o síntesis *de novo*. Los fragmentos de anticuerpo se sintetizan con frecuencia *de novo* de forma química o usando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se usa en el presente documento, incluye fragmentos de anticuerpo producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o los sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena sencilla) o los identificados usando bibliotecas de presentación de fagos (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, (1990) Nature 348:552). El término "anticuerpo" también incluye moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Se describen moléculas bivalentes y biespecíficas en, por ejemplo, Kostelny *et al.* (1992) J. Immunol. 148:1547, Pack y Pluckthun (1992) Biochemistry 31:1579, Hollinger *et al.* (1993), PNAS. USA. 90:6444, Gruber *et al.* (1994) J Immunol. : 5.368, Zhu *et al.* (1997) Protein Sci. 6:781, Hu *et al.* (1996) Cancer Res. 56:3055, Adams *et al.* (1993) Cancer Res. 53:4026, y McCartney, *et al.* (1995) Protein Eng. 8:301.

Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo que conserva la reactividad de un anticuerpo no humano siendo a la vez menos inmunogénico en seres humanos. Esto puede conseguirse, por ejemplo, conservando las regiones CDR no humanas y reemplazando las partes restantes del anticuerpo con sus homólogos humanos. Véase, por ejemplo, Morrison *et al.*, PNAS USA, 81:6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31(3):169-217 (1994).

"Fv de cadena sencilla (scFv)" o "anticuerpos de cadena sencilla" se refiere a una proteína donde las regiones V_H y V_L de un anticuerpo scFv comprenden una cadena sencilla que se pliega para crear un sitio de unión a antígeno similar al hallado en anticuerpos de dos cadenas. Se han descrito métodos para preparar anticuerpos scFv en, por ejemplo, Ward *et al.* Exp. Hematol (5):660-4 (1993); y Vaughan *et al.*, Nat. Biotechnol. 14(3):309-14 (1996). Los anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv) incluyen opcionalmente un enlazador peptídico de no más de 50

aminoácidos, generalmente no más de 40 aminoácidos, preferentemente no más de 30 aminoácidos y más preferentemente no más de 20 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el enlazador peptídico es un concatémero de la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6 de dichas secuencias. Sin embargo, debe apreciarse que pueden realizarse algunas sustituciones de aminoácidos dentro del enlazador. Por ejemplo,

- 5 una valina puede sustituirse por una glicina. Se conocen bien en la técnica enlazadores peptídicos adicionales y su uso. Véase, por ejemplo, Huston *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 8:5879 (1988); Bird *et al.*, Science 242:4236 (1988); Glockshuber *et al.*, Biochemistry 29:1362 (1990); patentes de Estados Unidos N° 4.946.778, patente de Estados Unidos N° 5.132.405 y Stemmer *et al.*, Biotechniques 14:256-265 (1993).
- 10 La frase "se une específicamente (o selectivamente) a un anticuerpo" cuando se hace referencia a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en presencia de una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. Por lo tanto, en condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos específicos se unen a una proteína particular (por ejemplo, integrina $\alpha\text{v}\beta 5$, $\beta 5$, o partes de la misma) y no se unen en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión
- 15 específica a un anticuerpo en dichas condiciones puede requerir que se seleccione un anticuerpo por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, pueden seleccionarse anticuerpos inducidos contra una integrina $\alpha\text{v}\beta 5$ o un polipéptido $\beta 5$ para obtener anticuerpos específicamente inmunorreactivos con esa proteína y no con otras proteínas, excepto para variantes polimórficas, por ejemplo, proteínas al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idénticas a una secuencia de interés. Puede usarse una diversidad de formatos de inmunoensayo para
- 20 seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan de forma rutinaria inmunoensayos de ELISA, de fase sólida, transferencias de Western o inmunohistoquímica para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase, Harlow y Lane, Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, NY (1988) para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden usarse para determinar la inmunorreactividad específica. Típicamente,
- 25 una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal de fondo o ruido y más típicamente más de 10 a 100 veces el fondo.

Un agente que "compite específicamente" por la unión reduce la unión específica de un anticuerpo a un polipéptido. Se considera que un primer anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión de un segundo anticuerpo si la unión del

- 30 segundo anticuerpo con el antígeno se reduce en al menos 30%, habitualmente al menos aproximadamente 40%, 50%, 60% o 75% y con frecuencia al menos aproximadamente 90%, en presencia del primer anticuerpo usando cualquiera de los ensayos de unión competitiva conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, mencionado anteriormente).
- 35 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. Como se usa en el presente documento, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier
- 40 longitud, incluyendo proteínas de longitud completa (es decir, antígenos), donde los restos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que actúan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los

- 45 aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupos
- 50 R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. "Miméticos de aminoácidos" se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que actúan de una manera similar a un aminoácido de origen natural.
- 55 Los aminoácidos pueden denominarse en el presente documento por sus símbolos de tres letras habitualmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Los nucleótidos, de modo similar, pueden denominarse por sus códigos de una letra habitualmente aceptados.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan de forma intercambiable. El uso del término "polinucleótido" incluye oligonucleótidos (es decir, polinucleótidos cortos). Este término también se refiere a desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y variantes de origen natural, y también puede referirse a ácidos nucleicos sintéticos y/o de origen no natural (es decir, que comprende análogos de ácidos nucleicos o enlaces o restos de cadena principal modificados), tales como, por ejemplo y sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metil fosfonatos, metil fosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos

- 65 peptidonucleicos (PNA) y similares. A no ser que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca de forma implícita variantes modificadas de forma conservativa de los mismos (por

ejemplo, sustituciones de codones degradados) y secuencias complementarias así como la secuencia indicada de forma explícita. Específicamente, pueden conseguirse sustituciones de codones degradados generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con restos de base mixta y/o de desoxiinosina (véase, por ejemplo, Batzer *et al.*, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985), y Cassol *et al.* (1992); Rossolini *et al.*, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

Inhibición de $\alpha\beta 5$

La presente invención se refiere al tratamiento o prevención de PE o lesión pulmonar aguda inhibiendo la unión de ligandos con integrina $\alpha\beta 5$. Se usan anticuerpos que se unen específicamente a la subunidad $\beta 5$ de la integrina $\alpha\beta 5$. Esta enfermedad es PE (incluyendo, por ejemplo, PE cardiogénico y no cardiogénico). En algunas realizaciones, el tratamiento de PE también trata o previene trastornos corriente abajo tales como, por ejemplo, fibrosis pulmonar.

15 Anticuerpos

De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos que se unen específicamente con integrina $\alpha\beta 5$, y en particular con la subunidad $\beta 5$ de la integrina $\alpha\beta 5$, se usan para tratar o prevenir PE o lesión pulmonar aguda. Los anticuerpos adecuados incluyen anticuerpos humanizados y fragmentos de anticuerpo (es decir, Fv, Fab, (Fab')₂ o scFv).

En la invención, el anticuerpo monoclonal ALULA (Nº de depósito de ATCC PTA-5817, realizado el 13 de febrero de 2004, en la ATCC, 10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209) que se une a la subunidad $\beta 5$ de la integrina $\alpha\beta 5$, se usa para tratar o prevenir PE o lesión pulmonar aguda. Sin quedar ligado por la teoría, se postula que ALULA actúa bloqueando cambios mediados por integrina $\alpha\beta 5$ en la permeabilidad vascular de los pulmones. En algunas realizaciones, se usan ALULA o fragmentos de ALULA humanizados para tratar PE.

Se obtienen anticuerpos monoclonales por diversas técnicas familiares para los expertos en la materia. Brevemente, se immortalizan células del bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado, habitualmente mediante fusión con una célula de mieloma (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol. 6: 511-519 (1976)). Los métodos alternativos de immortalización incluyen transformación con virus de Epstein Barr, oncogenes, o retrovirus, u otros métodos bien conocidos en la técnica. Se exploran colonias que surgen de células immortalizadas sencillas para producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad por el antígeno deseado, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por dichas células puede potenciarse por diversas técnicas, incluyendo inyección en la cavidad peritoneal de un hospedador vertebrado. Como alternativa, se pueden aislar secuencias de ADN que codifiquen un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión del mismo explorando una biblioteca de ADN de linfocitos B humanos de acuerdo con el protocolo general perfilado por Huse *et al.*, Science 246: 1275-1281 (1989).

Se recogen anticuerpos monoclonales y se titulan frente al inmunógeno en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo de fase sólida con el inmunógeno inmovilizado en un soporte sólido. Los anticuerpos monoclonales habitualmente se unirán con una K_d de al menos aproximadamente 0,1 mM, más habitualmente al menos aproximadamente 1 μ M, preferentemente al menos aproximadamente 0,1 μ M o mejor, y más preferentemente, 0,01 μ M o mejor.

En un caso ejemplar, un animal, tal como un conejo o ratón se inmuniza con polipéptido $\alpha\beta 5$, o una construcción de ácido nucleico que codifique dicho polipéptido. Los anticuerpos producidos como resultado de la inmunización pueden aislarse usando métodos convencionales.

Las inmunoglobulinas, incluyendo fragmentos de unión y otros derivados de las mismas, de la presente invención pueden producirse fácilmente por una diversidad de técnicas de ADN recombinante, incluyendo por expresión en células transfectadas (por ejemplo células eucariotas immortalizadas, tales como células de mieloma o hibridoma) o en ratones, ratas, conejos u otros vertebrados capaces de producir anticuerpos por métodos bien conocidos. Pueden obtenerse células fuente adecuadas para las secuencias de ADN y células hospedadoras para expresión y secreción de inmunoglobulina de varias fuentes, tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo (Catalogue of Cell lines and Hybridomas, quinta edición (1985) Rockville, Md.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, es decir, un anticuerpo que conserva la reactividad de un anticuerpo no humano siendo a la vez menos inmunogénico en seres humanos. Esto puede conseguirse, por ejemplo, conservando las regiones CDR no humanas y reemplazando las partes restantes del anticuerpo con sus homólogos humanos. Véase, por ejemplo Morrison *et al.*, PNAS USA, 81: 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44: 65-92 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31(3): 169-217 (1994). Se conocen bien en el campo técnicas para humanización de anticuerpos y se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 4.816.567; 5.530.101; 5.859.205; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.777.085; 6.180.370; 6.210.671; y 6.329.511; documento WO 87/02671; Solicitud de patente EP 0173494; Jones *et al.* (1986) Nature 321: 522; y Verhoeyen *et al.* (1988)

Science 239: 1534. Se describen adicionalmente anticuerpos humanizados en, por ejemplo, Winter y Milstein (1991) Nature 349: 293. Por ejemplo, pueden producirse polinucleótidos que comprenden una primera secuencia que codifica regiones marco conservadas de inmunoglobulina humanizada y un segundo conjunto de secuencias que codifican las regiones determinantes de complementariedad de inmunoglobulina deseadas de forma sintética o combinando segmentos de ADNc y ADN genómico apropiados. Pueden aislarse secuencias de ADN de región constante humana de acuerdo con procedimientos bien conocidos de una diversidad de células humanas. Las CDR para producir las inmunoglobulinas de la presente invención se derivarán de forma similar de anticuerpos ALULA monoclonales.

En algunos casos, la transferencia de una CDR a un marco humano conduce a una pérdida de especificidad por el anticuerpo humanizado. En estos casos, puede introducirse retromutación en las regiones marco conservadas de la parte humana del anticuerpo. Se conocen bien en la técnica métodos para realizar retromutaciones y se describen en, por ejemplo, Co *et al.*, PNAS USA 88; 2269-2273 (1991) y documento WO 90/07861.

En algunas realizaciones, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpo tales como Fab, F(ab')₂, Fv o scFv. Los fragmentos de anticuerpo pueden generarse usando cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo digestión química (por ejemplo, papaína o pepsina) y métodos recombinantes. Los expertos en la materia conocen métodos para aislar y preparar ácidos nucleicos recombinantes (véase, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning. A Laboratory Manual (2^a ed. 1989); Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (1995)). Los anticuerpos pueden expresarse en una diversidad de células hospedadoras, incluyendo *E. coli*, otros huéspedes bacterianos, levadura y diversas células eucariotas superiores tales como las líneas celulares COS, CHO y HeLa y líneas celulares de mieloma.

Tratamiento terapéutico

Como se ha analizado anteriormente, la invención también proporciona composiciones que comprenden los anticuerpos de la invención. Las composiciones de la invención pueden proporcionarse para tratar o prevenir PE o lesión pulmonar aguda.

En una realización, las composiciones de la invención (composiciones que comprenden ALULA, ALULA humanizado o fragmentos de ALULA) pueden proporcionarse para tratar o prevenir PE en sujetos con PE o en riesgo de desarrollar PE. Por ejemplo, un sujeto que haya tenido exposición a un inhalante tóxico probablemente se trataría después de dicha exposición, mientras que un paciente en riesgo de PE puede tratarse de forma profiláctica y/o terapéutica. Los ejemplos de pacientes con riesgo de PE incluyen pacientes con aspiración aguda, pacientes que muestren síntomas de sepsis bacteriana, pacientes cuyos cultivos sanguíneos sean positivos para bacterias gram positivas o gram negativas, pacientes con pancreatitis o pacientes en choque hemorrágico.

Las composiciones de la invención pueden administrarse de forma regular (por ejemplo, diariamente) durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 días o 1-3 semanas o más).

Las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto mamífero para bloquear la unión de $\alpha\beta 5$ usando cualquier vía conocida de la técnica, incluyendo por ejemplo, mediante inyección (por ejemplo intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o intradérmica), inhalación, aplicación transdérmica, administración rectal o administración oral.

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administre, así como por el método particular usado para administrar la composición. En consecuencia, hay una amplia diversidad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., 1989).

Las composiciones de la invención, solas o en combinación con otros componentes adecuados, pueden realizarse en formulaciones de aerosol (es decir, pueden "nebulizarse") para administrarse mediante inhalación. Las formulaciones de aerosol pueden situarse en propulsores aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

Las formulaciones adecuadas para administración incluyen soluciones acuosas y no acuosas, soluciones estériles isotónicas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. En la práctica de la presente invención, pueden administrarse composiciones, por ejemplo, por vía oral, vía nasal, vía tópica, vía intravenosa, vía intraperitoneal o vía intratecal. Las formulaciones de compuestos pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, tales como ampollas y frascos. Pueden prepararse soluciones y suspensiones a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito. Los moduladores también pueden administrarse como parte de un fármaco o alimento preparado.

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden comprender: (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del ácido nucleico envasado o suspendido en diluyentes, tales como agua, solución salina o PEG 400; (b) cápsulas, sobrecitos o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo, como líquidos, sólidos, gránulos o gelatina; (c) suspensiones en un líquido apropiado; y (d) emulsiones adecuadas. Las formas de comprimido pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos cálcicos, almidón de maíz, almidón de patata, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, cargas, aglutinantes, diluyentes, agentes tamponantes, agentes humectantes, conservantes, agentes saporíferos, colorantes, agentes disgregantes y vehículos farmacéuticamente compatibles. Las formas de gragea pueden comprender el principio activo en un saporífero, por ejemplo, sacarosa, así como pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y emulsiones de goma arábiga, geles y similares que contienen, además del principio activo, vehículos conocidos en la técnica.

La dosis administrada a un paciente en el contexto de la presente invención debería ser suficiente para efectuar una respuesta beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo, por ejemplo, una reducción de la presión hidrostática capilar pulmonar, una reducción del fluido en los pulmones, una reducción de la tasa de acumulación de fluido en los pulmones, o una combinación de los mismos. El nivel de dosis óptimo para cualquier paciente dependerá de una diversidad de factores incluyendo la eficacia del modulador específico empleado, la edad, peso corporal, actividad física y dieta del paciente, en una posible combinación con otros fármacos, y de la gravedad del PE. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, naturaleza y alcance de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la administración de un compuesto o vector particular en un sujeto particular.

Al determinar la cantidad eficaz de anticuerpos de la invención para administrar un médico puede evaluar los niveles en plasma en circulación de los anticuerpos. En general, la dosis equivalente es de aproximadamente 1 ng/kg a 10 mg/kg para un sujeto típico.

Para la administración, los anticuerpos pueden administrarse a una tasa determinada por la DL₅₀, y los efectos secundarios a diversas concentraciones, según se aplique a la masa y salud general del sujeto. La administración puede conseguirse mediante dosis individuales o divididas.

Terapia de combinación

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se administran junto con un segundo agente terapéutico para tratar o prevenir lesión pulmonar aguda y/o PE. Por ejemplo, puede administrarse ALULA, ALULA humanizada o fragmentos de ALULA junto con cualquiera de los tratamientos convencionales para PE incluyendo, por ejemplo, agentes diuréticos, agentes broncodilatadores, narcóticos, oxígeno y aplicación de torniquete selectivo. Además, los anticuerpos de la invención pueden administrarse junto con agentes que se dirigen a rutas metabólicas que están implicadas en lesión pulmonar aguda y/o PE. Por ejemplo, los anticuerpos pueden administrarse junto con inhibidores de la ruta de TGF β , proteína C activada, esteroides, GM-CSF, inhibidores de plaquetas, agonistas de β -2, tensioactivos, anticuerpos que se unen específicamente a integrina α v β 5 o β 5, un segundo antagonista de integrina α v β 5, anticuerpos que se unen específicamente a una integrina α v β 6, antagonistas de receptor de trombina, agentes anti-trombina, inhibidores de rho quinasa y ácidos nucleicos que inhiben la expresión de integrina α v β 5 incluyendo, por ejemplo, los oligonucleótidos anti-sentido y ARNip descritos en el presente documento. Los inhibidores de ruta de TGF β adecuados incluyen, por ejemplo, anticuerpos de TGF- β (incluyendo los que se bloquean específicamente TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 o cualquier combinación de los mismos) como se describe, por ejemplo, en Ling *et al.*, J. Amer. Soc. Nephrol. 14: 377-388 (2003), McCormick *et al.*, J. Immunol. 163: 5693-5699 (1999), y Cordeiro, Curr. Opin. Mol. Ther. 5(2): 199-203 (2003); inhibidores de receptor TGF β de tipo II o inhibidores de quinasa receptora de TGF- β de tipo I como se describe en, por ejemplo, DaCosta Bayfield, Mol. Pharmacol. 65(3): 744-52 (2004), Laping, Curr. Opin. Pharmacol. 3 (2): 204-8 (2003), Laping, Mol. Pharmacol. 62(1): 58-64 (2002); receptor de TGF β soluble de tipo II como se describe en, por ejemplo, Pittet, J. Clin. Invest. 107: 1537-1544 (2001); Wang *et al.*, Exp Lung Res. 28(6): 405-17 (2002) y Wang, Thorax 54(9): 805-12 (1999); péptidos asociados a latencias solubles como se describe en, por ejemplo, Zhang, J. Invest. Dermatol. 121(4): 713-9 (2003); inhibidores de trombospondina I como se describe en, por ejemplo, Crawford *et al.*, Cell 93: 1159-1170 (1998), Riberi *et al.*, J. Biol. Chem. 274: 13586-13593 (1999), y Schultz-Cherry *et al.*, J. Biol. Chem. 269: 26775-26782 (1994). Los agonistas de β -2 adecuados incluyen, por ejemplo, albuterol, bitolterol, formoterol, isoproterenol, levalbuterol, metaproterenol, pirbuterol, salmeterol y terbutalina. Los tensioactivos adecuados incluyen, por ejemplo, exosurf, infasurf, KL-4, pumactant, survanta, venticute y tensoactivo TA, como se describe en Tausch *et al.*, Acta Pharmacol Sin 23 Suplemento: 11-15 (2002). Los agentes anti-trombina adecuados incluyen, por ejemplo, hirudina, Hirulog (Biogen), argatroban (Texas Biotechnology) y efegatran (Lilly) y compuestos descritos en la patente de Estados Unidos N° 6.518.244. Se describen antagonistas de receptor de trombina adecuados en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 6.544.982; 6.515.023; 6.403.612; 6.399.581; y 5.446.131. Los inhibidores de rho quinasa adecuados incluyen, por ejemplo, Y-27632 como se describe en, por ejemplo, Tasaka *et al.*, Am J Respir Cell Mol Biol. 18 Mar 2005; [Epub antes de impresión], fasudil como se describe en, por ejemplo, Nishikimi *et al.*, J Hypertens. 22(9): 1787-96 (2004), 1-(5-isoquinolinsulfonil)-homopiperazina (HA-1077), (S)-(+)-2-metil-1-[(4-metil-5-isoquinolina)sulfonil]-homopiperazina (H-1152P) como se describe en, por ejemplo, Sasaki *et al.*, Pharmacol Ther.

93(2-3): 225-32 (2002), e inhibidores de rho quinasa adicionales como se describe en, por ejemplo, patentes de Estados Unidos N° 6.451.825 y 6.218.410 y la Publicación de patentes de Estados Unidos N° 20050014783 y 20030134775.

5 Además, los anticuerpos pueden administrarse en combinación con un adenovirus que expresa ATPasa como se describe en la Publicación de patente de Estados Unidos N° 20020192186; con un receptor adrenérgico de $\beta 2$ como se describe en la Publicación de patente de Estados Unidos N° 20020004042; con antagonistas de VEGF β como se describe en la patente de Estados Unidos N° 6.284.751; con inhibidores de peroxidación de lípidos como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.231.114; y con moléculas pequeñas inhibidoras de integrinas $\alpha\nu\beta 6$, $\alpha\nu\beta 5$ y $\alpha\nu\beta 3$ como se describe en, por ejemplo, las Solicitudes de patente publicadas de Estados Unidos N° 2000/40019206, 2004/0019037, 2004/0019035, 2004/0018192, 2004/0010023, 2003/0181440, 2003/0171271, 2003/0139398, 2002/0037889, 2002/0077321, 2002/0072500, patente de Estados Unidos N° 6.683.051 y Goodman *et al.*, J. Med Chem. 45(5): 1045-51 (2002).

15 El ALULA, ALULA humanizado o fragmentos de ALULA y el segundo agente terapéutico pueden administrarse de forma simultánea o secuencial. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse en primer lugar, seguido del segundo agente terapéutico. Como alternativa, el segundo agente terapéutico puede administrarse en primer lugar, seguido del anticuerpo. En algunos casos, el anticuerpo y el segundo agente terapéutico se administran en la misma formulación. En otros casos el anticuerpo y el segundo agente terapéutico se administran en formulaciones diferentes. Cuando el anticuerpo y el segundo agente terapéutico se administran en formulaciones diferentes, su administración puede ser simultánea o secuencial.

25 Para administración, el anticuerpo y el segundo agente terapéutico pueden administrarse a una tasa determinada por la DL₅₀ combinada del anticuerpo y el segundo agente terapéutico, y los efectos secundarios del anticuerpo y el segundo agente terapéutico a diversas concentraciones, como se aplica a la masa y salud global del sujeto. En algunos casos, el anticuerpo y segundo agente terapéutico se administran cada uno a una dosis subterapéutica o una dosis terapéutica.

Kits

30 La presente invención también proporciona kits para tratar o prevenir PE. Los kits comprenden ALULA, ALULA humanizada o fragmentos de ALULA y un segundo agente terapéutico para tratamiento de PE. Los segundos agentes terapéuticos adecuados incluyen, por ejemplo, un inhibidor de ruta de TGF β , proteína C activada, un esteroide, GM-SCF, un inhibidor de plaquetas, un agente diurético, un agente broncodilatador, anticuerpos que se unen específicamente a integrina $\alpha\nu\beta 5$ o $\beta 5$, un segundo antagonista de integrina $\alpha\nu\beta 5$, anticuerpos que se unen específicamente a una integrina $\alpha\nu\beta 6$, antagonistas de integrina $\alpha\nu\beta 6$, agonistas de β -2 y tensioactivos. Los kits también pueden comprender instrucciones escritas (por ejemplo, un manual) para usar el kit.

Ejemplos

40 Ejemplo 1: Materiales y métodos

Modelo de Lesión Pulmonar de Reperfusión por Isquemia de Pulmón Único de Roedor de PE: Se somete a ratones o ratas a trasplante de pulmón, derivación cardiopulmonar, tromboendoarterectomía pulmonar o choque grave. A continuación se inducen isquemia y reperfusión durante 30 minutos y 3 horas, respectivamente. Para inducir isquemia, se realiza una toracotomía izquierda bloqueando el hilio izquierdo (por ejemplo, con cinta umbilical) durante 30 minutos. Para inducir la reperfusión, los pulmones se vuelven a hinchar con un volumen corriente de 12 ml/kg de aire y después se reanuda la ventilación normal. Los animales se sacrifican después de 3 horas y se evalúa la permeabilidad de cada pulmón, por ejemplo, midiendo la extravasación de albúmina marcada al pulmón, expresada como equivalentes pulmonares extravasculares (EPEV).

Modelo de Lesión Pulmonar Inducida por Ventilador de Roedores de PE: Los ratones o ratas se ventilan con volumen corriente normal (6 ml por kg) o alto (20 ml por kg). Se inyectan a los animales albúminas marcadas con ¹²⁵I después de 4 horas y después los pulmones se recogen y se determina el EPEV.

55 Medición de Equivalentes de Plasma Extravascular (EPEV): Se midieron los EPEV como se describe en, por ejemplo, Frank *et al.*, J. Biol. Chem., 278 (45): 43939-43950 (2003). Brevemente, se inyecta un indicador vascular (por ejemplo, albúmina ¹²⁵I) por vía intraperitoneal en ratas dos horas antes de la recogida de pulmón. Se recoge sangre y se retiran los pulmones. Se mide la radiactividad en plasma y pulmón. Se mide la concentración de hemoglobina en el homogeneizado de pulmón y en la sangre. La radiactividad intravascular de pulmón se calcula multiplicando el recuento de radiactividad en plasma por el volumen de sangre en el pulmón.

65 Anticuerpos: Se generó ALULA como se describe posteriormente. W6/32, un anticuerpo monoclonal murino W6/32 que se une específicamente a HLA A, B y C se obtuvo de ATCC. CD-1 WT, un anticuerpo monoclonal que se une a CD-1 se obtuvo de ATCC.

Ejemplo 2: Generación de ALULA, un anticuerpo monoclonal murino que se une específicamente a integrina $\alpha v\beta 5$

Se inmunizaron ratones knockout para $\alpha v\beta 5$ con células que expresaban un polipéptido que comprendía una secuencia de integrina $\alpha v\beta 5$. Se identificaron anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a integrina $\alpha v\beta 5$ usando métodos conocidos en la técnica. Más particularmente, se identificó ALULA que se une específicamente a $\beta 5$. Se depositó ALULA en la ATCC el 13 de febrero de 2004 y tiene el siguiente N° de Referencia: PTA-5817.

Ejemplo 3: Los ratones $\beta 5^{-/-}$ no desarrollan PE asociado a lesión pulmonar

Los ratones $\beta 5^{-/-}$ y ratones naturales se ventilaron como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior para inducir PE asociado con lesión pulmonar y se determinó EPEV. A diferencia de los ratones naturales, los ratones $\beta 5^{-/-}$ no desarrollaron PE después de ventilación. Estos resultados indican que $\alpha v\beta 5$ está implicada en PE. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 4: Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a $\beta 5$ reduce la gravedad del edema pulmonar asociado con reperfusión por isquemia

Para determinar el papel de $\beta 5$ en PE asociado con reperfusión por isquemia, se proporcionaron a las ratas los siguientes tratamientos y se tomaron mediciones de EPEV:

1. Sin tratamiento.
2. Inyección intraperitoneal (i.p.) de 4 μg por gramo de W6/32.
3. I.p. 4 μg por gramo (i.p.) de ALULA.
4. Se indujo reperfusión por isquemia como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior.
5. Se indujo reperfusión por isquemia y se inyectaron 4 μg por gramo de W6/32 por vía intraperitoneal.
6. Se indujo reperfusión por isquemia y se inyectaron 4 μg por gramo de ALULA por vía intraperitoneal.

En estos experimentos, los anticuerpos se inyectaron antes de la inducción de reperfusión por isquemia.

Las ratas que recibieron tratamiento con ALULA mostraron EPEV reducido (es decir, permeabilidad de células pulmonares reducidas) en comparación con ratas de control, lo que indica que un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a $\beta 5$ puede reducir la gravedad de PE.

Los resultados se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 5: Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a $\beta 5$ reduce la gravedad del edema pulmonar asociado con lesión pulmonar

Para determinar el papel de $\beta 5$ en PE asociado con lesión pulmonar, se proporcionaron a los ratones los siguientes tratamientos y se tomaron mediciones de EPEV:

1. Volumen corriente normal e inyección i.p. de 4 μg por gramo de CD-1 WT.
2. Volumen corriente alto e inyección i.p. de 4 μg por gramo de CD-1 WT.
3. Volumen corriente normal e inyección i.p. de 4 μg por gramo de ALULA.
4. Volumen corriente alto e inyección i.p. de 4 μg por gramo de ALULA.

En estos experimentos, los anticuerpos se inyectaron antes de tratamientos de volumen corriente.

Los ratones que recibieron tratamiento con ALULA mostraron EPEV reducido en comparación con ratones de control, lo que indica que un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a $\beta 5$ puede reducir la gravedad de PE.

Por lo tanto, ALULA es el primer anticuerpo monoclonal específico para $\alpha v\beta 5$ que se ha mostrado que tiene actividad de bloqueo *in vivo* en mamíferos completos y es el primero que se ha mostrado que bloquea la permeabilidad vascular aumentada y el desarrollo de inundación alveolar en modelos de lesión pulmonar aguda (es decir, PE)

Los resultados se muestran en la Figura 3.

Ejemplo 6: EL anticuerpo ALULA bloquea la unión del ligando de integrina $\alpha v\beta 5$ vitronectina con células que expresan integrina $\alpha v\beta 5$

Se ponen en contacto células SW-480 que expresan integrina $\alpha v \beta 5$ con 0 $\mu\text{g/ml}$, 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,3 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$ de vitronectina en presencia de 0 $\mu\text{g/ml}$, 0,3 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$ de ALULA. Se usa un anticuerpo monoclonal (es decir, Y9A2) específico para integrina $\alpha 9 \beta 1$ como un control negativo. ALULA bloquea la unión del ligando de integrina $\alpha v \beta 5$, vitronectina, a las células. Los resultados se muestran en la Figura 4.

5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo producido por el hibridoma depositado con el N° de depósito de ATCC PTA-5817.
- 5 2. Un anticuerpo que se une específicamente a integrina $\alpha v\beta 5$, donde el anticuerpo es una forma humanizada del anticuerpo producido por el hibridoma depositado con el N° de depósito de ATCC PTA-5817.
- 10 3. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente a integrina $\alpha v\beta 5$, que comprende las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada y ligera de un anticuerpo producido por el hibridoma depositado con el N° de depósito de ATCC PTA-5817.
4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un scFv, un Fab y un (Fab')₂.
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento o prevención de edema pulmonar.
7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento o prevención de lesión pulmonar aguda.
- 25 8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso de la reivindicación 6, donde el uso comprende además administrar un segundo agente terapéutico para tratar o prevenir edema pulmonar.
- 30 9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso de la reivindicación 7, donde el uso comprende además administrar un segundo agente terapéutico para tratar o prevenir lesión pulmonar aguda.
- 35 10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso de la reivindicación 8 o 9, donde el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de ruta de TGF β , Proteína C activada, un esteroide, GM-SCF, un inhibidor de plaquetas, un agente diurético, un agente broncodilatador, un anticuerpo que se une a integrina $\alpha v\beta 5$, un anticuerpo que se une a $\beta 5$, un segundo antagonista de integrina $\alpha v\beta 5$, un antagonista de integrina $\alpha v\beta 6$, un agonista de β -2 y un tensioactivo.
- 40 11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, que se administra por vía intravenosa, por vía intranasal o por vía intrabronquial.
12. Uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la fabricación de un medicamento para tratar edema pulmonar.
13. Uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la fabricación de un medicamento para tratar lesión pulmonar aguda.
- 45 14. Un kit para tratar o prevenir edema pulmonar, que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un segundo agente terapéutico para tratar o prevenir edema pulmonar.
- 50 15. El kit de la reivindicación 14, donde el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la ruta de TGF β , Proteína C activada, un esteroide, GM-SCF, un inhibidor de plaquetas, un agente diurético, un agente broncodilatador, un anticuerpo que se une a integrina $\alpha v\beta 5$, un anticuerpo que se une a $\beta 5$, un segundo antagonista de integrina $\alpha v\beta 5$, un antagonista de integrina $\alpha v\beta 6$, un agonista de β -2 y un tensioactivo.
16. Un hibridoma depositado con el N° de Depósito de ATCC PTA-5817.

FIG. 1

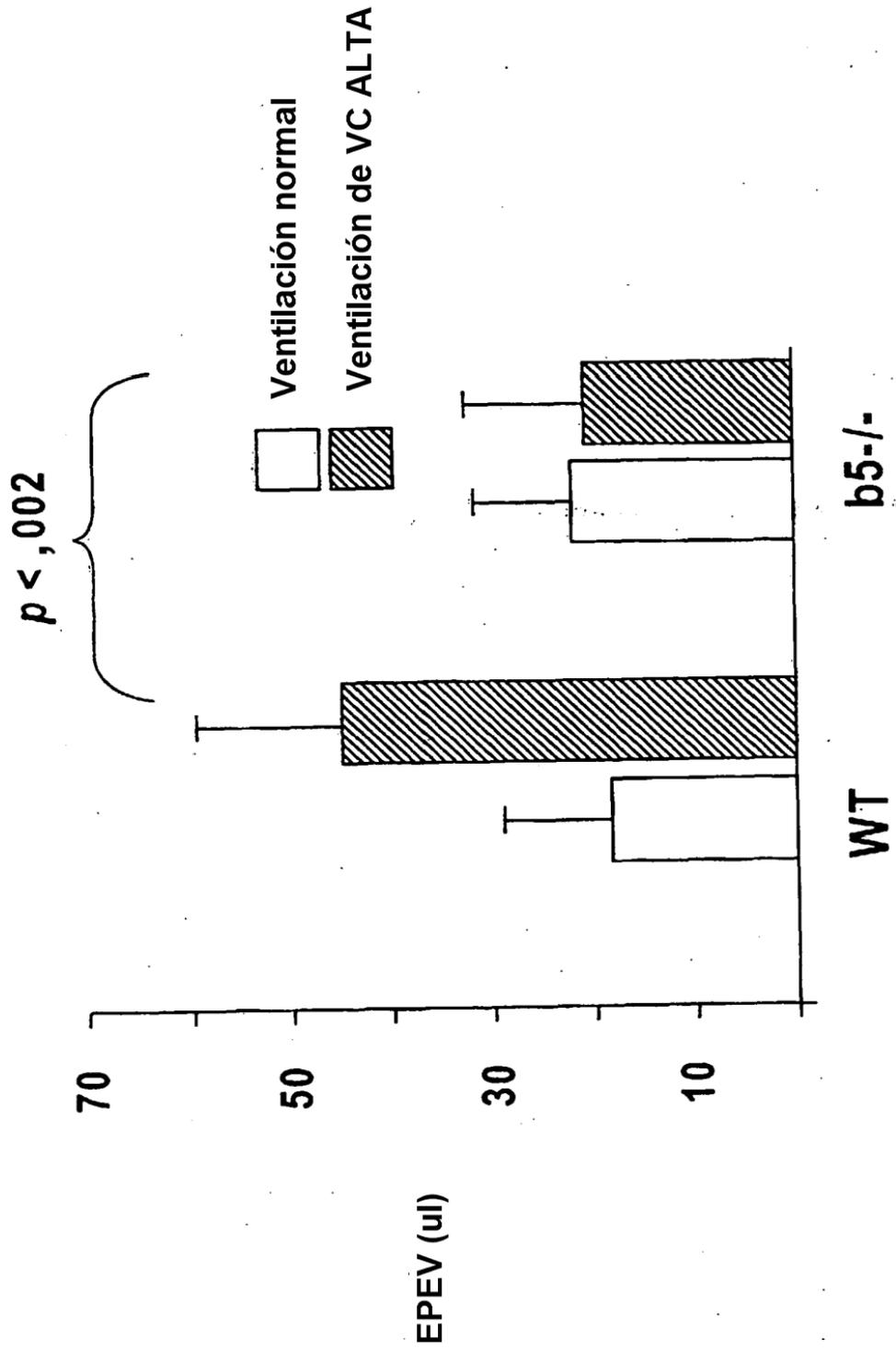


FIG. 2

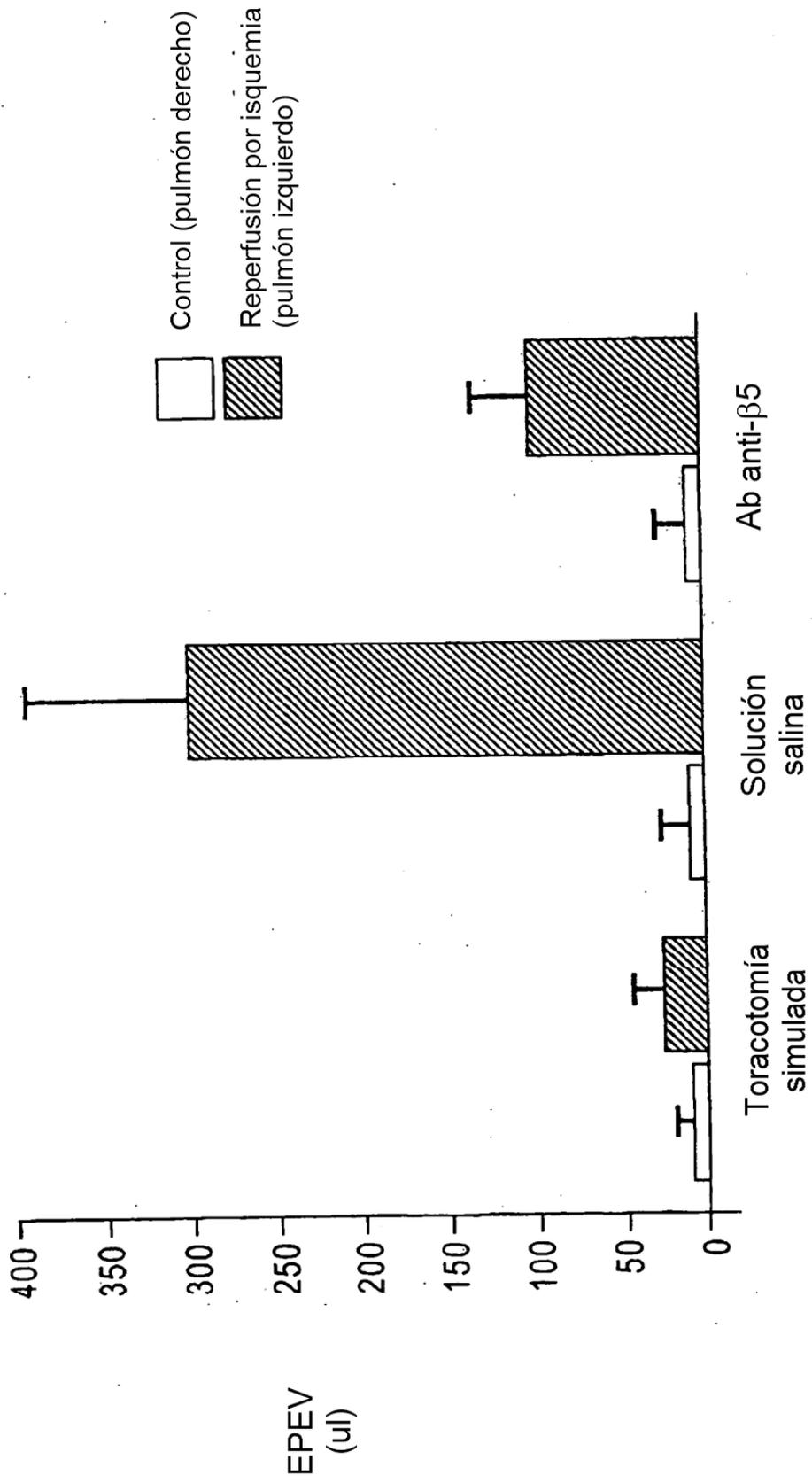


FIG. 3

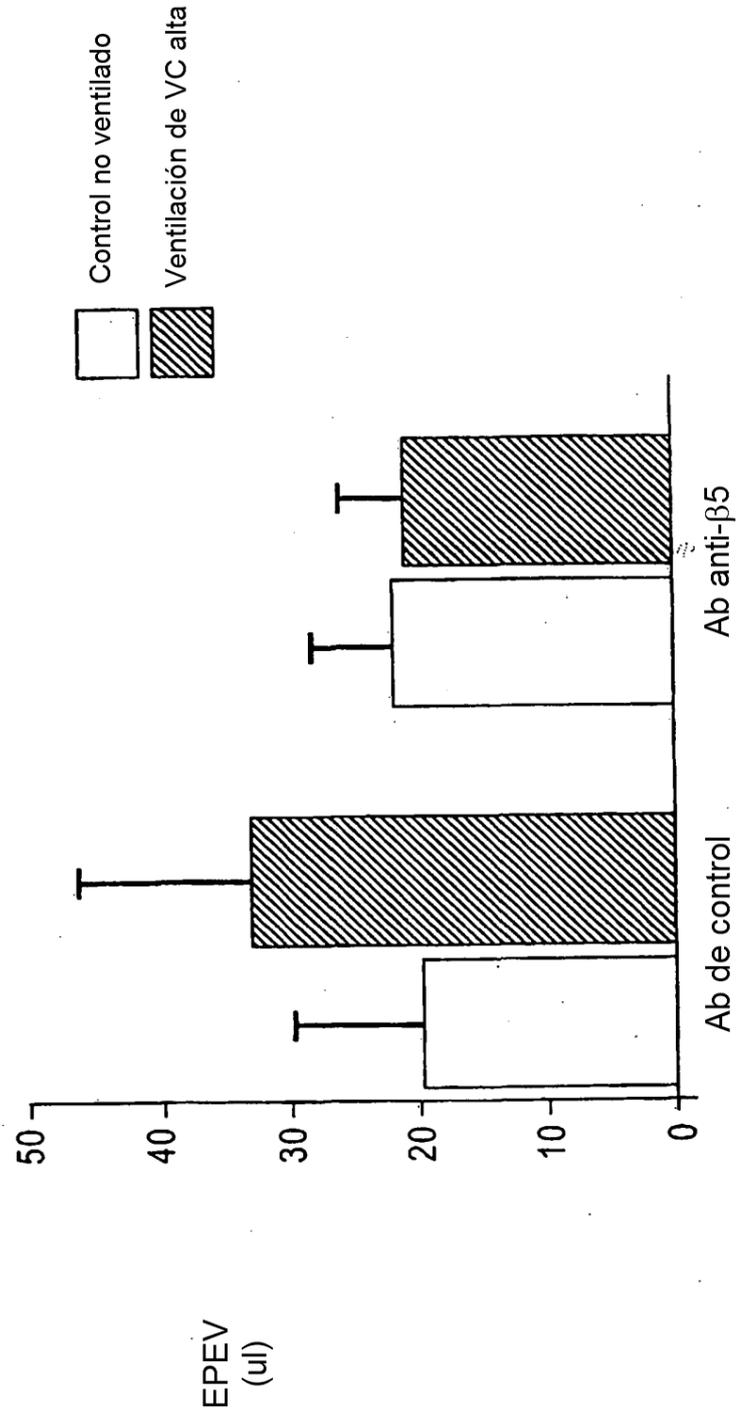


FIG. 4

