

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 112**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2005 E 05722948 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 1713503**

54 Título: **Inhibición del factor B, de la vía alternativa del complemento y métodos relacionados**

30 Prioridad:

10.02.2004 US 543594 P
13.05.2004 WO PCT/US2004/015040
14.12.2004 US 636239 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.11.2013

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF COLORADO, A BODY CORPORATE (33.3%)
1800 Grant Street, 8th Floor
Denver, CO 80203, US;
NATIONAL JEWISH HEALTH (33.3%) y
MUSC FOUNDATION FOR RESEARCH DEVELOPMENT (33.3%)

72 Inventor/es:

HOLERS, VERNON MICHAEL;
THURMAN, JOSHUA M.;
TAUBE, CHRISTIAN;
GELFAND, ERWIN W. y
GILKESON, GARY STEVEN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 432 112 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

Inhibición del factor B, de la vía alternativa del complemento y métodos relacionados

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere en general a nuevos inhibidores de la vía alternativa del complemento y, en particular, a nuevos anticuerpos anti-factor B. La invención también se refiere en general al uso de tales inhibidores para reducir o prevenir la hiperreactividad de las vías respiratorias y la inflamación de las vías respiratorias y tratar de ese modo enfermedades en las que tales afecciones tienen una función.

Antecedentes de la Invención

10 La activación del complemento se produce principalmente a través de tres vías: la denominada vía clásica, la vía de las lectinas y la vía alternativa. Las principales proteínas implicadas en la activación de la vía alternativa son el factor B (fB) y el factor D (fD). Estas proteínas actúan conjuntamente para iniciar y/o para amplificar la activación de C3, lo que conduce entonces a la iniciación de una serie de eventos inflamatorios. Una tercera proteína, properdina, estabiliza el complejo de C3 y el factor B, pero no es absolutamente necesaria para que funcione la vía alternativa. El factor B también ayuda a solubilizar complejos inmunes, se ha notificado que actúa como un factor de crecimiento de los linfocitos B y puede activar los monocitos (Takahashi, 1980; Hall, 1982; Peters, 1988). Se han generado ratones carentes del factor B (ratones *fB*^{-/-}) y la respuesta del anticuerpo IgG1 frente a antígenos dependientes de linfocitos T y la sensibilidad al choque endotóxico parecen normales en estos ratones (Matsumoto, 1997).

20 La vía alternativa del complemento se inicia generalmente a través de bacterias, parásitos, virus u hongos, aunque los Acs IgA y ciertas cadenas L de la Ig también se ha descrito que activan esta vía. La activación de la vía alternativa se inicia cuando el factor B circulante se une a C3 activado (ya sea C3b o C3H₂O). Este complejo se escinde a continuación, a través de factor D circulante, para proporcionar un fragmento enzimáticamente activo, C3Bb. C3Bb escinde C3 que genera C3b, el cual dirige la inflamación y también amplifica adicionalmente el proceso de activación, generando un bucle de retroalimentación positiva. Se requieren ambos componentes (el factor B y el factor D) para permitir la activación de la vía alternativa.

25 Estudios recientes han mostrado que la vía alternativa del complemento desempeña un papel importante en la patogénesis de varios modelos animales de enfermedad. La activación del complemento dentro del riñón después de I/R está mediada casi exclusivamente por la vía alternativa (Thurman) y la vía alternativa tiene un papel decisivo en el desarrollo de la artritis. Tal vez lo más sorprendente es que se ha mostrado que ratones carentes de la vía alternativa están protegidos contra la nefritis en el modelo MRL/lpr de nefritis lúpica (Watanabe) y contra la pérdida fetal mediada por antifosfolípidos (Girardi), modelos en los que se había asumido tradicionalmente que estaban mediados por la vía clásica del complemento.

35 Ya se han desarrollado varios inhibidores para inhibir el sistema del complemento en diversas fases de activación (Holers), aunque no se han descrito ampliamente inhibidores específicos de la vía alternativa antes de la presente invención. El documento de publicación PCT WO 01/47963, publicado el 4 de julio de 2001, describe polipéptidos procedentes de sanguijuelas ectoparásitas que inhiben la vía alternativa de activación del complemento *in vitro* y que no tienen sustancialmente ningún efecto sobre la activación del complemento por la ruta clásica. Se mostró que estos péptidos se unen al factor D; sin embargo, no se mostró ninguna aplicación *in vivo* de estos polipéptidos. Un reactivo con la capacidad de inhibir específicamente la vía alternativa *in vivo* tendría teóricamente varias ventajas, en comparación con los inhibidores existentes de la cascada del complemento. En primer lugar, para modelos tales como la I/R renal y la pérdida fetal mediada y antifosfolípidos, que están mediadas principalmente por la vía alternativa, un inhibidor de este tipo debería ser igualmente eficaz como inhibidor universal del complemento, sin embargo, debería tener menos efectos secundarios inmunosupresores. Aunque solo se ha descrito un paciente humano con carencia congénita del factor B (Densen), estudios de genes dirigidos a ratones carentes del factor B (*fB*^{-/-}) aún no han demostrado un efecto inmunomodulador de este factor (Densen; Matsumoto). Los pacientes con carencias congénitas de los componentes de la vía clásica, por el contrario, parecen tener un mayor riesgo de infección (más comúnmente estafilococos y estreptococos). La inhibición de los componentes de la vía clásica o C3 (común a todas las vías del complemento) también podría estar asociada con la autoinmunidad (Figuroa), quizás explicando por qué la carencia de factor B protege a los ratones MRL/lpr de desarrollar glomerulonefritis, pero la carencia de C3 no lo hace (Watanabe). Por lo tanto, la inhibición de la vía alternativa se puede tolerar mejor y en algunos casos de forma más eficaz que la inhibición de la vía clásica del complemento.

55 El asma alérgica es un síndrome común asociado con la inflamación y la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) (Busse). En los pacientes con asma alérgica, la exposición a un alérgeno inhalado conduce a un incremento de la AHR y la inflamación de las vías respiratorias y unos estudios han mostrado niveles incrementados de fragmentos biológicamente activos obtenidos a partir de la familia de proteínas C3, C4 y C5 del complemento, especialmente C3a (Humbles) y C5a (Krug) en el fluido del lavado broncoalveolar (BAL). Esto sugiere que en estos pacientes, después de la exposición al alérgeno, la activación de la vía del complemento a través de un mecanismo inducido por alérgeno se produce en el pulmón. Los modelos animales han aportado una mayor comprensión de la función del complemento en el desarrollo de una enfermedad alérgica de las vías respiratorias. Animales carentes

de receptores de C3 o C3a parecen estar protegidos contra el desarrollo de una enfermedad de las vías respiratorias inducida por alérgeno (Humbles, Drouin; Bautsch; Walters).

Se han propuesto diversas posibilidades diferentes para inducir la activación del complemento después de una exposición a alérgeno. Por ejemplo, los complejos inmunes de alérgeno-IgG podrían desencadenar la activación de la vía clásica y ciertos antígenos pueden activar directamente C3 a través de la vía alternativa (Kohl). Además, la triptasa neutra liberada por los mastocitos o los macrófagos pulmonares puede escindir de forma directa (proteolítica) C3 o C5 (Schwartz; Mulligan). Las tres vías de activación del complemento (clásica, alternativa y lectina) convergen en el componente central del complemento C3. Por lo tanto, la inhibición de la activación de C3 impide la escisión en fragmentos C3 activos, pero también reduce en gran medida la activación posterior de C5 y la liberación de fragmentos activados obtenidos a partir de C5 (Sahu). Estudios recientes han mostrado que la inhibición de la activación del complemento durante la exposición de animales sensibilizados a alérgenos mediante el uso de inhibidores de la convertasa C3, y por lo tanto la inhibición de las tres vías de activación, reduce la respuesta tardía de las vías respiratorias (Abe), así como el desarrollo de AHR y la inflamación de las vías respiratorias (Taube). El documento de publicación PCT nº WO 2004/022096, publicado el 18 de marzo de 2004, describe la inhibición de la vía del complemento, preferentemente a través de los componentes terminales del complemento de C5-C9 que participan en todas las vías y, lo más preferiblemente, a través de la inhibición de C5a.

Actualmente, la terapia para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que implican AHR, tales como el asma de moderada a grave y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, implica predominantemente el uso de glucocorticosteroides y otros agentes antiinflamatorios. Estos agentes, sin embargo, tienen el peligro de efectos secundarios graves, incluyendo, pero no limitados a, aumento de la susceptibilidad a una infección, toxicidad hepática, enfermedad pulmonar inducida por fármacos y supresión de la médula ósea. Por lo tanto, tales fármacos están limitados en su uso clínico para el tratamiento de enfermedades pulmonares asociadas con la hiperreactividad de las vías respiratorias. El uso de reactivos antiinflamatorios y de alivio sintomático es un problema grave debido a sus efectos secundarios o a su deficiencia para atacar la causa subyacente de una respuesta inflamatoria. Existe una necesidad constante de reactivos menos perjudiciales y más eficaces para el tratamiento de la inflamación. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de procedimientos que utilizan reactivos con perfiles de efectos secundarios menores, menos toxicidad y más especificidad para la causa subyacente de las enfermedades alérgicas de las vías respiratorias, tales como el asma y la afección conocida como AHR.

Compendio de la invención

Una realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o a un fragmento del mismo que se une a antígeno que se une selectivamente al factor B procedente al menos de ser humano o ratón, dentro del tercer dominio de la repetición corta de consenso (SCR), en donde el anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno evita la formación de un complejo C3bBb. En un aspecto, el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno, se une al factor B y evita o inhibe la escisión del factor B por el factor D. En otro aspecto, el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno, se une al tercer dominio de la repetición corta de consenso (SCR) del factor B humano. En otro aspecto, el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno se une a un epítipo en el tercer dominio de la SCR del factor B seleccionado entre: (a) un epítipo del factor B que incluye al menos una porción del factor B humano (SEQ ID NO: 2) que comprende desde aproximadamente la posición Tyr139 hasta aproximadamente la posición Ser185, o posiciones equivalentes a las mismas en una secuencia del factor B no humano; (b) un epítipo del factor B que incluye al menos una porción de factor B humano (SEQ ID NO: 2) que comprende desde aproximadamente la posición Tyr139 hasta aproximadamente la posición Ser141, o posiciones equivalentes a las mismas en una secuencia del factor B no humano; (c) un epítipo del factor B que incluye al menos una porción del factor B humano (SEQ ID NO: 2) que comprende desde aproximadamente la posición Glu182 hasta aproximadamente la posición Ser185, o posiciones equivalentes a las mismas en una secuencia del factor B no humano; o (d) un epítipo del factor B que incluye al menos una porción del factor B humano (SEQ ID NO: 2) que comprende una cualquiera o más de las siguientes posiciones o de sus posiciones equivalentes en una secuencia del factor B no humano: Tyr139, Cys140, Ser141, Glu182, Gly184 o Ser185. En aún otro aspecto, el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno, se une selectivamente a un epítipo en el tercer dominio de la SCR del factor B (SEQ ID NO: 2) que comprende una o varias de las siguientes posiciones de aminoácidos o sus posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano: Ala137, Tyr139, Ser141, Glu182, Ser185, Thr189, Glu190 y Ser192. En otro aspecto, el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno, se une selectivamente a un epítipo en el tercer dominio de la SCR del factor B (SEQ ID NO: 2) que comprende las siguientes posiciones de aminoácidos o sus posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano: Ala137, Tyr139, Ser141, Glu182, Ser185, Thr189, Glu190 y Ser192. En aún otro aspecto, el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno, se une selectivamente a un epítipo en el tercer dominio de la SCR del factor B (SEQ ID NO: 2) que consiste en las siguientes posiciones de aminoácidos o sus posiciones equivalentes en una secuencia del factor B no humano: Ala137, Tyr139, Ser141, Glu182, Ser185, Thr189, Glu190 y Ser192. El anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno se puede unir a un epítipo no lineal dentro de la estructura tridimensional de una porción del tercer dominio de la SCR del factor B, en donde la porción se define por al menos las posiciones de aminoácidos Ala137-Ser192 de SEQ ID NO: 2 o posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano. En otro aspecto, el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno, se une selectivamente a un factor B procedente de múltiples especies de mamíferos (por ejemplo, ser humano y un animal seleccionado entre el grupo que consiste en primate no humano, ratón, rata, cerdo, caballo y conejo). El anticuerpo o

el fragmento que se une a antígeno puede tener un isotipo o una subclase que no activa el complemento, puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo monovalente. El fragmento que se une a antígeno puede incluir un fragmento Fab. En una realización preferida, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 1379 (producido por la ATCC n° de depósito PTA-6230).

5 Otra realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o a un fragmento del mismo que se une a antígeno que se une selectivamente al factor B y evita la formación de un complejo C3bBb, en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo inhibe competitivamente la unión específica del anticuerpo monoclonal 1379 (producido por la ATCC n° de depósito PTA-6230) al factor B humano y de ratón, y en donde la capacidad del anticuerpo monoclonal 1379 para inhibir la vía alternativa del complemento se inhibe cuando el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno, se une al factor B humano. En un aspecto, el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno, inhibe competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal 1379 con el factor B humano, en donde la especificidad comparativa de la unión se determina mediante un ensayo de competencia anticuerpo-anticuerpo en presencia de factor B humano.

15 Otra realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o a un fragmento del mismo que se une selectivamente al factor B humano y que evita la formación de un complejo C3bBb, en donde el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo inhibe competitivamente la unión específica al factor B humano de un segundo anticuerpo o de un fragmento del mismo que se une a antígeno, y en donde el segundo anticuerpo o el fragmento del mismo que se une a antígeno se une al tercer dominio de la SCR del factor B humano, y se une selectivamente al factor B procedente de al menos ser humano y ratón.

20 También se incluyen en la presente invención composiciones que comprenden cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente y fragmentos que se unen a antígeno.

Además, otra realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno para uso en un método para reducir o prevenir la hiperreactividad (AHR) de las vías respiratorias o la inflamación de las vías respiratorias en un animal. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno tal como se ha descrito anteriormente, se administra a un animal que tiene hiperreactividad de las vías respiratorias asociada con inflamación o inflamación de las vías respiratorias, o que tiene el riesgo de desarrollarlas. En un aspecto, el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno se administra a través de una vía seleccionada entre el grupo que consiste en las vías oral, nasal, tópica, inhalada, intratraqueal, transdérmica, rectal y parenteral. En otro aspecto, el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno se administra al animal en una cantidad eficaz para reducir sensiblemente la hiperreactividad de las vías respiratorias en el animal, en comparación con antes de la administración del anticuerpo o del fragmento que se une a antígeno. En otro aspecto, el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno se administra al animal en una cantidad eficaz para reducir sensiblemente la hiperreactividad de las vías respiratorias en el animal, en comparación con un nivel de hiperreactividad de las vías respiratorias en una población de animales que tienen inflamación en donde el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno no se había administrado. En un aspecto, la administración del anticuerpo o del fragmento que se une a antígeno disminuye la capacidad de respuesta del animal a la metacolina o la histamina. En otro aspecto, el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno se administra con un vehículo farmacéuticamente aceptable seleccionado entre el grupo que consiste en: un polvo seco dispersable; etanol anhidro; cápsulas pequeñas; liposomas; una pulverización nebulizada; y un excipiente inyectable. En otro aspecto, el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno se administra en un vehículo o un dispositivo seleccionado entre el grupo que consiste en: etanol anhidro; un sistema de inhalación de polvo seco; un sistema de inhalación por ultrasonidos; un inhalador de dosis medidas presurizado; y un dispositivo de solución medida. En aún otro aspecto, el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno se administra a dicho mamífero en combinación con un agente seleccionado entre el grupo que consiste en: corticosteroides, β -agonistas (de acción prolongada o corta), modificadores de leucotrienos, antihistamínicos, inhibidores de fosfodiesterasas, cromoglicato de sodio, Nedocromil, teofilina, antagonistas de citocinas, antagonistas del receptor de citocinas, anti-IgE e inhibidores de la función de linfocitos T. En aún otro aspecto, la hiperreactividad de las vías respiratorias o la inflamación de las vías respiratorias se asocia con una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonía por hipersensibilidad, neumonía eosinofílica, enfisema, bronquitis, bronquiectasia, bronquitis alérgica, fibrosis quística, tuberculosis, neumonitis por hipersensibilidad, asma ocupacional, sarcoidosis, síndrome de la enfermedad de las vías respiratorias reactivas, enfermedad pulmonar intersticial, síndrome hipereosinofílico, rinitis, sinusitis, asma inducida por el ejercicio, asma inducida por la contaminación, tos variante de asma, enfermedad pulmonar parasitaria, infección por el virus sincitial respiratorio (VSC), infección por el virus de la parainfluenza (VPI), infección por rinovirus (RV) e infección por adenovirus. En un aspecto, la hiperreactividad de las vías respiratorias se asocia con la inflamación alérgica. El anticuerpo o el fragmento de la presente invención se puede administrar, en una realización preferida, a mamíferos, y más preferiblemente, a seres humanos.

Breve Descripción de las Figuras

La Fig. 1 es un diagrama esquemático que muestra la construcción de una proteína de fusión de factor B-Ig.

La Fig. 2A es un gráfico de líneas que muestra que el anti-factor B inhibía completamente la vía alternativa del complemento en un ensayo con zimosano cuando se añadieron 3 μ g a una reacción que contenía 10 μ l de suero.

La Fig. 2B es un gráfico de líneas que muestra que el anti-factor B inhibía completamente la vía alternativa del complemento en un ensayo de lisis de eritrocitos de conejo cuando se añadieron 6 µg de anticuerpo a 10 µl de suero humano.

5 La Fig. 3 es un gráfico de líneas que muestra que la administración de anti-factor B a ratones inhibe la vía alternativa del complemento.

La Fig. 4A es un gráfico de líneas para la resistencia de las vías respiratorias (R_L) que muestra que ratones *fB* *+/+* sensibilizados al alérgeno y estimulados mostraron un aumento de la capacidad de respuesta a la metacolina en comparación con ratones *fB* *+/+* solamente estimulados, mientras que los ratones *fB* *-/-* mostraron una respuesta significativamente menor a la metacolina.

10 La Fig. 4B es un gráfico de líneas para la distensibilidad dinámica (C_{dyn}) que muestra que ratones *fB* *+/+* sensibilizados al alérgeno y estimulados mostraban una mayor capacidad de respuesta a la metacolina en comparación con ratones *fB* *+/+* únicamente estimulados, mientras que los ratones *fB* *-/-* mostraron una respuesta significativamente menor a la metacolina.

15 La Fig. 5 es un gráfico de barras que caracteriza el fluido del BAL y el tejido pulmonar de ratones *fB* *-/-* después de sensibilización y estimulación de las vías respiratorias.

La Fig. 6A es un gráfico de líneas para la resistencia de las vías respiratorias (R_L) que muestra que ratones *fB* *-/-* sensibilizados a la ambrosía y estimulados mostraban una disminución en la capacidad de respuesta a la metacolina, mientras que los *fB* *+/+* desarrollaron una fuerte respuesta a la metacolina.

20 La Fig. 6B es un gráfico de líneas para la distensibilidad dinámica (C_{dyn}) que muestra que ratones *fB* *-/-* sensibilizados a la ambrosía y estimulados mostraban una disminución en la capacidad de respuesta a la metacolina, mientras que los *fB* *+/+* desarrollaron una fuerte respuesta a la metacolina.

La Fig. 6C es un gráfico de barras que caracteriza el fluido del BAL y el tejido pulmonar y que muestra la inflamación de las vías respiratorias en el fluido del BAL se redujo en los ratones *fB* *-/-* sensibilizados a la ambrosía y estimulados, en comparación con los ratones *fB* *+/+*.

25 La Fig. 7A es un gráfico de líneas que muestra que ratones *fB* *-/-* sensibilizados y estimulados tratados con el factor B antes de cada estimulación, mostraban una disminución de la respuesta a la metacolina similar a la de ratones *fB* *-/-* sensibilizados y estimulados tratados con PBS, pero significativamente menor en comparación con ratones *fB* *+/+* sensibilizados y estimulados.

30 La Fig. 7B es un gráfico de barras que muestra que la administración del factor B reconstituye la capacidad de desarrollar AHR e inflamación de las vías respiratorias en ratones *fB* *-/-*.

La Fig. 8A es un gráfico de líneas de la resistencia de las vías respiratorias (R_L) que muestra que tanto la administración sistémica como nebulizada de un anticuerpo que neutraliza el factor B, inhibe el desarrollo de AHR en ratones sensibilizados y estimulados.

35 La Fig. 8B es un gráfico de líneas para la distensibilidad dinámica (C_{dyn}) que muestra que tanto la administración sistémica como nebulizada de un anticuerpo que neutraliza el factor B, inhibe el desarrollo de AHR en ratones sensibilizados y estimulados.

40 La Fig. 8C es un gráfico de barras que caracteriza el fluido del BAL y el tejido pulmonar y que muestra que el tratamiento con anti-factor B tanto sistémico como nebulizado reduce el número de eosinófilos en el fluido del BAL, la inflamación peribronquial, el número de eosinófilos peribronquiales, así como el número de células mucosas positivas en el epitelio de las vías respiratorias.

45 La Fig. 9 es un gráfico de líneas que muestra que ratones *C4* *-/-* sensibilizados y estimulados (rombo negro, n = 10) mostraban una respuesta similar frente a MCh inhalada que los ratones *C4* *+/+* sensibilizados y estimulados (cuadrado negro, n = 10) y unas respuestas significativamente mayores en comparación con ratones *C4* *-/-* únicamente estimulados (rombo blanco, n = 10) y ratones *C4* *+/+* únicamente estimulados (cuadrado blanco, n = 10) (*p <0,05 comparado con *fB* *-/-* sensibilizado y estimulado, *fB* *+/+* estimulado y *fB* *-/-* estimulado; # p <0,05 comparado con *fB* *+/+* estimulado y *fB* *-/-* estimulado; ¶ p <0,05 comparado con *C4* *+/+* estimulado y *C4* *-/-* estimulado).

50 La Fig. 10 es un gráfico de líneas que muestra que ratones *C4* *-/-* sensibilizados y estimulados (cuadrado negro, n = 8) mostraban una mayor resistencia de las vías respiratorias frente a MCh inhalada, en comparación con ratones *C4* *-/-* únicamente estimulados (cuadrado blanco, n = 8), y que el tratamiento de los ratones *C4* *-/-* sensibilizados y estimulados con anticuerpo monoclonal sistémico anti-factor B disminuía la respuesta de las vías respiratorias frente a MCh (círculo negro, n = 8).

La Fig. 11 es un dibujo esquemático que muestra un modelo del cartografiado de los epítomos para AcM1379 en la superficie del factor B humano.

La Fig. 12 es un dibujo esquemático que muestra un complejo modelado de AcM1379 (un fragmento Fab) que se une al factor B, en el que los lados que se unen al antígeno del Fab se han modelado para cubrir toda la región del epítipo cartografiado.

5 La Fig. 13 es un gráfico de barras que muestra que los ratones que se trataron previamente con 1379 mostraron aumentos leves en nitrógeno ureico sérico, 24 horas después de la reperfusión, en comparación con los testigos de tipo silvestre.

Descripción detallada de la invención

Una realización de la presente invención se refiere a proporcionar nuevos anticuerpos del factor B que bloquean selectivamente la vía alternativa del complemento, y al uso de tales anticuerpos para inhibir la vía alternativa del complemento en cualquier afección o enfermedad en la que tal inhibición es deseada, es útil o se espera que sea útil. En concreto, dado el gran potencial en ventajas terapéuticas de un inhibidor específico de la vía alternativa del complemento para uso en métodos de tratamiento de muchas enfermedades, los presentes inventores han desarrollado varios anticuerpos monoclonales nuevos, inhibidores dirigidos contra el factor B. Varios de estos anticuerpos se han caracterizado y uno de estos anticuerpos se ha caracterizado con más detalle. Este anticuerpo se ha sometido a ensayo *in vitro*, así como *in vivo*, tanto en un modelo bien aceptado de inflamación alérgica y asma, como en un modelo de lesión renal por isquemia-reperfusión, que es generalmente aplicable a la lesión por isquemia-reperfusión. Para producir tales anticuerpos, a ratones carentes de factor B por selección de gen (*fB* *-/-*) se les inyectó una proteína de fusión constituida por el segundo y tercer dominios de la repetición corta de consenso (SCR) del factor B, unida a una inmunoglobulina. En los ratones se escrutó una respuesta inmune frente al factor B, y se fusionaron células esplénicas de uno de los ratones inyectados, con células de mieloma. Uno de los hibridomas resultantes, denominado 1379, produce un anticuerpo IgG₁ que inhibe la activación de la vía alternativa del complemento *in vitro* e *in vivo*, aunque los presentes inventores han producido y caracterizado múltiples anticuerpos monoclonales con la capacidad de inhibir la vía alternativa del complemento (véase la Tabla 4). El anticuerpo 1379 (también denominado en esta memoria AcM 1379) inhibe la activación de la vía alternativa en suero procedente de diversas especies animales incluyendo, ratones, ratas, seres humanos, babuinos, monos Rhesus, macacos cangrejeros, cerdos, conejos y caballos. Fragmentos Fab preparados a partir de este anticuerpo también dieron como resultado la inhibición completa de la vía alternativa. Los inventores también han mostrado que el anticuerpo puede inhibir completamente la lisis de eritrocitos a través del suero humano, lo que confirma la capacidad de este reactivo para bloquear completamente la activación de la vía alternativa del complemento. El cartografiado de epítipos se utilizó para mostrar que este anticuerpo se une al factor B dentro del tercer dominio de la repetición corta de consenso (SCR), y que el anticuerpo impide la formación del complejo C3bBb. Una descripción detallada del epítipo reconocido por este anticuerpo se proporciona a continuación. Por lo tanto, en esta memoria se describen inhibidores selectivos de la vía alternativa del complemento, y en particular estos nuevos anticuerpos del factor B, que tienen una amplia especificidad de la reactividad, una eficacia demostrada *in vitro* e *in vivo*, y que son herramientas terapéuticas muy eficaces para uso en cualquiera entre una variedad de afecciones y enfermedades en las que la inhibición selectiva de la vía del complemento es útil, necesaria y/o preferida (por ejemplo, afecciones asociadas con la hiperreactividad de las vías respiratorias y la inflamación de las vías respiratorias (ver más abajo), lesión por isquemia-reperfusión, etc.). Estos anticuerpos también pueden estar humanizados o manipulados de otra manera para reducir los efectos secundarios potenciales sobre el sistema inmune y, por lo tanto, son un nuevo reactivo terapéutico, valioso.

Los anticuerpos que han sido producidos por los presentes inventores reconocen un sitio en el factor B que se comparte en diversas especies de mamíferos (incluidos los humanos) en el que se realizan experimentos preclínicos de prueba de principio, permitiendo de este modo que descubrimientos en modelos de enfermedades humanas se trasladen fácilmente a terapias humanas. Antes de la presente invención, los inventores no tenían conocimiento de ningún otro anticuerpo contra el factor B que mostrara una inhibición de amplio espectro de la proteína, como la que tiene el anticuerpo de la presente invención. Por lo tanto, los presentes inventores también han identificado un sitio único en el factor B contra el que se pueden desarrollar nuevos reactivos inhibidores. La identificación del factor B y de las otras proteínas en la vía alternativa del complemento, como dianas terapéuticas específicas, proporciona tanto una estrategia terapéutica racional, como compuestos guías que se pueden seguir para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias y otras enfermedades. Existen ventajas en el bloqueo selectivo de la vía alternativa. Por ejemplo, ratones *C4* *-/-* (ratones que carecen del componente C4 del complemento que es genérico para las vías del complemento clásica, alternativa y de lectinas), pero no ratones *fB* *-/-* (carentes del factor B), parecen más susceptibles a una infección bacteriana experimental, lo que sugiere que al dejar la vía clásica intacta, un inhibidor de la vía alternativa plantea menos riesgo de infección grave. El bloqueo de la vía clásica también puede dar como resultado una autoinmunidad y los pacientes con carencias congénitas de componentes de la vía clásica tienen un mayor riesgo de infección y de autoinmunidad. La inhibición selectiva de la vía alternativa evita la generación de ligandos obtenidos a partir de C3 para el receptor C3a, así como para los receptores del complemento 1-4 y C5a. Los efectos del bloqueo de la vía alternativa pueden ser, de hecho, más directos, debido a que los receptores, todavía mal caracterizados, para los productos de la activación de Ba o Bb del factor B que se generan durante el proceso de activación.

Otra realización de la presente invención se refiere a un descubrimiento sorprendente de los presentes inventores en el que la activación de la cascada del complemento a través de la vía alternativa es decisiva y, de hecho, necesaria

y suficiente para el desarrollo de hiperreactividad de las vías respiratorias e inflamación de las vías respiratorias. Más particularmente, los presentes inventores describen en este documento el descubrimiento de que la inhibición de la vía alternativa, pero no de la vía clásica del complemento, evita la hiperreactividad de las vías respiratorias y reduce la inflamación de las vías respiratorias. Los inventores muestran este descubrimiento usando ratones carentes de factor B (es decir, a través de tecnología de genes inactivados) y mediante la inhibición del factor B con anticuerpos monoclonales (administrados de forma sistémica y mediante aerosol). Por tanto, los inventores describen en este documento la inhibición selectiva de la vía alternativa del complemento a través de este medio o de cualquier otro (por ejemplo, mediante una carencia o una inhibición del factor D o de properdina), para inhibir la hiperreactividad de las vías respiratorias y la inflamación de las vías respiratorias. Los presentes inventores han mostrado que el factor B es necesario para la inducción del asma experimental. Es importante destacar que el factor B es esencial para la fase de estimulación (o efectora) de este modelo, y la inhalación de un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente al factor B en el pulmón o que se administra sistémicamente, bloquea el desarrollo de la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) y la inflamación de las vías respiratorias asociada con la enfermedad alérgica inflamatoria, como se ejemplifica en un modelo experimental de asma. Por otra parte, los presentes inventores han descubierto que esta inhibición se logra específicamente a través de la inhibición de la vía alternativa del complemento, ya que unos resultados adicionales mostraron que ratones con el gen de C4 inactivado (C4 *-/-*) no estaban protegidos contra la AHR, mientras que ratones con el gen del factor B inactivado (*fB -/-*) estaban protegidos contra la AHR en este sistema de modelo. Por lo tanto, los presentes inventores han descubierto que la inhibición de la vía alternativa del complemento (por cualquier medio) es necesaria y suficiente para inhibir la AHR y la inflamación de las vías respiratorias y de ese modo para tratar o prevenir afecciones y enfermedades relacionadas con las mismas. Además, los inventores muestran que la inhibición de la vía clásica del complemento no es necesaria para inhibir la AHR o la inflamación de las vías respiratorias y, por lo tanto, tal y como se ha descrito anteriormente, se pueden evitar unas consecuencias no deseables asociadas con la inhibición de la vía clásica del complemento, siguiendo las enseñanzas de la presente invención.

25 *Anticuerpos del factor B*

Por consiguiente, una primera realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo o a un fragmento del mismo que se une a antígeno que inhibe selectivamente la vía alternativa del complemento y, en particular, a un anticuerpo del factor B. En un aspecto, el anticuerpo se une selectivamente a la proteína de la vía alternativa del complemento de una manera tal que la proteína se inhibe o se evita que se una a otra proteína con la que normalmente interacciona (en condiciones naturales o fisiológicas). En otro aspecto, el anticuerpo se une selectivamente a la proteína de tal manera que la proteína se inhibe o se evita la activación de otra proteína con la que normalmente interacciona, a pesar de que la proteína puede unirse al menos parcialmente a la otra proteína. Anticuerpos particularmente preferidos y fragmentos de los mismos que se unen a antígeno para uso en la inhibición selectiva de la vía alternativa del complemento, incluyen los anticuerpos del factor B descritos en este documento y, en particular, el anticuerpo AcM 1379 descrito con detalle en este documento.

Los anticuerpos (y fragmentos de los mismos que se unen a antígeno) que se unen selectivamente al factor B e inhiben la vía alternativa del complemento de acuerdo con la invención, se describen y se ejemplifican con detalle en este documento. En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno, se une a una superficie de unión conservada o a un epítipo de una proteína de este tipo (por ejemplo, el factor B) que se conserva entre las especies animales, y particularmente las especies de mamíferos (es decir, el anticuerpo tiene reactividad cruzada con la proteína procedente de dos o más especies de diferentes mamíferos). En particular, la presente invención incluye un anticuerpo que se une al factor B, procedente de al menos dos y, preferentemente, varias especies de diferentes mamíferos, incluyendo, pero no limitadas a, ser humano, primate no humano, ratón, rata, cerdo, caballo y conejo. La presente invención incluye un anticuerpo que se une al factor B procedente del ser humano y del ratón. En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno, se une a la tercera repetición corta de consenso (SCR) del factor B. En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno, se une a una región del factor B que impide la escisión del factor B a través del factor D. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo es el anticuerpo denominado en este documento 1379 (es decir, el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma del mismo número, que también tiene la Designación de Depósito PTA-6230 en la ATCC), o un fragmento del mismo que se une a antígeno.

El hibridoma descrito en este documento como 1379 (o AcM 1379) se depositó el 21 de septiembre de 2004, en la American Type Culture Collection (ATCC, situada en 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209), según los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes, y ha recibido la Designación de Depósito PTA-6230 en la ATCC.

De acuerdo con la presente invención, el tamaño mínimo de una proteína, una porción de una proteína (por ejemplo, un fragmento, una porción, un dominio, etc.), o una región o un epítipo de una proteína, es un tamaño suficiente para servir como un epítipo o una superficie conservada de unión para la generación de un anticuerpo o como una diana en un ensayo *in vitro*. En una realización, una proteína de la presente invención tiene una longitud de al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7 o 8 aminoácidos (por ejemplo, adecuada para un epítipo de anticuerpo o como un péptido detectable en un ensayo), o de al menos aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, o al

menos aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, y así sucesivamente, con cualquier longitud entre 4 aminoácidos y hasta la longitud total de una proteína o de una porción de la misma o más larga, en números enteros (por ejemplo, 8, 9, 10,...25, 26,...500, 501,...).

5 La secuencia de nucleótidos del gen y la región codificadora que codifica el factor B humano y otras proteínas del complemento, así como la secuencia de aminoácidos de tales proteínas, son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, el gen que codifica el factor B humano y otras proteínas del complemento se encuentra en la base de datos de NCBI con el nº de orden NG_000013. La secuencia codificadora del factor B se encuentra en la base de datos de NCBI con el nº de orden NM_001710 y la secuencia de aminoácidos de la preproteína del factor B se encuentra en la base de datos de NCBI con el nº de orden NP_001701 o P00751. La secuencia de aminoácidos del nº de orden 10 P00751 de la base de datos de NCBI, que es una secuencia de la preproteína del factor B humano, se representa en este documento por SEQ ID NO: 1. Las secuencias procedentes de otras especies animales también son conocidas en la técnica. A modo de comparación, en la secuencia del factor B de ratón (por ejemplo, véase en la base de datos de NCBI, el nº de orden P04186, representado en este documento por SEQ ID NO: 6), el tercer dominio de la SCR se encuentra en las posiciones 160 a 217 de esta preproteína de 761 aminoácidos, y la proteína madura del factor B de murido abarca las posiciones 23 a 761 de SEQ ID NO: 6.

La preproteína del factor B humano representada por SEQ ID NO: 1, es una proteína de 764 aminoácidos con un péptido señal que abarca las posiciones de los aminoácidos 1-25. La cadena madura del factor B se corresponde a las posiciones 26-764 de SEQ ID NO: 1 y se representa en esta memoria por SEQ ID NO: 2. Las tres regiones de la SCR del factor B humano están representadas en este documento por SEQ ID NO: 3 (SCR1, también conocida como Sushi 1, que abarca desde aproximadamente la posición 35 a aproximadamente la posición 100 de SEQ ID NO: 1 o desde aproximadamente la posición 5 a aproximadamente la posición 75 de SEQ ID NO: 2), SEQ ID NO: 4 (SCR2, también conocida como Sushi 2, que abarca desde aproximadamente la posición 101 hasta aproximadamente la posición 160 de SEQ ID NO: 1 o desde aproximadamente la posición 76 a aproximadamente la posición 135 de SEQ ID NO: 2), y SEQ ID NO: 5 (SCR3, también conocida como Sushi 3, que se extiende desde aproximadamente la posición 163 hasta aproximadamente la posición 220 de SEQ ID NO: 1 o desde aproximadamente la posición 138 hasta aproximadamente la posición 195 de SEQ ID NO: 2).

Basándose en el cartografiado de los epítomos de un anticuerpo ejemplar de la invención, empleando los fragmentos descritos por Hourcade, 1995, *J. Biol. Chem.* (véanse los Ejemplos), un anticuerpo anti-factor B de la presente invención se une preferentemente a un epítopo o a una superficie de unión conservada dentro del tercer dominio de SCR o que contiene una parte del mismo, y más preferentemente, a un epítopo del factor B humano que incluye al menos una porción de la secuencia que comprende desde aproximadamente la posición Tyr139 hasta aproximadamente la posición Ser185, con respecto a la proteína madura del factor B (SEQ ID NO: 2), a un epítopo del factor B humano que incluye al menos una porción de la secuencia que comprende desde aproximadamente la posición Tyr139 hasta aproximadamente la posición Ser141, con respecto a la proteína madura del factor B (SEQ ID NO: 2), a un epítopo del factor B humano que incluye al menos una porción de la secuencia que comprende desde aproximadamente la posición Glu182 hasta aproximadamente la posición Ser185, con respecto a la proteína madura del factor B (SEQ ID NO: 2), a un epítopo del factor B que incluye al menos una porción del factor B humano (SEQ ID NO: 2) que comprende una cualquiera o más de las siguientes posiciones o sus posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano: Tyr139, Cys140, Ser141, Glu182, Gly184 o Ser185, o a un epítopo del factor B que incluye al menos una porción de las posiciones equivalentes con respecto a especies animales no humanas. Un experto en la técnica puede alinear fácilmente la secuencia del factor B humano con la secuencia del factor B de otra especie animal y determinar las posiciones de las regiones SCR y las porciones específicas de las terceras regiones SCR correspondientes a las posiciones de aminoácidos anteriores. Por ejemplo, dos secuencias específicas se pueden alinear entre sí utilizando la secuencia BLAST2, tal y como se describe en Tatusova y Madden, (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-250.

Basándose en la creación de modelos de epítomos adicionales y el cartografiado de un anticuerpo ejemplar de la invención, en otra realización preferida, un anticuerpo anti-factor B de la presente invención se une preferentemente a un epítopo (una superficie de unión conservada) dentro del tercer dominio de la SCR del factor B o que contiene una parte o porción del mismo, que incluye al menos una o varias de las siguientes posiciones de aminoácido con respecto a SEQ ID NO: 2, o a sus posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano: A137, Y139, S141, E182, S185, T189, E190 y S192. En un aspecto de la invención, el epítopo está dentro del tercer dominio de la SCR del factor B o contiene una parte de la porción del mismo que incluye la totalidad o sustancialmente la totalidad (al menos cinco, seis o siete) de las siguientes posiciones de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o de sus posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano: Ala137, Tyr139, Ser141, Glu182, Ser185, Thr189, Glu190 y Ser192. En aún otro aspecto, el epítopo reconocido por un anticuerpo anti-factor B de la presente invención está dentro o contiene una parte o una porción del tercer dominio de la SCR del factor B que consiste en las siguientes posiciones de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o sus posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano: Ala137, Tyr139, Ser141, Glu182, Ser185, Thr189, Glu190 y Ser192.

60 En una realización, el epítopo reconocido por un anticuerpo del factor B de la invención también puede definirse más particularmente como un epítopo no lineal, situado dentro de la estructura tridimensional de una porción del tercer dominio de la SCR del factor B. La porción que contiene el epítopo es la estructura tridimensional del factor B que

está definida por sustancialmente todas (por ejemplo, al menos aproximadamente 90%) las posiciones de aminoácidos Ala137-Ser192 de SEQ ID NO: 2, o posiciones equivalentes en una secuencia no-humana del factor B, cuando dicha secuencia tiene la misma disposición conformacional que la secuencia de factor B de longitud completa natural. Un modelo de la estructura tridimensional del factor B, que ilustra un epítipo de AcM 1379 se ilustra en la Fig. 11 y la Fig. 12, por ejemplo. Tal y como se emplea en este documento, la "estructura tridimensional" o "estructura terciaria" de una proteína se refiere a la disposición de los componentes de la proteína en tres dimensiones. Tal expresión es bien conocida por los expertos en la técnica. Tal y como se usa en este documento, el término "modelo" se refiere a una representación en un medio tangible de la estructura tridimensional de una proteína, polipéptido o péptido. Por ejemplo, un modelo puede ser una representación de la estructura tridimensional en un archivo electrónico, en una pantalla de ordenador, en un trozo de papel (es decir, en un medio bidimensional) y/o como una figura de barras y esferas.

De acuerdo con la presente invención, un "epítipo" de una proteína o un péptido dados u otra molécula se define generalmente con respecto a los anticuerpos, como una parte o un sitio en una molécula más grande a la que se unirá un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno, y contra el cual se producirá un anticuerpo. El término epítipo se puede utilizar de forma intercambiable con la expresión "determinante antigénico", "sitio de unión del anticuerpo" o "superficie de unión conservada" de una proteína o un antígeno dados. Más específicamente, un epítipo se puede definir tanto por los residuos de aminoácidos implicados en la unión del anticuerpo como por su conformación en el espacio tridimensional (por ejemplo, un epítipo conformacional o la superficie de unión conservada). Un epítipo puede estar incluido en péptidos tan pequeños como aproximadamente 4-6 residuos de aminoácidos, o puede estar incluido en segmentos más grandes de una proteína, y no tiene que estar compuesto por residuos de aminoácidos contiguos cuando se refiere a una estructura tridimensional de un epítipo, en particular con respecto a un epítipo que se une a anticuerpo. Los epítipos que se unen a anticuerpos son frecuentemente epítipos conformacionales en lugar de un epítipo secuencial (es decir, un epítipo lineal), o en otras palabras, un epítipo definido por residuos de aminoácidos dispuestos en tres dimensiones en la superficie de una proteína o de un polipéptido al que se une un anticuerpo. Tal y como se ha mencionado anteriormente, el epítipo conformacional no se compone de una secuencia contigua de residuos de aminoácidos, pero en su lugar, los residuos están tal vez muy separados en la secuencia primaria de la proteína, y se juntan para formar una superficie de unión por la forma en que la proteína se pliega en su conformación natural en tres dimensiones. El epítipo reconocido por el AcM 1379 es un epítipo conformacional que no es un epítipo lineal.

Un experto en la técnica puede identificar y/o ensamblar epítipos conformacionales y/o epítipos secuenciales utilizando técnicas conocidas, incluyendo el análisis con mutaciones (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio); protección contra la degradación proteolítica (obtención de la huella de la proteína); análisis de mimotopos usando, por ejemplo, péptidos sintéticos y Pepscan, BIAcore o ELISA; cartografiado de la competencia de anticuerpos; selección de una genoteca combinatoria de péptidos; espectrometría de masas que acopla una fuente de láser asistida por una matriz y un análisis por tiempo de vuelo (MALDI-TOF); o creación de modelos tridimensionales (por ejemplo, usando cualquier programa informático adecuado, incluyendo, pero no limitado a, MOLSCRIPT 2.0 (Avatar Software AB, Heleneborgsgatan 21C, SE-11731 Estocolmo, Suecia), el programa O de pantalla gráfica (Jones et. al., *Acta Crystallography*, vol. A47, pág. 110, 1991), el programa GRASP de pantalla gráfica, o el programa INSIGHT de pantalla gráfica). Por ejemplo, se puede utilizar la sustitución molecular u otras técnicas y la estructura tridimensional conocida de una proteína relacionada para crear el modelo de la estructura tridimensional del factor B y predecir el epítipo conformacional del anticuerpo que se une a esta estructura. En efecto, se puede utilizar una o cualquier combinación de tales técnicas para definir el epítipo que se une a los anticuerpos. Las Figs. 11 y 12 ilustran el uso de creación de modelos tridimensionales, combinado con la información procedente del análisis de mimotopos y el análisis mutacional, para identificar el epítipo de un anticuerpo del factor B de la presente invención.

Tal y como se usa en este documento, la expresión "se une selectivamente a" se refiere a la unión específica de una proteína con otra (por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento del mismo o un ligando de un antígeno), en donde el nivel de la unión, tal como se mide mediante cualquier ensayo convencional (por ejemplo, un inmunoensayo), es estadísticamente significativamente mayor que el testigo de ruido de fondo para el ensayo. Por ejemplo, cuando se realiza un inmunoensayo, los testigos incluyen típicamente un pocillo/tubo de reacción que contiene solo un anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno (es decir, en ausencia de antígeno), en donde una cantidad de reactividad (por ejemplo, la unión no específica al pocillo) del anticuerpo o del fragmento del mismo que se une a antígeno, en ausencia del antígeno, se considera ruido de fondo. La unión puede medirse utilizando una variedad de métodos convencionales en la técnica, incluyendo, pero no limitados a: transferencia Western, inmunotransferencia, ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, resonancia de plasmón superficial, quimioluminiscencia, polarización fluorescente, fosforescencia, análisis inmunohistoquímico, espectrometría de masas que acopla una fuente de láser asistida por una matriz y un análisis por tiempo de vuelo (MALDI-TOF), microcitometría, micromatrices, microscopía, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y citometría de flujo.

Una realización de la presente invención incluye un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno que es un inhibidor competitivo de la unión del factor B con el anticuerpo anti-factor B (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 1379). De acuerdo con la presente invención, un inhibidor competitivo del factor B que se une a un anticuerpo anti-factor B de la presente invención, es un inhibidor (por ejemplo, otro anticuerpo o fragmento o polipéptido que se une a antígeno) que se une al factor B en el mismo epítipo o en un epítipo similar al del

anticuerpo anti-factor B conocido de la presente invención (por ejemplo, AcM 1379) de tal manera que se inhibe la unión del anticuerpo anti-factor B conocido con el factor B. Un inhibidor competitivo puede unirse a la diana (por ejemplo, el factor B) con una mayor afinidad hacia la diana que el anticuerpo anti-factor B. Se puede utilizar un inhibidor competitivo de una manera similar a la descrita en este documento para el anticuerpo 1379 anti-factor B (por ejemplo, para inhibir la vía alternativa del complemento, para inhibir la hiperreactividad de las vías respiratorias en un animal, para inhibir la inflamación de las vías respiratorias en un animal, para inhibir la lesión por isquemia reperfusion en un animal, etc.). Por ejemplo, una realización de la invención se refiere a un anticuerpo aislado o a un fragmento del mismo que se une a antígeno, que se une específicamente al factor B, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo inhibe competitivamente AcM 1379 en la unión específica al factor B, y en donde, cuando el anticuerpo o el fragmento del mismo se une al factor B, la vía alternativa del complemento se inhibe o, alternativamente, se inhibe la capacidad del AcM 1379 para inhibir la vía alternativa del complemento. Otra realización se refiere a un anticuerpo aislado o a un fragmento del mismo que se une específicamente al factor B, en donde el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo inhibe competitivamente un segundo anticuerpo o un fragmento del mismo en la unión específica al factor B, y en donde el segundo anticuerpo o un fragmento del mismo se une al tercer dominio de la SCR del factor B.

Los ensayos de competencia se pueden realizar utilizando técnicas convencionales en la técnica (por ejemplo, ELISA de competencia u otros ensayos de unión). Por ejemplo, los inhibidores competitivos se pueden detectar y cuantificar por su capacidad para inhibir la unión del factor B a un anticuerpo anti-factor B marcado (por ejemplo, el AcM 1379). Ensayos de competencia anticuerpo-anticuerpo en presencia de factor B humano, se describen, por ejemplo, en el Ejemplo 3. Los inhibidores competitivos de la unión del factor B al anti-factor B 1379, se describen en el Ejemplo 3 y la Tabla 4.

De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos se caracterizan porque comprenden dominios de inmunoglobulinas y, como tales, son miembros de la superfamilia de proteínas inmunoglobulinas. En términos generales, una molécula de anticuerpo comprende dos tipos de cadenas. Un tipo de cadena se denomina cadena pesada o H y la otra se denomina cadena ligera o L. Las dos cadenas están presentes en una relación equimolar, teniendo típicamente cada molécula de anticuerpo dos cadenas H y dos cadenas L. Las dos cadenas H están unidas entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena H se une a una cadena L a través de un enlace disulfuro. Solo hay dos tipos de cadenas L denominadas cadenas lambda (λ) y kappa (κ). Por el contrario, existen cinco clases principales de cadena H denominadas isotipos. Las cinco clases incluyen inmunoglobulina M (IgM o μ), inmunoglobulina D (IgD o δ), inmunoglobulina G (IgG o γ), inmunoglobulina A (IgA o α) y la inmunoglobulina E (IgE o ϵ). Las características distintivas entre dichos isotipos se definen por el dominio constante de la inmunoglobulina y se describen con detalle a continuación. Las moléculas de inmunoglobulinas humanas comprenden nueve isotipos, IgM, IgD, IgE, cuatro subclases de IgG que incluyen IgG1 (γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3) e IgG4 (γ 4), y dos subclases de IgA que incluyen IgA1 (α 1) e IgA2 (α 2). En los seres humanos, la subclase 3 de IgG e IgM son los activadores más potentes del complemento (sistema de complemento clásico), mientras que la subclase 1 de IgG y en un grado aún menor, la 2, son activadores de moderados a bajos del sistema de complemento clásico. La subclase IgG4 no activa el sistema de complemento (clásico o alternativo). El único isotipo de inmunoglobulina humana conocido por activar el sistema de complemento alternativo es IgA. En los ratones, las subclases de IgG son IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. La IgG1 de murino no activa el complemento, mientras que IgG2a, IgG2b e IgG3 son activadoras del complemento.

Cada cadena H o L de una molécula de inmunoglobulina comprende dos regiones denominadas dominios variables de la cadena L (dominios V_L) y dominios constantes de la cadena L (dominios C_L), y dominios variables de la cadena H (dominios V_H) y dominios constantes de la cadena H (dominios C_H). Un dominio C_H completo comprende tres subdominios (CH1, CH2, CH3) y una región bisagra. En conjunto, una cadena H y una cadena L pueden formar un brazo de una molécula de inmunoglobulina que tiene una región variable de inmunoglobulina. Una molécula de inmunoglobulina completa comprende dos brazos asociados (por ejemplo, unidos por disulfuro). Por lo tanto, cada brazo de una inmunoglobulina completa comprende una región V_{H+L} y una región C_{H+L} . Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión "región variable" o "región V" se refiere a una región V_{H+L} (también conocida como fragmento Fv), una región V_L o una región V_H . También, tal y como se usa en este documento, la expresión "región constante" o "región C" se refiere a una región C_{H+L} , una región C_L o una región C_H .

Una digestión limitada de una inmunoglobulina con una proteasa puede producir dos fragmentos. Un fragmento que se une a antígeno se conoce como un fragmento Fab, Fab' o $F(ab')_2$. Un fragmento que carece de la capacidad de unirse a antígeno se conoce como un fragmento Fc. Un fragmento Fab comprende un brazo de una molécula de inmunoglobulina que contiene una cadena L (dominios $V_L + C_L$) apareada con la región V_H y una porción de la región C_H (dominio CH1). Un fragmento Fab' se corresponde a un fragmento Fab con parte de la región bisagra fijada al dominio CH1. Un fragmento $F(ab')_2$ se corresponde a dos fragmentos Fab' que normalmente están unidos covalentemente entre sí a través de un enlace disulfuro, típicamente en las regiones bisagra.

El dominio C_H define el isotipo de una inmunoglobulina y confiere diferentes características funcionales dependiendo del isotipo. Por ejemplo, las regiones constantes μ permiten la formación de agregados pentaméricos de moléculas IgM y las regiones constantes α permiten la formación de dímeros.

La especificidad antigénica de una molécula de inmunoglobulina es conferida por la secuencia de aminoácidos de una región variable o V. Como tales, las regiones V de diferentes moléculas de inmunoglobulinas pueden variar

significativamente dependiendo de su especificidad antigénica. Ciertas porciones de una región V están más conservadas que otras y se denominan regiones armazón (regiones FW). Por el contrario, ciertas porciones de una región V son muy variables y se denominan regiones hipervariables. Cuando los dominios V_L y V_H se emparejan en una molécula de inmunoglobulina, las regiones hipervariables de cada dominio se asocian y crean bucles hipervariables que forman los sitios de unión al antígeno. Por lo tanto, los bucles hipervariables determinan la especificidad de una inmunoglobulina y se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) debido a que sus superficies son complementarias a antígenos.

Una variabilidad adicional de las regiones V es conferida por la variabilidad combinatoria de segmentos de genes que codifican una región V de inmunoglobulina. Los genes de la inmunoglobulina comprenden varios segmentos génicos de la línea germinal que se reorganizan somáticamente para formar un gen de inmunoglobulina reordenado que codifica una molécula de inmunoglobulina. Las regiones V_L están codificadas por un segmento del gen V de la cadena L y un segmento del gen J (segmento de unión). Las regiones V_H están codificadas por un segmento del gen V de la cadena H y un segmento del gen D (segmento de diversidad) y un segmento del gen J (segmento de unión).

Ambos segmentos del gen V de una cadena L y una cadena H contienen tres regiones con variabilidad sustancial de la secuencia de aminoácidos. Tales regiones se denominan CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena L, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena H, respectivamente. La longitud de una CDR1 de la cadena L puede variar sustancialmente entre las diferentes regiones V_L . Por ejemplo, la longitud de CDR1 puede variar desde aproximadamente 7 aminoácidos a aproximadamente 17 aminoácidos. Por el contrario, las longitudes de CDR2 y CDR3 de la cadena L típicamente no varían entre las diferentes regiones V_L . La longitud de una CDR3 de la cadena H puede variar sustancialmente entre diferentes regiones V_H . Por ejemplo, la longitud de CDR3 puede variar desde aproximadamente 1 aminoácido a aproximadamente 20 aminoácidos. Cada región CDR de la cadena H y L está flanqueada por regiones FW.

Otros aspectos funcionales de una molécula de inmunoglobulina incluyen la valencia de una molécula de inmunoglobulina, la afinidad de una molécula de inmunoglobulina y la avidéz de una molécula de inmunoglobulina. Ta y como se usa en este documento, la afinidad se refiere a la fuerza con la que una molécula de inmunoglobulina se une a un antígeno en un solo sitio en una molécula de inmunoglobulina (es decir, un fragmento Fab monovalente que se une a un antígeno monovalente). La afinidad difiere de la avidéz que se refiere a la suma total de la fuerza con la que una inmunoglobulina se une a un antígeno. La afinidad de la unión de una inmunoglobulina se puede medir usando técnicas convencionales, tales como técnicas de unión competitiva, diálisis en equilibrio o métodos de BIAcore. Tal y como se usa en este documento, la valencia se refiere al número de diferentes sitios que se unen a un antígeno por molécula de inmunoglobulina (es decir, el número de sitios que se unen a un antígeno por molécula de anticuerpo del fragmento que se une a un antígeno). Por ejemplo, una molécula de inmunoglobulina monovalente solo se puede unir a un antígeno en un momento, mientras que una molécula de inmunoglobulina bivalente puede unirse a dos o más antígenos a la vez, y así sucesivamente. Ambos anticuerpos monovalentes y bivalentes que se unen selectivamente a proteínas de la vía alternativa del complemento están incluidos en esta memoria.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico o multiespecífico. Un anticuerpo biespecífico (o multiespecífico) es capaz de unirse a dos antígenos (o más), como un anticuerpo divalente (o multivalente), pero en este caso, los antígenos son antígenos diferentes (es decir, el anticuerpo muestra una especificidad dual o mayor). Por ejemplo, un anticuerpo que se une selectivamente a una proteína en la vía alternativa del complemento de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, un anticuerpo anti-factor B tal y como se describe en este documento) se puede construir como un anticuerpo biespecífico, en el que la segunda especificidad de unión a un antígeno es para una diana deseada. Por lo tanto, un anticuerpo biespecífico incluido en la presente invención incluye un anticuerpo que tiene: (a) una primera porción (por ejemplo, una primera porción que se une a un antígeno) que se une a una proteína en la vía alternativa del complemento (por ejemplo, el factor B); y (b) una segunda porción que se une a una molécula de la superficie celular expresada por una célula. En esta realización, la segunda porción puede unirse a cualquier molécula de la superficie celular. Una molécula de la superficie celular preferida es un receptor o ligando, de modo que el anticuerpo se dirige a un tipo particular de célula o de tejido y/o a un sitio particular en un animal en el que se administra el anticuerpo. En una realización, la segunda especificidad de unión a un antígeno es para un receptor del complemento. Un receptor del complemento particularmente preferido incluye, pero no se limita a, un receptor del complemento de tipo 2 (CR2). Los anticuerpos que se unen selectivamente a CR2 y que, por lo tanto, se podrían utilizar en esta realización de la invención se describen, por ejemplo, en el documento de Patente de EE.UU. n° 6.820.011.

En una realización, los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos humanizados. Los anticuerpos humanizados son moléculas que tienen un sitio de unión a un antígeno obtenido a partir de una inmunoglobulina de una especie no humana, obteniéndose las partes restantes de la molécula derivadas de inmunoglobulina, a partir de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a un antígeno puede comprender o bien regiones variables completas fusionadas a dominios constantes humanos o solo las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) injertadas sobre las regiones armazón humanas adecuadas en los dominios variables. Los anticuerpos humanizados se pueden producir, por ejemplo, mediante la creación de modelos de los dominios variables del anticuerpo, y la producción de anticuerpos utilizando técnicas de ingeniería genética, tales como el injerto de CDRs (descrito a continuación). Una descripción de diversas técnicas para la producción de anticuerpos humanizados se encuentra, por ejemplo, en Morrison y col. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **81**:6851-55; Whittle et al. (1987) *Prot. Eng.* **1**:499-

505; Co et al. (1990) *J. Immunol.* **148**:1149-1154; Co et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:2869-2873; Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 4285-4289; Routledge et al. (1991) *Eur. J. Immunol.* **21**:2717-2725 y los documentos de Publicación de Patentes PCT nº WO 91/09967; WO 91/09968 y WO 92/113831.

5 Anticuerpos aislados de la presente invención pueden incluir suero que contiene tales anticuerpos, o anticuerpos que se han purificado en diversos grados. Los anticuerpos completos de la presente invención pueden ser policlonales o monoclonales. Alternativamente, equivalentes funcionales de anticuerpos completos, tales como fragmentos que se unen a antígeno, en los que uno o varios dominios del anticuerpo están truncados o ausentes (por ejemplo, los fragmentos Fv, Fab, Fab' o F(ab')₂), así como anticuerpos modificados genéticamente o fragmentos de los mismos que se unen a antígeno, que incluyen anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos humanizados (descritos anteriormente), anticuerpos que se pueden unir a más de un epítipo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) o anticuerpos que se pueden unir a uno o a varios antígenos diferentes (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos), también se pueden emplear en la invención.

15 Anticuerpos de la invención modificados genéticamente incluyen los producidos por técnicas convencionales de ADN recombinante que implican la manipulación y la expresión de nuevo de ADN que codifica regiones variables y/o constantes de anticuerpos. Ejemplos particulares incluyen, anticuerpos quiméricos, en los que los dominios V_H y/o V_L del anticuerpo provienen de una fuente diferente, en comparación con el resto del anticuerpo, y anticuerpos con CDRs injertadas (y fragmentos de las mismas que se unen a antígeno), en los que al menos una secuencia de CDR y, opcionalmente, al menos un aminoácido del armazón de la región variable se obtiene(n) a partir de una fuente y las porciones restantes de las regiones variables y constantes (según proceda) se obtienen a partir de una fuente diferente. La construcción de anticuerpos quiméricos y de anticuerpos con CDRs injertadas se describe, por ejemplo, en los documentos de Solicitud de Patentes Europeas: EP-A 0194276, EP-A 0239400, EP-A 0451216 y EP-A 0460617.

25 En una realización, los anticuerpos quiméricos se producen de acuerdo con la presente invención y comprenden dominios variables de anticuerpos que se unen a una proteína en la vía alternativa del complemento (por ejemplo, el factor B) y se fusionan con estos dominios, una proteína que sirve como un segundo resto dirigido a una diana. Por ejemplo, el resto que se dirige a una diana puede incluir una proteína que se asocia con la célula o el tejido contra el que va a ser dirigido o con un sistema particular en el animal. Por ejemplo, el resto que se dirige a una diana puede ser una porción de un receptor del complemento. Un receptor del complemento preferido para usar en este aspecto de la invención incluye el receptor del complemento de tipo 2 (CR2). El uso de CR2 y de porciones del mismo en una proteína de fusión o quimérica (por ejemplo, como un sistema de entrega) se describe con detalle en el documento de patente de EE.UU. nº 6.820.011.

35 En general, en la producción de un anticuerpo, un animal experimental adecuado, tal como, por ejemplo, pero no limitado a, un conejo, una oveja, un hámster, un conejillo de indias, un ratón, una rata o un pollo, se expone a un antígeno contra el que se desea un anticuerpo. Típicamente, un animal se inmuniza con una cantidad eficaz de antígeno que se inyecta en el animal. Una cantidad eficaz de antígeno se refiere a una cantidad necesaria para inducir la producción de anticuerpos en el animal. A continuación, se deja que el sistema inmune del animal responda durante un período de tiempo predeterminado. El proceso de inmunización se puede repetir hasta que el sistema inmune produce anticuerpos contra el antígeno. Con el fin de obtener anticuerpos policlonales específicos del antígeno, se recoge suero del animal que contiene los anticuerpos deseados (o en el caso de un pollo, el anticuerpo se puede recoger de los huevos). Tal suero es útil como un reactivo. Los anticuerpos policlonales se pueden purificar adicionalmente a partir del suero (o los huevos), por ejemplo, mediante el tratamiento del suero con sulfato de amonio.

45 Los anticuerpos monoclonales se pueden producir según la metodología de Kohler y Milstein (*Nature* 256:495-497,1975). Por ejemplo, los linfocitos B se recuperan a partir del bazo (o cualquier tejido adecuado) de un animal inmunizado y luego se fusionan con células de mieloma para obtener una población de células de hibridoma capaces de un crecimiento continuo en un medio de cultivo adecuado. Los hibridomas que producen el anticuerpo deseado se seleccionan sometiendo a ensayo la capacidad del anticuerpo producido por el hibridoma para unirse al antígeno deseado.

50 Un método preferido para producir anticuerpos de la presente invención incluye (a) administrar a un animal una cantidad eficaz de una proteína o péptido (por ejemplo, una proteína del factor B o un péptido que incluye dominios del mismo) para producir los anticuerpos y (b) recuperar los anticuerpos. En otro método, los anticuerpos de la presente invención se producen de forma recombinante. Por ejemplo, una vez que se ha obtenido una línea celular, por ejemplo un hibridoma, que expresa un anticuerpo de acuerdo con la invención, es posible clonar en la misma el ADNc e identificar los genes de la región variable que codifican el anticuerpo deseado, incluyendo las secuencias que codifican las CDRs. A partir de aquí, los anticuerpos y los fragmentos que se unen a antígeno de acuerdo con la invención, se pueden obtener mediante la preparación de uno o varios vectores de expresión replicables que contienen al menos la secuencia de ADN que codifica el dominio variable de la cadena pesada o ligera del anticuerpo y, opcionalmente, otras secuencias de ADN que codifican porciones restantes de las cadenas pesada y/o ligera como se desee, y transformar/transfectar una célula hospedadora apropiada, en la que tendrá lugar la producción del anticuerpo. Los hospedadores con expresión adecuada incluyen bacterias, (por ejemplo, una cepa de *E. coli*), hongos, (en particular, levaduras, por ejemplo, miembros de los géneros *Pichia*, *Saccharomyces* o

Kluyveromyces) y líneas celulares de mamífero, por ejemplo, una línea celular no productora de mieloma, tal como una línea NSO de ratón, o las células CHO. Con el fin de obtener una transcripción y traducción eficaces, la secuencia de ADN en cada vector debe incluir secuencias reguladoras apropiadas, particularmente una secuencia promotora y líder ligadas funcionalmente a la secuencia del dominio variable. Los métodos particulares para producir anticuerpos de esta manera son generalmente bien conocidos y se utilizan rutinariamente. Por ejemplo, los procedimientos básicos de biología molecular se describen en Maniatis et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989); la secuenciación del ADN se puede realizar tal y como se describe en Sanger et al. (PNAS 74, 5463, (1977)) y el manual de secuenciación de Amersham International plc; y la mutagénesis dirigida al sitio se puede llevar a cabo de acuerdo con el método de Kramer et al. (*Nucl. Acids Res.* 12, 9441, (1984)) y el manual de Anglian Biotechnology Ltd. Además, existen numerosas publicaciones, que incluyen memorias descriptivas de patentes, que detallan técnicas adecuadas para la preparación de anticuerpos mediante la manipulación de ADN, la creación de vectores de expresión y la transformación de células apropiadas, por ejemplo, tal como la revisión de Mountain A y Adair, J R en "Biotechnology and Genetic Engineering Reviews" (compilador Tombs, M P, 10, capítulo 1, 1992, Intercept, Andover, Reino Unido) y en los documentos de solicitudes de patente europea, mencionados anteriormente.

Los métodos alternativos que emplean, por ejemplo, la tecnología de presentación en fagos (véase, por ejemplo, los documentos de patentes de EE.UU. 5.969.108, 5.565.332, 5.871.907, 5.858.657) o el método de anticuerpo con linfocito seleccionado del documento de patente de EE.UU. 5.627.052, también se pueden usar para la producción de anticuerpos y/o de fragmentos de antígeno de la invención, como será bastante evidente para una persona experta.

Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere en general a composiciones para uso en la inhibición selectiva de la vía alternativa del complemento en un animal que tiene una afección o enfermedad, o tiene riesgo de desarrollarla, en la que la activación de la vía alternativa del complemento desempeña una función (por ejemplo, la activación de la vía alternativa del complemento contribuye a la afección o a la enfermedad, agrava al menos un síntoma de la afección o la enfermedad, o causa la afección o la enfermedad). Se incluye el uso de los nuevos anticuerpos del factor B de la presente invención, que se han descrito con detalle anteriormente. Tales afecciones o enfermedades incluyen, pero no se limitan a, afecciones asociadas con la hipersensibilidad de las vías respiratorias (incluyendo la hiperreactividad de las vías respiratorias que está asociada con inflamación), la lesión por isquemia-reperusión y la pérdida fetal. Las composiciones y formulaciones que comprenden tales anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a antígeno, así como polipéptidos que se unen a antígeno que imitan la especificidad de los anticuerpos del factor B descritos en este documento, así como la exposición de los métodos de administración y las dosis, se describen con detalle a continuación.

Método para prevenir o inhibir la hiperreactividad de las vías respiratorias y la inflamación de las vías respiratorias

Basándose en el presente descubrimiento de los inventores en el que la vía alternativa del complemento es necesaria y suficiente para inhibir la hiperreactividad de las vías respiratorias y la inflamación de las vías respiratorias, otra realización de la presente invención se refiere a una composición para uso en la inhibición de la hiperreactividad de las vías respiratorias y/o la inflamación de las vías respiratorias en un animal que tiene hiperreactividad de las vías respiratorias asociada con inflamación o inflamación de las vías respiratorias o que tiene riesgo de desarrollarla. El método descrito en esta memoria incluye una etapa de inhibición selectiva de la vía alternativa del complemento en un animal que tiene hiperreactividad de las vías respiratorias o tiene riesgo de desarrollarla, incluyendo hiperreactividad de las vías respiratorias que está asociada con inflamación (es decir, la hiperreactividad de las vías respiratorias se produce como resultado de una inflamación o de un proceso inflamatorio, o se produce junto con la inflamación de las vías respiratorias de forma simultánea o previa).

La siguiente exposición se proporciona para elaborar el aspecto del tratamiento o prevención de la hiperreactividad de las vías respiratorias y/o inflamación de las vías respiratorias en un animal, o afecciones o enfermedades relacionados con las mismas. Sin embargo, se debe entender que la consideración general de los inhibidores, las vías de administración, las dosis, los indicadores de tratamiento, la descripción de las formulaciones y similares, se puede aplicar a cualquiera de las realizaciones de la invención descrita en este documento (es decir, a otras afecciones o enfermedades distintas de las asociadas con la hiperreactividad de las vías respiratorias y la inflamación de las vías respiratorias). Por ejemplo, muchos de los aspectos generales de la invención que se describe a continuación, se pueden aplicar a la inhibición específica de la vía alternativa del complemento para tratar otras afecciones, tales como la lesión por isquemia-reperusión.

De acuerdo con la presente invención, inhibir la vía alternativa del complemento en un animal se refiere a la inhibición de la expresión y/o de la actividad biológica de al menos una proteína que forma parte de la vía alternativa del complemento. Tales proteínas incluyen, pero no se limitan a, el factor B, el factor D o la properdina. Inhibir "selectivamente" la vía alternativa del complemento significa que la presente invención inhibe preferente o exclusivamente la vía alternativa del complemento, pero no inhibe o al menos no inhibe sustancialmente otras vías para la activación del complemento, incluyendo la vía clásica del complemento o la vía de las lectinas. Por ejemplo, los nuevos anticuerpos del factor B y fragmentos de los mismos que se unen a antígeno de la presente invención, son un ejemplo de un reactivo que inhibe selectivamente la vía alternativa del complemento. Esta definición se aplica a otros métodos descritos en este documento en los que la vía alternativa del complemento se inhibe

selectivamente.

La inhibición de la vía alternativa del complemento de acuerdo con la presente invención se puede realizar afectando directamente la expresión (transcripción o traducción) o la actividad biológica de una proteína en la vía alternativa del complemento, o afectando directamente la capacidad de una proteína para unirse a una proteína en la vía alternativa del complemento, o para contribuir de otro modo a la activación del complemento por la vía alternativa. Más específicamente, en una realización, la expresión de una proteína se refiere tanto a la transcripción de la proteína como a la traducción de la proteína. Por lo tanto, la presente invención puede inhibir la transcripción y/o la traducción de una proteína en el animal que expresa naturalmente la proteína (por ejemplo, mediante la administración de un agente que inhibe la expresión de la proteína y modificando genéticamente un animal para que tenga una expresión reducida de la proteína). En otra realización, la inhibición de la vía alternativa del complemento se define en esta memoria como cualquier reducción medible (detectable) (es decir, disminución, regulación a la baja, inhibición) de la actividad de la vía, como mediante cualquier reducción medible de la expresión y/o de la actividad biológica de una proteína dentro de la vía alternativa del complemento.

De acuerdo con la presente invención, "hiperreactividad de las vías respiratorias" o "AHR" se refiere a una anomalía de las vías respiratorias que les permite estrecharse demasiado fácilmente y/o demasiado como respuesta a un estímulo capaz de inducir una limitación en el flujo de aire. La AHR puede ser una alteración funcional del sistema respiratorio como resultado de una inflamación en las vías respiratorias (es decir, la AHR que está asociada con inflamación) o como resultado de una remodelación de las vías respiratorias (por ejemplo, mediante el depósito de colágeno). Una limitación del flujo de aire se refiere al estrechamiento de las vías respiratorias que puede ser irreversible o reversible. Una limitación del flujo de aire o hiperreactividad de las vías respiratorias puede estar causada por el depósito de colágeno, el broncoespasmo, la hipertrofia del músculo liso bronquial, la contracción del músculo liso bronquial, la secreción mucosa, los depósitos celulares, la destrucción del epitelio, la alteración de la permeabilidad epitelial, las alteraciones de la función o la sensibilidad del músculo liso, las anomalías del parénquima pulmonar y las enfermedades infiltrativas en las vías respiratorias y alrededor de las mismas. Muchos de estos factores causantes pueden estar asociados con la inflamación, aunque la AHR es un síntoma que se puede distinguir de la inflamación (es decir, la AHR es una afección o un síntoma específico tal como se ha descrito anteriormente, que puede estar asociado, pero no es siempre, con una inflamación previa o simultánea de las vías respiratorias). La AHR se puede desencadenar en un paciente con una afección asociada con los factores causantes anteriores, mediante la exposición a un agente provocador o estímulo, también denominado en esta memoria un estímulo provocador de AHR. Tales estímulos incluyen, pero no se limitan a, alérgeno, metacolina, histamina, leucotrieno, solución salina, hiperventilación, ejercicio, dióxido de azufre, adenosina, propranolol, aire frío, un antígeno, bradiquinina, acetilcolina, una prostaglandina, ozono, contaminantes del medio ambiente y mezclas de los mismos. La presente invención se dirige a la hiperreactividad de las vías respiratorias asociada con cualquier afección respiratoria que implica inflamación y, en particular, a la hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por alérgenos.

La hiperreactividad de las vías respiratorias se asocia generalmente con inflamación alérgica y/o con inflamación inducida por virus. La hiperreactividad de las vías respiratorias asociada con una inflamación alérgica puede tener lugar en un paciente que tiene una afección o tiene riesgo de desarrollarla, que incluye, pero no está limitada a, cualquier enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias. Tales afecciones incluyen, pero no se limitan a: asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonía por hipersensibilidad, neumonía eosinofílica, enfisema, bronquitis, bronquitis alérgica, bronquiectasias, fibrosis quística, tuberculosis, neumonitis por hipersensibilidad, asma ocupacional, sarcoidosis, síndrome de vías respiratorias reactivas, enfermedad pulmonar intersticial, síndrome hipereosinofílico, rinitis, sinusitis, asma inducida por el ejercicio, asma inducida por contaminación y enfermedad pulmonar parasitaria. La hiperreactividad de las vías respiratorias asociada con una inflamación inducida por virus puede tener lugar en un paciente que tiene una infección por un virus, o que tiene riesgo de desarrollarla, incluyendo, pero no limitado a, virus respiratorio sincitial (VRS), virus de la parainfluenza (VPI), rinovirus (RV) y adenovirus. Otras enfermedades o afecciones a tratar utilizando el método y los agentes de la presente invención, incluyen cualquier afección pulmonar o complicación pulmonar que implica inflamación y/o hiperreactividad de las vías respiratorias, siendo el resultado de una enfermedad, por ejemplo, de una enfermedad autoinmune sistémica. Por ejemplo, en el lupus eritematoso sistémico, las complicaciones pulmonares podrían ser tratadas usando la presente invención.

La inflamación se caracteriza típicamente por la liberación de mediadores inflamatorios (por ejemplo, citocinas o quimiocinas) que reclutan células implicadas en la inflamación de un tejido. La inflamación de las vías respiratorias es la inflamación que se produce en las vías respiratorias (tejido pulmonar, células y tejido de las vías respiratorias) de un animal. Una afección o una enfermedad asociada con la inflamación alérgica es una afección o enfermedad en la que la estimulación de un tipo de respuesta inmune (por ejemplo, una respuesta inmune de tipo Th2) contra un agente sensibilizante, tal como un alérgeno, puede dar como resultado la liberación de mediadores inflamatorios que reclutan células implicadas en la inflamación en un animal, cuya presencia puede conducir a un daño tisular y a veces a la muerte. Tal y como se ha expuesto anteriormente, la AHR se asocia frecuentemente con (ocurre junto con o tal vez como resultado de) una inflamación de las vías respiratorias. Se observa que el síntoma o la afección de la AHR a veces se puede tratar a veces independientemente de los síntomas de la inflamación y viceversa (por ejemplo, un tratamiento de la AHR puede tener un impacto sobre la inflamación o puede no tenerlo - estas son afecciones separables).

La AHR se puede medir por una prueba de esfuerzo que comprende medir la función del sistema respiratorio de un animal como respuesta a un agente provocador (es decir, el estímulo). La AHR se puede medir como un cambio en la función respiratoria desde la línea basal trazada frente a la dosis de un agente provocador (un procedimiento para dicha medición y un modelo de mamífero útil para ello, se describen con detalle a continuación en los Ejemplos). La función respiratoria (y, por lo tanto, las características biológicas de la AHR) se puede medir, por ejemplo, mediante espirometría, pletismografía, flujos máximos, puntuaciones de los síntomas, signos físicos (es decir, la frecuencia respiratoria), respiración sibilante, tolerancia del ejercicio, uso de medicación de rescate (es decir, broncodilatadores), tos y gases en sangre. En los seres humanos, la espirometría se puede utilizar para medir el cambio en la función respiratoria junto con un agente provocador, tal como metacolina o histamina. En los seres humanos, la espirometría se realiza diciéndole a una persona que realice una inspiración profunda y sopla, lo más fuerte, rápido y prolongado como sea posible en un calibrador que mide el flujo de aire y el volumen. El volumen de aire espirado en el primer segundo se conoce como volumen espiratorio forzado (VEF_1), y la cantidad total de aire espirado se conoce como capacidad vital forzada (CVF). En los seres humanos, los VEF_1 y CVF previstos normales están disponibles y estandarizadas en función del peso, la talla, el sexo y la raza. Un individuo exento de enfermedad tiene un VEF_1 , y una CVF de al menos aproximadamente el 80% de los valores normales previstos para una persona en particular y una relación de VEF_1 /CVF de al menos aproximadamente el 80%. Los valores se determinan antes (es decir, que representan el estado de reposo de un paciente) y después de la inhalación (es decir, que representan el estado más elevado de resistencia pulmonar de un paciente) del agente provocador. La posición de la curva resultante indica la sensibilidad de las vías respiratorias hacia el agente provocador.

El efecto de aumentar las dosis o las concentraciones del agente provocador sobre la función pulmonar se determina midiendo el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (VEF_{1s}) y el VEF_1 sobre la capacidad vital forzada (relación VEF_1 /CVF) del animal estimulado con el agente provocador. En los seres humanos, la dosis o la concentración de un agente provocador (es decir, metacolina o histamina) que provoca una caída del 20% en el VEF_1 , ($PC_{20}VEF_1$) es indicativa del grado de AHR. Los valores de VEF_1 y CVF se pueden medir utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Las mediciones de la función pulmonar de resistencia de las vías respiratorias (R_L) y la distensibilidad dinámica (C_L) y la hiperreactividad se pueden determinar midiendo la presión transpulmonar como la diferencia de presión entre la abertura de las vías respiratorias y el pletismógrafo corporal. El volumen es el cambio de presión calibrada en el pletismógrafo corporal y el flujo es la diferenciación digital de la señal de volumen. La resistencia (R_L) y la distensibilidad (C_L) se obtienen utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, mediante el uso de una solución de mínimos cuadrados recursiva de la ecuación de movimiento). Cabe señalar que la medición del valor de la resistencia de las vías respiratorias (R_L) en un mamífero no humano (por ejemplo, un ratón) se puede utilizar para diagnosticar una obstrucción del flujo de aire, de forma similar a la medición de VEF_1 y/o de la relación VEF_1 /CVF en un ser humano.

Una variedad de agentes provocadores son útiles para la medición de los valores de AHR. Agentes provocadores adecuados incluyen estímulos directos e indirectos, y son típicamente agentes provocadores que desencadenan AHR *in vivo*. Tal como se usa en esta memoria, la expresión "agente provocador" se puede utilizar indistintamente con la frase "estímulo provocador de AHR". Los agentes provocadores o estímulos preferidos incluyen, por ejemplo, un alérgeno, metacolina, histamina, agentes irritantes orgánicos, gases y productos químicos irritantes, un leucotrieno, solución salina, hiperventilación, ejercicio, dióxido de azufre, adenosina, propranolol, aire frío, un antígeno, bradiquinina, acetilcolina, una prostaglandina, ozono, contaminantes del medio ambiente y mezclas de los mismos. Preferiblemente, para la inducción experimental de AHR, la metacolina (MCh) se utiliza como agente provocador. Las concentraciones preferidas de MCh para usar en una curva de concentración-respuesta, son entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 100 miligramos por mililitro (mg/ml). Las concentraciones más preferidas de MCh para usar en una curva de concentración-respuesta son entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg/ml. Las concentraciones incluso más preferidas de MCh para usar en una curva de concentración-respuesta son entre aproximadamente 0,02 y aproximadamente 25 mg/ml. Cuando se utiliza MCh como agente provocador, el grado de AHR se define por la concentración provocadora de MCh, necesaria para causar una caída del 20% del VEF_1 , de un animal ($PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$). Por ejemplo, en los seres humanos y empleando protocolos convencionales en la técnica, una persona normal tiene típicamente un $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1 > 8$ mg/ml de MCh. Por lo tanto, en los seres humanos, la AHR se define como $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1 < 8$ mg/ml de MCh.

De acuerdo con la presente invención, la función respiratoria también se puede evaluar con una variedad de pruebas estáticas que comprenden medir la función del sistema respiratorio de un animal en ausencia de un agente provocador. Ejemplos de pruebas estáticas incluyen, por ejemplo, espirometría, pletismografía, flujos máximos, puntuaciones de los síntomas, signos físicos (es decir, la frecuencia respiratoria), respiración sibilante, tolerancia al ejercicio, uso de medicación de rescate (es decir, broncodilatadores), gases en sangre y tos. La evaluación de la función pulmonar en pruebas estáticas se puede realizar midiendo, por ejemplo, la capacidad pulmonar total (CPT), el volumen torácico de gas (VTG), la capacidad residual funcional (CRF), el volumen residual (VR) y la conductancia específica (SGL) para volúmenes pulmonares, la capacidad de difusión del pulmón para monóxido de carbono (DLCO), la gasometría arterial, incluyendo pH, P_{O_2} y P_{CO_2} para el intercambio gaseoso. Tanto VEF_1 y VEF_1 /CVF se pueden utilizar para medir limitación del flujo de aire. Si la espirometría se utiliza en los seres humanos, el VEF_1 , de un individuo se puede comparar con el VEF_1 , de los valores previstos. Los valores previstos de VEF_1 están disponibles para normogramas convencionales basados en la edad del animal, el sexo, el peso, la talla y la raza. Un

animal normal tiene típicamente un VEF_1 , al menos aproximadamente el 80% del VEF_1 previsto para el animal. La limitación del flujo de aire da como resultado un VEF_1 o CFV inferior al 80% de los valores previstos. Un método alternativo para medir la limitación del flujo de aire se basa en la relación entre VEF_1 y CFV (VEF_1/CFV). Individuos exentos de enfermedad se definen por tener una relación VEF_1/CFV de al menos aproximadamente 80%. La obstrucción del flujo de aire hace que la relación VEF_1/CFV descienda a menos del 80% de los valores previstos. Por lo tanto, un animal que tiene limitación del flujo de aire está definido por un VEF_1/CFV menor de aproximadamente 80%.

Tal y como se usa en este documento, reducir la hiperreactividad de las vías respiratorias se refiere a cualquier reducción medible de la hiperreactividad de las vías respiratorias y/o a cualquier reducción de la ocurrencia o la frecuencia con la que se produce hiperreactividad de las vías respiratorias en un paciente. Una reducción de AHR se puede medir usando cualquiera de las técnicas descritas anteriormente, o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica. Preferiblemente, la hiperreactividad de las vías respiratorias, o el potencial para ello, se reduce de manera óptima en una medida que el animal ya no sufre molestias y/o una función alterada da como resultado una hiperreactividad de las vías respiratorias o asociada con la misma. Evitar la hiperreactividad de las vías respiratorias se refiere a prevenir o detener la inducción de una hiperreactividad de las vías respiratorias antes de que las características biológicas de la hiperreactividad de las vías respiratorias tal y como se han descrito en este documento, se puedan detectar o medir sustancialmente en un paciente. Una vez que una o varias de las características biológicas de la hiperreactividad de las vías respiratorias se puede detectar o medir sustancialmente, se considera que ha tenido lugar el inicio agudo de una hiperreactividad de las vías respiratorias.

En una realización, la presente invención disminuye la capacidad de respuesta a metacolina en el animal. Preferiblemente, la presente invención da como resultado una mejora en el valor de $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ de un animal, de tal manera que el valor de $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ obtenido antes del uso del presente método, cuando se ha provocado al animal con una primera concentración de metacolina, es el mismo que el valor de $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ obtenido después del uso del presente método, cuando se provoca al animal con el doble de la cantidad de la primera concentración de metacolina. Preferiblemente, la presente invención da como resultado una mejora en el valor de $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ de un animal, de tal manera que el valor de $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ obtenido antes del uso del presente método, cuando el animal es provocado con entre aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 8 mg/ml de metacolina, es el mismo que el valor de $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ obtenido después de la utilización del presente método, cuando el animal es provocado con entre aproximadamente 0,02 mg/ml a aproximadamente 16 mg/ml de metacolina.

En otra realización, la presente invención mejora el VEF_1 de un animal, en al menos aproximadamente el 5%, y más preferiblemente entre aproximadamente el 6% y aproximadamente el 100%, más preferiblemente entre aproximadamente el 7% y aproximadamente el 100%, y aún más preferiblemente entre aproximadamente el 8% y aproximadamente el 100% del VEF_1 previsto del animal. En otra realización, la presente invención mejora un VEF_1 de un animal en al menos aproximadamente el 5%, y preferiblemente, en al menos aproximadamente el 10%, y aún más preferiblemente, en al menos aproximadamente el 25%, e incluso más preferiblemente, en al menos aproximadamente el 50%, e incluso más preferiblemente, en al menos aproximadamente el 75%.

En aún otra realización, la presente invención da como resultado un aumento en el $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ de un animal mediante aproximadamente una concentración doble de $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ de un animal normal. Un animal normal se refiere a un animal del que se conoce que no padece o que no es susceptible de AHR anormal. Un paciente, o un animal de ensayo, se refiere a un animal sospechoso de padecer AHR anormal o que es susceptible de la misma.

Por lo tanto, un animal que tiene hiperreactividad de las vías respiratorias es un animal en el que la hiperreactividad de las vías respiratorias se puede medir o detectar, utilizando uno de los métodos anteriores para la medición de la hiperreactividad de las vías respiratorias, en el que la hiperreactividad de las vías respiratorias se induce normalmente por la exposición a un estímulo provocador de AHR, tal como se ha descrito anteriormente. Del mismo modo, un animal que tiene una hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por alérgeno es un animal en el que la hiperreactividad de las vías respiratorias se puede medir o detectar, utilizando uno de los métodos anteriores para medir la hiperreactividad de las vías respiratorias, en el que la hiperreactividad de las vías respiratorias se induce por la exposición a un alérgeno. Para que la hiperreactividad de las vías respiratorias sea inducida por un estímulo provocador de AHR, tal como un alérgeno, la hiperreactividad de las vías respiratorias se desencadena aparente u obviamente, directa o indirectamente (por ejemplo, causada por, un síntoma de, indicativa de, simultánea a) por la exposición al estímulo. Los síntomas o las características biológicas de la AHR incluyen, pero no se limitan a, indicadores de una función respiratoria alterada (descritos con más detalle anteriormente), un cambio en la frecuencia respiratoria, sibilancia, disminución de la tolerancia al ejercicio, tos y gases sanguíneos alterados. La detección o medición de uno cualquiera o varios de estos síntomas es indicativa de la aparición de AHR aguda.

En el caso de un alérgeno, la hiperreactividad de las vías respiratorias se desencadena aparente u obviamente, directa o indirectamente por un alérgeno contra el cual un animal ha sido sensibilizado previamente. La sensibilización contra un alérgeno se refiere a haberse expuesto con anterioridad una o varias veces a un alérgeno, de tal manera que se desarrolla una respuesta inmune contra el alérgeno. Las respuestas asociadas con una reacción alérgica (por ejemplo, liberación de histaminas, rinitis, edema, vasodilatación, constricción bronquial o hiperreactividad de las vías respiratorias, inflamación de las vías respiratorias), normalmente no ocurren cuando un

individuo sin tratamiento previo se expone al alérgeno por primera vez, pero una vez que se ha producido una respuesta inmune celular y humoral contra el alérgeno, el individuo está "sensibilizado" contra el alérgeno. Las reacciones alérgicas tienen lugar a continuación cuando el individuo sensibilizado se vuelve a exponer al mismo alérgeno (por ejemplo, una exposición al alérgeno). Una vez que un individuo está sensibilizado contra un alérgeno, las reacciones alérgicas pueden llegar a ser peores con cada exposición posterior al alérgeno, debido a que cada vez que se vuelve a exponer no solo se producen síntomas alérgicos, sino que aumenta adicionalmente el nivel de anticuerpo producido contra el alérgeno y el nivel de respuesta de los linfocitos T contra el alérgeno.

Típicamente, las afecciones asociadas con respuestas alérgicas a antígenos (es decir, alérgenos) se caracterizan al menos parcialmente por inflamación de los tejidos pulmonares. Tales afecciones o enfermedades se han descrito anteriormente. Obsérvese que esta realización de la presente invención se refiere específicamente al tratamiento de AHR y, como tal, no se requiere que la afección relacionada o el factor causal que provocó la AHR, tal como una inflamación alérgica, se reduzca significativamente o se "cure", a pesar de que los efectos del presente método probablemente se extienden a la inhibición de la inflamación alérgica. La presente invención es completamente eficaz para reducir la AHR incluso después de que la respuesta inflamatoria en los pulmones de los animales está totalmente implantada. Un animal que tiene riesgo de desarrollar una hiperreactividad de las vías respiratorias, es un animal que se expone o tiene riesgo de estar expuesto a un estímulo provocador de AHR que es suficiente para desencadenar la AHR, pero todavía no muestra características o síntomas medibles o detectables de una hiperreactividad de las vías respiratorias, en donde tales síntomas se han descrito anteriormente en este documento. Un animal que tiene riesgo de desarrollar hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por alérgenos, es un animal que ha sido sensibilizado previamente contra un alérgeno, y que se ha expuesto o tiene riesgo de ser expuesto a una cantidad del alérgeno que es suficiente para desencadenar la AHR (es decir, una dosis de alérgeno desencadenante o estimulante), pero todavía no muestra características o síntomas medibles o detectables de la hiperreactividad de las vías respiratorias. Un animal que tiene riesgo de desarrollar hiperreactividad de las vías respiratorias también incluye un animal que se identifica como predispuesto o susceptible a tal afección o enfermedad.

La presente invención también puede inhibir o reducir la inflamación de las vías respiratorias en un animal. La inflamación y, en particular, la inflamación eosinofílica, es un distintivo de muchas enfermedades respiratorias, tales como el asma. La inflamación de las vías respiratorias se puede evaluar utilizando varios parámetros, que incluyen pero no están limitados a, la acumulación de células inflamatorias (por ejemplo, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos) en los pulmones, niveles alterados de diversas citocinas (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13 e IFN- γ) en el fluido del lavado broncoalveolar (BALF) y/o un cambio en la producción mucosa en los pulmones. La medición de muchos de estos parámetros se ejemplifica en los Ejemplos.

Los agentes y las formulaciones para uso en la presente invención se pueden administrar a cualquier paciente animal, y preferentemente a los seres humanos. De acuerdo con la presente invención, la administración de un agente o una formulación es útil para inhibir la AHR, la inflamación de las vías respiratorias o para el tratamiento de una enfermedad asociada con tales afecciones. Los pacientes que son candidatos adecuados para la presente invención incluyen, pero no se limitan a pacientes que tienen riesgo de tal afección o enfermedad o que tienen riesgo de desarrollarla (por ejemplo, están predispuestos). Tal y como se ha descrito anteriormente, la presente invención se dirige principalmente al tratamiento de AHR y/o de la inflamación de las vías respiratorias y, por ello, no se requiere que la afección o el factor causante que provocó la AHR o la inflamación de las vías respiratorias, o la enfermedad asociada con estas afecciones, se reduzca significativamente o se "cure", aunque los efectos del presente método probablemente se extienden a un beneficio terapéutico significativo para el paciente. Este concepto también se aplica generalmente a otras afecciones y enfermedades en las que la vía alternativa del complemento desempeña una función.

Como tal, un beneficio terapéutico no es necesariamente una cura de una enfermedad o una afección particular (incluyendo cualquier enfermedad o afección descrita en este documento), sino que preferiblemente abarca un resultado que incluye más típicamente el alivio de la enfermedad o la afección, la eliminación de la enfermedad o la afección, la reducción de un síntoma asociado con la enfermedad o la afección, la prevención o alivio de una enfermedad o una afección secundaria que da como resultado la presencia de una enfermedad o afección primarias, y/o la prevención de la enfermedad o la afección. Tal y como se usa en este documento, la frase "protegido contra una enfermedad" se refiere a la reducción de los síntomas de la enfermedad; la reducción de la aparición de la enfermedad, y/o la reducción de la gravedad de la enfermedad. La protección de un paciente se puede referir a la capacidad de una composición de la presente invención, cuando se administra a un paciente, para evitar que se produzca una enfermedad y/o para curar o aliviar los síntomas signos o causas de una enfermedad. Como tal, proteger a un paciente de una enfermedad incluye tanto la prevención de la aparición de una enfermedad (tratamiento profiláctico) como el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad (tratamiento terapéutico). Un efecto beneficioso lo puede determinar fácilmente un experto normal en la técnica y/o un médico especialista que esté tratando al paciente. El término "enfermedad" se refiere a cualquier desviación de la salud normal de un mamífero e incluye un estado en el que están presentes síntomas de la enfermedad, así como afecciones en las que ha tenido lugar una desviación (por ejemplo, infección, mutación génica, defecto genético, etc.), pero los síntomas no se manifiestan todavía.

En consecuencia, en esta memoria se describe el uso de una variedad de agentes (es decir, compuestos

reguladores) que al actuar directamente sobre una proteína en la vía alternativa del complemento, inhiben selectivamente la expresión y/o la actividad biológica de una o varias proteínas en la vía alternativa del complemento, de tal manera que se reduce la hiperreactividad de las vías respiratorias y/o la inflamación de las vías respiratorias en un animal. Los agentes útiles en la presente invención incluyen, por ejemplo, proteínas, moléculas de ácido nucleico, anticuerpos y compuestos que son productos del diseño racional de fármacos (es decir, fármacos). Tales agentes se denominan generalmente en este documento, inhibidores. De acuerdo con la presente invención, un inhibidor es cualquier agente que inhibe, ya sea mediante la inhibición directa o la inhibición competitiva, la expresión y/o la actividad biológica de una proteína (por ejemplo, una proteína en la vía alternativa del complemento), e incluye agentes que actúan sobre el factor B, el factor D o la properdina. En una realización de la presente invención, la inhibición de la vía alternativa del complemento o de una proteína de la vía alternativa del complemento se define en esta memoria como cualquier reducción medible (detectable) (es decir, disminución, regulación a la baja, inhibición) de la actividad biológica de una proteína en la vía alternativa del complemento. La actividad biológica o la acción biológica de una proteína se refiere a cualquier función mostrada o realizada por una forma natural de la proteína, tal y como se mide o se observa *in vivo* (es decir, en el entorno fisiológico natural de la proteína) o *in vitro* (es decir, en condiciones de laboratorio). Por ejemplo, una actividad biológica del factor B puede incluir, pero no se limita a, la unión a C3 activado, la solubilización de complejos inmunes, la actividad del factor de crecimiento de linfocitos B y la activación de monocitos. De acuerdo con la presente invención, la actividad biológica de una proteína se puede inhibir mediante la prevención o la inhibición directa (reducción, disminución) de la capacidad de la proteína para unirse y/o activar otra proteína (por ejemplo, C3), inhibiendo de ese modo los eventos aguas abajo que son el resultado de tal unión. Preferiblemente, la actividad biológica de la vía alternativa del complemento se inhibe administrando un agente que inhibe al menos una proteína en la vía, incluyendo tal agente, pero no limitado a, un agente que se une a una proteína en la vía o que compite con la proteína en la vía, de manera que la capacidad de la proteína para unirse y/o activar otra proteína está inhibida o impedida. Tal agente incluye, pero no se limita a, antagonistas de la proteína, anticuerpos (incluyendo fragmentos de los mismos que se unen a antígeno), otros polipéptidos que se unen a antígeno y moléculas pequeñas (por ejemplo, compuestos sintéticos o fármacos).

Un agente útil en la presente invención es un antagonista de la vía alternativa del complemento, que incluye un antagonista de una proteína dentro de esta vía. De acuerdo con la presente invención, un "antagonista" se refiere a cualquier compuesto que inhibe (por ejemplo, antagoniza, reduce, disminuye, bloquea, invierte o altera) el efecto de una proteína dada. Más particularmente, un antagonista es capaz de actuar de una manera relacionada con la actividad de la proteína dada, de tal manera que la actividad biológica de la proteína dada, se reduce o se bloquea de una forma antagonista (por ejemplo, contra, la inversa de, al contrario de) de la acción natural de la proteína dada. Los antagonistas pueden incluir, pero no se limitan a, un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno, una proteína, un péptido, un ácido nucleico (incluyendo ribozimas y no codificante), o un producto del diseño o la selección de fármaco/compuesto/péptido que proporciona el efecto antagonista. Por ejemplo, en esta memoria se describen antagonistas de las proteínas naturales, factor B, factor de D o properdina, incluyendo antagonistas de anticuerpos, antagonistas de proteína/péptido, antagonistas de ácido nucleico o antagonistas de moléculas pequeñas (por ejemplo, un inhibidor de molécula pequeña).

El agente utilizado para inhibir una proteína de la vía alternativa del complemento es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno. En un aspecto, el anticuerpo se une selectivamente a la proteína de la vía alternativa del complemento de una manera tal, que la proteína se inhibe o se impide que se una a otra proteína con la que interacciona normalmente (en condiciones naturales o fisiológicas). En otro aspecto, el anticuerpo se une selectivamente a la proteína de tal manera, que la proteína se inhibe o se impide que active otra proteína con la que normalmente interacciona, a pesar de que la proteína puede estar unida, al menos parcialmente, a la otra proteína. Los anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a antígeno para uso en la inhibición selectiva de la vía alternativa del complemento, se han descrito anteriormente con detalle (los anticuerpos del factor B descritos en este documento y, en particular, el anticuerpo AcM 1379 descrito con detalle en este documento).

Preferiblemente, un antígeno o un fragmento del mismo que se une a antígeno, útil en la presente invención se une al factor B. Los anticuerpos (y fragmentos de los mismos que se unen a antígeno) que se unen selectivamente al factor B e inhiben la vía alternativa del complemento de acuerdo con la invención, se describen y se ejemplifican con detalle en esta memoria. En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno, se une a una superficie de unión conservada o a un epítipo de una proteína tal, que se conserva entre las especies animales y particularmente las especies de mamíferos (es decir, el anticuerpo tiene una reacción cruzada con la proteína procedente de dos o más especies de mamíferos diferentes). En particular, la presente invención incluye un anticuerpo que se une a una proteína en la vía alternativa del complemento, procedente de al menos dos especies de mamíferos diferentes y preferentemente de varias especies, incluyendo pero no limitadas a, ser humano, primate no humano, ratón, rata, cerdo, caballo y conejo.

En esta memoria se describen polipéptidos que no son anticuerpos, a veces denominados ligandos de antígeno o polipéptidos que se unen a antígeno, que se han diseñado para unirse selectivamente y causar la neutralización o inhibición de una proteína de acuerdo con la presente invención. Ejemplos del diseño de tales polipéptidos que poseen una especificidad de ligando prescrita, se proporcionan en Beste et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:1898-1903, 1999).

En esta memoria se describen además de los anticuerpos, fragmentos de los mismos que se unen a antígeno y polipéptidos que se unen a antígeno, otros agentes que inhiben una proteína en la vía alternativa del complemento. Tales agentes incluyen, por ejemplo, compuestos que son productos del diseño racional de fármacos, productos naturales y compuestos que tienen propiedades reguladoras definidas parcialmente. Un agente regulador, que incluye un antagonista de una proteína dada, puede ser un compuesto a base de proteínas, un compuesto a base de carbohidratos, un compuesto a base de lípidos, un compuesto a base de ácidos nucleicos, un compuesto orgánico natural, un compuesto orgánico obtenido sintéticamente, un anticuerpo o fragmentos de los mismos. Tales agentes reguladores incluyen fármacos, incluyendo péptidos, oligonucleótidos, hidratos de carbono y/o moléculas orgánicas sintéticas que regulan la producción y/o la función de una o varias proteínas en la vía alternativa del complemento. Tal agente se puede obtener, por ejemplo, a partir de estrategias de diversidad molecular (una combinación de estrategias relacionadas que permiten la rápida construcción de grandes bancos de moléculas químicamente diversas), bancos de compuestos naturales o sintéticos, en particular, procedentes de genotecas combinatorias o químicas (es decir, genotecas de compuestos que difieren en la secuencia o el tamaño, pero que tienen los mismos bloques estructurales) o mediante el diseño racional de fármacos. Véase, por ejemplo, Maulik et al., 1997, *Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies*, Wiley-Liss, Inc.

En una estrategia de diversidad molecular, se sintetizan bancos de compuestos de gran tamaño, por ejemplo, de péptidos, oligonucleótidos, hidratos de carbono y/o moléculas orgánicas sintéticas, utilizando métodos biológicos, enzimáticos y/o químicos. Los parámetros decisivos en el desarrollo de una estrategia de diversidad molecular incluyen la diversidad de subunidades, el tamaño molecular y la diversidad del banco. El objetivo general del escrutinio de tales bancos es utilizar una aplicación secuencial de una selección combinatoria para obtener ligandos de alta afinidad hacia a una diana deseada, y luego optimizar las moléculas guía mediante estrategias de diseño al azar o dirigidas. Los métodos de diversidad molecular se describen con detalle en Maulik, et al., *supra*.

En un procedimiento de diseño racional de fármacos, la estructura tridimensional de un compuesto regulador se puede analizar, por ejemplo, mediante resonancia magnética nuclear (RMN) o cristalografía con rayos-X. Esta estructura tridimensional se puede utilizar después para predecir estructuras de compuestos potenciales, tales como agentes reguladores potenciales, por ejemplo, mediante la creación de modelos por ordenador. La estructura prevista del compuesto, se puede utilizar para optimizar los compuestos guía obtenidos, por ejemplo, por métodos de diversidad molecular. Además, la estructura prevista del compuesto se puede producir, por ejemplo, mediante síntesis química, tecnología de ADN recombinante o aislando un mimotopo a partir de una fuente natural (por ejemplo, plantas, animales, bacterias y hongos).

Varios otros métodos de diseño de fármacos basados en la estructura se describen en Maulik et al., 1997, *supra*. Maulik et al. describen, por ejemplo, métodos de diseño dirigido, en los que el usuario dirige el proceso de creación de moléculas nuevas a partir de un banco de fragmentos seleccionados de manera apropiada; el diseño al azar, en el que el usuario utiliza un algoritmo genético o de otro tipo para mutar aleatoriamente fragmentos y sus combinaciones, mientras que se aplica simultáneamente un criterio de selección para evaluar la aptitud de los ligandos candidatos; y un método basado en una cuadrícula en la que el usuario calcula la energía de la interacción entre las estructuras tridimensionales del receptor y sondas de pequeños fragmentos, seguido por el enlace entre sí de sitios de sondas favorables.

Una molécula de ácido nucleico aislada que es útil como un agente para inhibir una proteína en la vía alternativa del complemento, es una molécula de ácido nucleico no codificante, una ribozima o un ARNsi. Tal y como se usa en este documento, una molécula de ácido nucleico no codificante se define como una molécula aislada de ácido nucleico que reduce la expresión de una proteína mediante la hibridación, en condiciones muy rigurosas, con un gen que codifica la proteína. Tal molécula de ácido nucleico es suficientemente similar al gen que codifica la proteína que la molécula es capaz de hibridarse en condiciones muy rigurosas con la hebra codificante o la cadena complementaria del gen o del ARN que codifica la proteína natural. La interferencia de ARN (ARNi) es un procedimiento por el cual un ARN bicatenario y, en sistemas de mamíferos, un ARN de interferencia corto (ARNsi), se utiliza para inhibir o silenciar la expresión de genes complementarios. En la célula diana, el ARNsi está desenrollado y se asocia con un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que es guiado a continuación a las secuencias de ARNm que son complementarias al ARNsi, en donde el RISC escinde el ARNm. Una ribozima es un segmento de ARN que actúa uniéndose al resto de ARN diana y lo inactiva escindiendo la cadena principal de fosfodiéster en un sitio de corte específico.

Un gen incluye regiones reguladoras que controlan la producción de la proteína codificada por ese gen (tal como, pero no limitado a las regiones de control de la transcripción, traducción o post-traducción), así como la región codificadora misma. Los genes que codifican diversas proteínas de la vía alternativa del complemento, incluyendo el factor B, el factor D o la properdina, han sido identificados y son conocidos en la técnica. Una molécula aislada de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que se ha retirado de su medio natural (es decir, que se ha sometido a manipulación humana) y puede incluir ADN, ARN o derivados de ADN o ARN. Como tal, "aislada", no refleja el grado de pureza de la molécula de ácido nucleico. Una molécula aislada de ácido nucleico de la presente invención se puede aislar a partir de su fuente natural o se puede producir utilizando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación, clonación) o síntesis química.

Tal y como se usa en este documento, la referencia a las condiciones de hibridación se refiere a condiciones de

hibridación convencionales en las que se utilizan moléculas de ácido nucleico para identificar moléculas de ácido nucleico similares. Tales condiciones convencionales se describen, por ejemplo, en Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989 (véase específicamente, las páginas 9.31-9.62). Además, se describen fórmulas para calcular la hibridación apropiada y las condiciones de lavado para conseguir una hibridación que permita diferentes grados de desemparejamiento de nucleótidos, por ejemplo, en Meinkoth et al., 1984, *Anal. Biochem.* 138, 267-284.

Lesión por isquemia-reperfusión

Aún otra realización de la presente invención se refiere al descubrimiento de los inventores de que la inhibición del factor B, por ejemplo, usando los anticuerpos anti-factor B o fragmentos de los mismos que se unen a antígeno descritos en este documento, también inhibe la lesión por isquemia-reperfusión. Esto se demostró en un modelo de lesión renal por isquemia-reperfusión. Por lo tanto, las composiciones de la presente invención también tienen utilidad terapéutica en unas afecciones relacionadas con la lesión por isquemia-reperfusión y, en un aspecto de la invención, la lesión renal por isquemia-reperfusión. Otros tipos de lesión por isquemia-reperfusión que se pueden evitar o reducir incluyen, pero no se limitan a la lesión cardíaca por isquemia-reperfusión, lesión del sistema nervioso central por isquemia-reperfusión, lesión de las extremidades o dedos por isquemia-reperfusión, lesión de los órganos internos tales como el pulmón, el hígado o el intestino por isquemia-reperfusión o lesión de cualquier órgano o tejido trasplantado por isquemia-reperfusión.

En esta memoria se describe una etapa de inhibición selectiva de la vía alternativa del complemento en un animal que padece isquemia-reperfusión o que tiene riesgo de experimentarla o desarrollarla. Preferiblemente, se evita o se inhibe al menos un síntoma o un tipo de lesión debida a la isquemia-reperfusión. La lesión por isquemia-reperfusión puede causar aumentos en la producción o en la oxidación de diversos compuestos potencialmente dañinos, producidos por células y tejidos, los cuales pueden conducir a un daño oxidativo a o la muerte de las células y los tejidos. Por ejemplo, la lesión renal por isquemia-reperfusión puede dar como resultado un deterioro histológico de los riñones, incluyendo lesiones tubulares en el riñón y cambios característicos de la necrosis tubular aguda. La disfunción renal resultante permite la acumulación de desechos nitrogenados normalmente excretados por el riñón, como el nitrógeno ureico sérico (SUN). La isquemia-reperfusión también puede causar lesiones en órganos alejados, tales como el pulmón. El método utiliza preferiblemente los nuevos anticuerpos del factor B de la presente invención, tal y como se han descrito con detalle anteriormente, los cuales, cuando se administran a un animal que tiene isquemia-reperfusión o tiene riesgo de experimentarla o desarrollarla, se evita, reduce o inhibe al menos un síntoma de la lesión por isquemia-reperfusión. Cualquiera de los anticuerpos del factor B de la presente invención tal y como se describen en este documento, o fragmentos de los mismos que se unen a antígeno, son útiles en esta realización de la invención. Una descripción de las dosis, las vías de administración preferidas y las composiciones y formulaciones que comprenden tales anticuerpos y reactivos relacionados, se proporciona en este documento y está incluida en esta realización.

Obsérvese que esta realización de la presente invención se refiere específicamente al tratamiento de la lesión por isquemia-reperfusión y, como tal, no se requiere que la afección relacionada o el factor causante que provocó la lesión por isquemia-reperfusión se reduzcan significativamente o se "curen". La presente invención es totalmente eficaz para evitar o reducir el daño o la lesión asociados con la isquemia-reperfusión o para mejorar o reducir al menos un síntoma de dicha lesión. Por lo tanto, la administración de un agente o una formulación descrita en este documento es útil para la prevención o la inhibición de la lesión por isquemia-reperfusión, aunque no se requiere que una lesión de este tipo se evite completamente, pero se prefiere que el paciente experimente al menos un beneficio terapéutico procedente del uso del agente o formulación.

Formulaciones, composiciones y métodos relacionados con las realizaciones de la invención

En esta memoria se describe una formulación o composición que comprende un inhibidor de la vía alternativa del complemento y, en particular, un inhibidor selectivo de la vía alternativa del complemento tal y como se describe en este documento. Las formulaciones o composiciones se pueden utilizar en cualquiera de los métodos descritos en este documento y con cualquiera de los reactivos descritos en este documento (por ejemplo, los nuevos anticuerpos del factor B descritos en este documento). En una realización, la composición es útil para reducir o evitar la hiperreactividad de las vías respiratorias en un animal. En otra realización, la composición es útil para reducir o evitar la lesión por isquemia-reperfusión en un animal. En aún otra realización, la composición es útil para tratar o evitar una afección o enfermedad mediante la inhibición selectiva de la vía alternativa del complemento. La formulación comprende: (a) un inhibidor de la vía alternativa del complemento tal y como se describe en este documento; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la formulación o composición puede incluir uno o varios agentes adicionales, tales como un agente antiinflamatorio adecuado para reducir la inflamación en un animal que tiene hiperreactividad de las vías respiratorias o tiene riesgo de desarrollarla y, en particular, hiperreactividad de las vías respiratorias que está asociada con inflamación. El agente antiinflamatorio puede ser cualquier agente antiinflamatorio, que sea adecuado para uso en la reducción de la inflamación en un paciente que tiene una afección inflamatoria asociada con hiperreactividad de las vías respiratorias, incluyendo pero sin estar limitado a: corticosteroides (orales, inhalados e inyectados), β -agonistas (de acción prolongada o corta), modificadores de leucotrienos (inhibidores o antagonistas

de los receptores), antagonistas de citocinas o del receptor de citocinas, anti-IgE, inhibidores de fosfodiesterasa, cromoglicato de sodio, nedocromil, teofilina e inhibidores de la función de linfocitos T. Los agentes antiinflamatorios particularmente preferidos para uso en la presente formulación incluyen corticosteroides, modificadores de leucotrienos y antagonistas de citocinas o de receptores de citocinas.

- 5 En otra realización, la formulación o composición puede incluir uno o varios agentes adicionales, tales como un agente adicional adecuado para prevenir o reducir la lesión por isquemia-reperfusión en un animal. Tales agentes incluyen pero no se limitan a, agentes antiinflamatorios; o inhibidores de la lesión por oxidación y por radicales libres.

10 En otra realización, la formulación o composición puede incluir uno o varios agentes adicionales, tales como un agente adicional adecuado para el tratamiento de otra enfermedad o afección asociada con la activación de la vía alternativa del complemento.

15 De acuerdo con la presente invención, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye excipientes farmacéuticamente aceptables y/o vehículos de administración farmacéuticamente aceptables, que son adecuados para uso en la administración de una formulación o composición en un sitio *in vivo* adecuado. Un sitio *in vivo* adecuado es preferiblemente cualquier sitio en el que se puede inhibir la vía alternativa del complemento. En una realización preferida, cuando el paciente tiene hipersensibilidad de las vías respiratorias y/o inflamación de las vías respiratorias o tiene riesgo de desarrollarla, un sitio *in vivo* adecuado es preferiblemente el tejido pulmonar o las vías respiratorias. Otros sitios preferidos *in vivo* incluyen otros tejidos u órganos, en donde se pueden centrar afecciones asociadas con la vía alternativa del complemento. En otra realización preferida, un sitio *in vivo* adecuado es cualquier sitio en el que se produce la lesión por isquemia-reperfusión, como en el corazón o el sistema pulmonar, el sistema nervioso central, las extremidades o dedos, los órganos internos (por ejemplo, pulmón, hígado o intestino) o en cualquier órgano o tejido trasplantado. Los vehículos farmacéuticamente aceptables preferidos son capaces de mantener un agente utilizado en una formulación de la invención, de forma que cuando el agente llega en el sitio diana en un paciente, el agente es capaz de actuar sobre su diana (por ejemplo, una proteína que es un componente de la vía alternativa del complemento), lo que produce preferentemente un beneficio terapéutico para el paciente.

20 Los excipientes adecuados de la presente invención incluyen excipientes o medicamentos disponibles que transportan o ayudan al transporte, pero no dirigen específicamente una composición a una célula o tejido (también denominados en este documento como vehículos no dirigidos). Ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen pero no se limitan a agua, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución de dextrosa, soluciones que contienen suero, solución de Hank, otras soluciones acuosas fisiológicamente equilibradas, aceites, ésteres y glicoles. Los vehículos acuosos pueden contener sustancias auxiliares adecuadas, necesarias para aproximarse a las condiciones fisiológicas del receptor, por ejemplo, mejorando la estabilidad química y la isotonicidad. Las sustancias auxiliares adecuadas incluyen, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, lactato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y otras sustancias usadas para producir tampón fosfato, tampón Tris y tampón bicarbonato. Las sustancias auxiliares también pueden incluir conservantes, tales como timerosal, m-cresol u o-cresol, formalina y alcohol benzol. Las formulaciones de la presente invención se pueden esterilizar por métodos convencionales y/o liofilizarse.

30 Un tipo de vehículo farmacéuticamente aceptable incluye una formulación de liberación controlada que es capaz de liberar lentamente una composición de la presente invención en un animal. Tal y como se emplea en este documento, una formulación de liberación controlada comprende un agente de la presente invención en un vehículo de liberación controlada. Los vehículos de liberación controlada adecuados incluyen pero no se limitan a, polímeros biocompatibles, otras matrices poliméricas, cápsulas, microcápsulas, micropartículas, preparaciones de bolo, bombas osmóticas, dispositivos de difusión, liposomas, lipoesferas y sistemas de administración transdérmica. Otros vehículos adecuados incluyen cualquier vehículo que se puede unir o incorporar al agente, de modo que alarga la semivida del agente que se va a administrar. Un vehículo de este tipo puede incluir cualquier proteína portadora adecuada o incluso un segmento de fusión que alarga la semivida de una proteína cuando se administra *in vivo*. Los vehículos de administración adecuados se han descrito previamente en este documento, e incluyen pero no se limitan a liposomas, vectores víricos u otros vehículos de administración, que incluyen las ribozimas. Los vehículos de administración que contienen lípidos naturales incluyen células y membranas celulares. Los vehículos de administración que contienen lípidos artificiales incluyen liposomas y micelas. Tal y como se ha descrito anteriormente, un vehículo de administración de la presente invención se puede modificar para dirigirlo a un sitio particular en un paciente, dirigiendo a la diana y haciendo uso de este modo de un agente inhibidor en ese sitio. Las modificaciones adecuadas incluyen manipular la fórmula química de la porción lipídica del vehículo de administración y/o introducir en el vehículo un agente que se dirige a la diana capaz de dirigir específicamente un vehículo de administración a un lugar preferido, por ejemplo, un tipo de célula preferida. Otros vehículos de administración adecuados incluyen partículas de oro, conjugados de poli-L-lisina/ADN-molecular y cromosomas artificiales.

60 En una realización, un agente útil en los presentes métodos se administra en una formulación adecuada para la administración pulmonar o nasal, y en particular, la administración en aerosol, también denominada en este documento una formulación en aerosol. Dicha vía de administración es particularmente útil en el método para prevenir o inhibir la AHR y/o la inflamación de las vías respiratorias de un paciente, pero se puede utilizar en otras

afecciones, cuando se desea la administración al pulmón o a las vías respiratorias. Además, estas formulaciones son particularmente útiles para la administración de anticuerpos. Una formulación de este tipo incluye por lo general un vehículo y, preferiblemente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos que son particularmente útiles para la administración en aerosol de acuerdo con la presente invención, incluyen pero no se limitan a: etanol anhidro; polvos secos dispersables; cápsulas pequeñas (por ejemplo, microcápsulas o micropartículas); liposomas; excipientes inyectables; y aerosoles nebulizados. El etanol anhidro para la administración de proteínas y péptidos se describe, por ejemplo, en Choi et al., 2001, *PNAS USA* 98(20):11103-11107. Los polvos secos dispersables adecuados para la administración en aerosol de los agentes se describen con detalle, por ejemplo, en el documento de Patente de EE.UU. n° 6.165.463. (Véanse también los productos de Inhale Therapeutic Systems, Inc., ahora Nektar, y Quadrant Technology). Los liposomas adecuados para uso en aerosoles incluyen cualquier liposoma y, en particular, cualquier liposoma que sea suficientemente pequeño para ser administrado en aerosol en el método de la invención. Las microcápsulas y las micropartículas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, Alliance Pharmaceutical Corporation cuenta con una tecnología de ingeniería de partículas, denominada *PulmoSphere*, preparadas por un procedimiento registrado de secado por pulverización y están diseñadas para ser huecas y porosas. Un producto de *Ventolin* consiste en partículas de albuterol micronizado (base libre), suspendidas en una mezcla de propelentes a base de CFC. *Proventil HFA* contiene sulfato de albuterol micronizado y un pequeño porcentaje de un codisolvente de etanol para estabilizar el tensioactivo de ácido oleico. La incorporación de fármacos dentro de liposomas tiene varias ventajas para la administración en aerosol. Ya que los liposomas son relativamente insolubles, el tiempo de retención de algunos fármacos en el pulmón se puede prolongar para aumentar la eficacia. Los liposomas también son absorbidos principalmente por las células fagocíticas, lo que les vuelve particularmente adecuados para la administración de ciertos fármacos. Las formulaciones nebulizadas se describen en los Ejemplos. Los dispositivos para la entrega de formulaciones en aerosol incluyen pero no se limitan a, inhaladores presurizados de dosis medida (MDI), inhaladores de polvo seco (DPI), dispositivos de solución medida (MSI) e inhaladores por ultrasonidos, e incluyen dispositivos que son nebulizadores e inhaladores. Se pueden utilizar diversos agentes en las formulaciones administradas por tales dispositivos en forma de ayudas para la suspensión y solubilizantes que son particularmente útiles para la administración de proteínas (por ejemplo, ácido oligoláctico, ácido acil-amida y M-PEGS monofuncionalizados; véase, McKenzie y Oliver; 2000; "Formulating Therapeutic Proteins and Peptides in Pressurized Metered Dose Inhalers For Pulmonary Delivery", 3M Health Care Ltd., Morley Street, Loughborough, Leicestershire LE11 1EP, Reino Unido).

Un vehículo farmacéuticamente aceptable que es capaz de dirigirse a una diana se denomina en este documento un "vehículo de entrega dirigido". Los vehículos de entrega dirigidos de la presente invención son capaces de entregar una formulación, que incluye un agente inhibidor, en un sitio diana en un paciente. Un "sitio diana" se refiere a un sitio en un paciente al que se desea administrar una formulación terapéutica. Por ejemplo, un sitio diana puede ser cualquier célula o tejido al que está dirigido un anticuerpo de la presente invención, o mediante inyección directa o la administración usando liposomas, vectores víricos u otros vehículos de entrega, incluyendo las ribozimas. Un vehículo de entrega o un anticuerpo de la presente invención se puede modificar para dirigirlo a un sitio particular en un animal, dirigiéndolo de este modo a una diana y haciendo uso de un compuesto particular, anticuerpo, proteína o molécula de ácido nucleico en ese sitio. Las modificaciones adecuadas incluyen la manipulación de la fórmula química de la porción lipídica de un vehículo de entrega y/o la introducción en el vehículo de un compuesto capaz de dirigir específicamente un vehículo de entrega a un lugar preferido, por ejemplo, una célula o un tipo de tejido preferido. Específicamente, dirigir a una diana se refiere a provocar que un vehículo de entrega se una a una célula particular, mediante la interacción del compuesto en el vehículo con una molécula en la superficie de la célula. Los compuestos que se dirigen a una diana adecuados incluyen ligandos capaces de unirse selectivamente (es decir, específicamente) a otra molécula en un sitio particular. Ejemplos de tales ligandos incluyen anticuerpos, antígenos, receptores y ligandos de receptores. Ejemplos particularmente útiles incluyen cualquier ligando que está asociado con la vía del complemento (por ejemplo, CR2, C3, C3d, C3dg, iC3b, C3b) o cualquier ligando que está asociado con el tipo de célula, tipo de tejido o el sitio en el animal que se va a tratar. La manipulación de la fórmula química de la porción lipídica del vehículo de entrega puede modular la orientación extracelular o intracelular hacia la diana del vehículo de entrega. Por ejemplo, una sustancia química se puede añadir a la fórmula lipídica de un liposoma lo que altera la carga de la bicapa lipídica del liposoma, de manera que el liposoma se fusiona con células particulares que tienen características de carga particulares.

Un vehículo de entrega útil para una variedad de vías de administración y agentes es un liposoma. Un liposoma es capaz de permanecer estable en un animal durante el tiempo suficiente para entregar una molécula de ácido nucleico, o incluso una proteína o un anticuerpo, tal y como se describe en la presente invención, en un sitio preferido en el animal. Un liposoma, de acuerdo con la presente invención, comprende una composición lipídica que es capaz de entregar una molécula de ácido nucleico descrita en la presente invención a un sitio particular o seleccionado, en un animal. Un liposoma de acuerdo con la presente invención comprende una composición lipídica que es capaz de fusionarse con la membrana plasmática de la célula diana para entregar una molécula de ácido nucleico en una célula. Los liposomas adecuados para uso en la presente invención incluyen cualquier liposoma. Los liposomas preferidos de la presente invención incluyen aquellos liposomas usados típicamente, por ejemplo, en métodos de entrega de genes, conocidos por los expertos en la técnica. Los liposomas más preferidos comprenden liposomas que tienen una composición lipídica policatiónica y/o liposomas que tienen un esqueleto de colesterol conjugado con polietilenglicol. La formación de un complejo a base de un liposoma con una molécula de ácido nucleico o un agente inhibidor de la presente invención, se puede lograr usando métodos convencionales en la

técnica.

Otro vehículo de entrega comprende un vector vírico. Un vector vírico que incluye una molécula de ácido nucleico aislada, útil en el método de la presente invención, en donde las moléculas de ácido nucleico se empaquetan en una cubierta vírica que permite la entrada de ADN en una célula. Se puede utilizar una variedad de vectores víricos, incluyendo, pero no limitado a, los basados en alfavirus, poxvirus, adenovirus, herpesvirus, lentivirus, virus adenoasociados y retrovirus.

De acuerdo con la presente invención, la determinación de protocolos aceptables para administrar un agente, composición o formulación, que incluyen la vía de administración y la cantidad eficaz de un agente que se va a administrar a un animal, la pueden realizar los expertos en la técnica. Un agente de la presente invención se puede administrar *in vivo* o *ex vivo*. Las rutas de administración adecuadas *in vivo* pueden incluir, pero no están limitadas a, las vías oral, nasal, inhalada, tópica, intratraqueal, transdérmica, rectal y parenteral. Las rutas parenterales preferidas pueden incluir pero no se limitan a las rutas subcutánea, intradérmica, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal. Las rutas tópicas preferidas incluyen la inhalación con aerosol (es decir, pulverización) o la administración superficial tópica en la piel de un animal. Preferiblemente, un agente se administra por las rutas nasal, inhalada, intratraqueal, tópica o sistémica (por ejemplo, intraperitoneal, intravenosa). *Ex vivo* se refiere a la realización de parte de la etapa de la administración fuera del paciente. Las vías preferidas de administración de anticuerpos incluyen las rutas parenterales y las rutas en aerosol/nasal/inhalada.

Las administraciones intravenosa, intraperitoneal e intramuscular se pueden realizar utilizando métodos convencionales en la técnica. La administración en aerosol (inhalación) se puede realizar utilizando métodos convencionales en la técnica (véase, por ejemplo, Stribling y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **189**:11277-11281,1992. Los vehículos adecuados para la administración en aerosol se han descrito anteriormente. Los dispositivos para la administración de formulaciones en aerosol incluyen pero no se limitan a inhaladores presurizados de dosis medida (MDI), inhaladores de polvo seco (DPI) y dispositivos de solución medida (MSI), e incluyen dispositivos que son nebulizadores e inhaladores. La administración oral se puede realizar formando complejos de una composición terapéutica de la presente invención con un vehículo capaz de resistir la degradación con enzimas digestivas en el intestino de un animal. Ejemplos de tales vehículos incluyen, cápsulas o comprimidos de plástico, tales como los conocidos en la técnica. Las técnicas de inyección directa son particularmente útiles para la administración de una molécula de ácido nucleico recombinante a una célula o tejido que es accesible por medio de cirugía, y en particular, en la superficie del cuerpo o cerca de la misma. La administración de una composición a nivel local dentro del área de una célula diana, se refiere a inyectar la composición a centímetros y preferiblemente, a milímetros de la célula o tejido diana.

Varios métodos de administración y vehículos de entrega descritos en este documento han mostrado ser eficaces para la entrega de una molécula de ácido nucleico a una célula o un tejido diana, transfectando la molécula de ácido nucleico a la célula y expresándose. En muchos estudios, la administración y expresión satisfactorias de un gen heterólogo se logró en tipos de células preferidas y/o empleando vehículos de entrega preferidos y vías de administración de la presente invención. Por ejemplo, utilizando la entrega de liposomas, documento de patente de EE.UU. nº 5.705.151, publicado el 6 de enero de 1998, de Dow et al., se mostraba el éxito de la administración intravenosa *in vivo* de una molécula de ácido nucleico que codificaba un superantígeno y una molécula de ácido nucleico que codificaba una citocina en un vehículo de entrega de liposoma catiónico, en donde las proteínas codificadas se expresaban en tejidos del animal y, en particular, en los tejidos pulmonares. Liu et al., 1997 mostraron que la entrega intravenosa de liposomas catiónicos que contienen colesterol que contienen genes, se dirige preferentemente a los tejidos pulmonares y media eficazmente en la transferencia y la expresión de los genes *in vivo*. La entrega de numerosas secuencias de ácido nucleico se ha logrado administrando vectores víricos que codifican las secuencias de ácido nucleico.

Una dosis única preferida de un agente que incluye proteínas, moléculas pequeñas y anticuerpos, para uso en cualquier método descrito en este documento, comprende entre aproximadamente 0,01 microgramos x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 10 miligramos x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal. Una sola dosis más preferida de un agente comprende entre aproximadamente 1 microgramo x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 10 miligramos x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal. Una dosis única aún más preferida de un agente comprende entre aproximadamente 5 microgramos x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 7 miligramos x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal. Una dosis única aún más preferida de un agente comprende entre aproximadamente 10 microgramos x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 5 miligramos x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal. Una dosis única particularmente preferida de un agente comprende entre aproximadamente 0,1 miligramo x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 5 miligramos x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal, si el agente se administra en aerosol. Otra dosis única particularmente preferida de un agente comprende entre aproximadamente 0,1 microgramos x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 10 microgramos x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal, si el agente se administra parenteralmente.

En una realización, una dosis única adecuada de un complejo de ácido nucleico:liposoma de la presente invención es desde aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 100 µg por kg de peso corporal del paciente al que se administra el complejo. En otra realización, una dosis única adecuada es desde aproximadamente 1 µg hasta aproximadamente 10 µg por kg de peso corporal. En otra realización, una sola dosis apropiada de complejo ácido

nucleico:lípido es de al menos aproximadamente 0,1 µg de ácido nucleico, más preferiblemente al menos aproximadamente 1 µg de ácido nucleico, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 10 µg de ácido nucleico, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 50 µg de ácido nucleico, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 100 µg de ácido nucleico.

- 5 En una realización, una dosis adecuada de un agente de la presente invención para uso en cualquier método descrito en este documento, es una dosis eficaz para inhibir la expresión o la actividad de al menos una proteína en la vía alternativa del complemento tal y como se describe en esta memoria (por ejemplo, factor B, factor de D o properdina), en comparación con la ausencia de administración del agente. Los métodos para medir la expresión o la actividad biológica de una proteína se han descrito anteriormente. En otra realización, una dosis adecuada de un agente de la presente invención, es una dosis que inhibe de forma medible la vía alternativa del complemento de la invención. La activación del complemento y su inhibición se puede medir usando técnicas/ensayos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede realizar un análisis *in vitro* de la deposición de C3 sobre partículas de zimosano A, tal y como se describe en los ejemplos. También se puede someter a ensayo la capacidad del agente para inhibir la lisis de eritrocitos no sensibilizados con suero humano. La extrapolación de los resultados *in vitro* a dosificaciones *in vivo*, basándose en estos ensayos, está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

En los seres humanos, se conoce en la técnica que usando métodos convencionales para la administración en aerosol, solo aproximadamente el 10% de la solución administrada entra típicamente en las vías respiratorias profundas, incluso empleando un inhalador. Si la administración en aerosol es por inhalación directa, se puede asumir una dosificación de aproximadamente el 10% de la administrada por métodos de nebulización. Por último, un experto en la técnica será capaz con facilidad de convertir una dosificación de ratón a una dosificación humana utilizando una escala alométrica. Esencialmente, una escala de dosificación de ratón a humano se basa en la tasa de aclaramiento de un compuesto y en la superficie corporal del ratón. La conversión para mg/kg es 1/12° del "nivel sin efecto adverso observado" (NOEL) para obtener la concentración de la dosificación humana. Este cálculo asume que la eliminación entre ratón y ser humano es la misma, lo que se cree que es el caso para los anticuerpos.

Por consiguiente, una dosis única preferida de un anticuerpo comprende entre aproximadamente 1 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente menos de 1 mg x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal. Una sola dosis más preferida de un anticuerpo comprende entre aproximadamente 20 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 600 µg x kilogramo⁻¹ de peso corporal del animal. Una dosis única aún más preferida de un anticuerpo, particularmente cuando la formulación del anticuerpo es administrada por nebulización, comprende entre aproximadamente 20 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 600 µg x kilogramo⁻¹ de peso corporal del animal, y más preferiblemente, entre aproximadamente 20 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 500 µg x kilogramo⁻¹, y más preferiblemente, entre aproximadamente 20 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 400 µg x kilogramo⁻¹, y más preferiblemente, entre aproximadamente 20 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 300 µg x kilogramo⁻¹, y más preferiblemente, entre aproximadamente 20 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 200 µg x kilogramo⁻¹, y más preferiblemente, entre aproximadamente 20 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 100 µg x kilogramo⁻¹, y más preferiblemente, entre aproximadamente 20 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 50 µg x kilogramo⁻¹ de peso corporal del animal.

Otra dosis única preferida de un anticuerpo, particularmente cuando la formulación del anticuerpo se administra por nebulización, comprende entre aproximadamente 200 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 600 µg x kilogramo⁻¹ de peso corporal del animal, y más preferiblemente, entre aproximadamente 200 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 500 µg x kilogramo⁻¹, y más preferiblemente, entre aproximadamente 200 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 400 µg x kilogramo⁻¹, y más preferiblemente, entre aproximadamente 200 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 300 µg x kilogramo⁻¹, y más preferiblemente, entre aproximadamente 200 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 200 µg x kilogramo⁻¹, y más preferiblemente, entre aproximadamente 200 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 100 µg x kilogramo⁻¹, y más preferiblemente, entre aproximadamente 200 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 50 µg x kilogramo⁻¹ de peso corporal del animal.

Otra dosis única preferida de un anticuerpo, particularmente cuando la formulación del anticuerpo se administra por inhalación directa a partir de un inhalador, comprende entre aproximadamente 2 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 100 µg x kilogramo⁻¹ de peso corporal del animal, y más preferiblemente, entre aproximadamente 2 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 50 µg x kilogramo⁻¹, y más preferiblemente, entre aproximadamente 2 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 10 µg x kilogramo⁻¹, y más preferiblemente, entre aproximadamente 2 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 5 µg x kilogramo⁻¹, y más preferiblemente, entre aproximadamente 2 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 1 µg x kilogramo⁻¹, y más preferiblemente, entre aproximadamente 2 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 0,5 µg x kilogramo⁻¹, y más preferiblemente, entre aproximadamente 2 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 0,25 µg x kilogramo⁻¹, y más preferiblemente, entre aproximadamente 2 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 0,1 µg x kilogramo⁻¹ peso corporal del animal.

En otra realización, el anticuerpo se administra a una dosis menor de aproximadamente 500 µg de anticuerpo por mililitro de formulación y, preferiblemente, menor de aproximadamente 250 µg de anticuerpo por mililitro de formulación y, más preferiblemente, menor de aproximadamente 100 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y más preferiblemente, menor de aproximadamente 50 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y más preferiblemente, menor de aproximadamente 40 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y más preferiblemente,

menor de aproximadamente 30 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y más preferiblemente, menor de aproximadamente 20 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y más preferiblemente, menor de aproximadamente 10 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, e incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 5 µg de anticuerpo y aproximadamente 10 µg de anticuerpo por mililitro de formulación.

5 Considerando más en particular el método de reducción o prevención de la hiperreactividad de las vías respiratorias y/o la inflamación de las vías respiratorias o una afección o una enfermedad relacionada con ellas, una dosis única adecuada de un agente inhibidor para administrar a un animal, es una dosis que es capaz de reducir o prevenir la hiperreactividad de las vías respiratorias y/o la inflamación de las vías respiratorias, o la reducción de al menos otro síntoma de una enfermedad que se va a tratar (por ejemplo, asma), en un animal cuando se administra una o varias veces durante un periodo de tiempo adecuado. Cuando el paciente tiene AHR o tiene riesgo de desarrollar AHR, una dosis única adecuada de un agente comprende una dosis que mejora la AHR con una duplicación de la dosis de un agente provocador o que mejora la función respiratoria estática de un animal.

10 De acuerdo con la presente invención, una cantidad eficaz de un agente que inhibe la AHR para administrar a un animal, comprende una cantidad que es capaz de reducir la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) o la inflamación de las vías respiratorias sin ser tóxica para el animal. Una cantidad que es tóxica para un animal comprende cualquier cantidad que causa daños en la estructura o la función de un animal (es decir, venenosa).

15 En una realización, la eficacia de un agente inhibidor de la AHR para proteger a un animal de la AHR, en un animal que tiene AHR o tiene riesgo de desarrollarla, se puede medir en cantidades duplicadas. Por ejemplo, la capacidad de un animal para estar protegido contra la AHR (es decir, experimentar una reducción o una prevención) mediante la administración de un agente dado, es significativa si $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ del animal, es de 1 mg/ml antes de la administración del agente y es 2 mg/ml de MCh después de la administración del agente. Del mismo modo, un agente se considera eficaz si el $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ del animal es de 2 mg/ml antes de la administración del agente y es de 4 mg/ml de MCh después de la administración del agente. Una cantidad eficaz preferida de un agente comprende una cantidad que es capaz de aumentar el $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ de un animal tratado con el agente por aproximadamente una concentración de duplicación frente al $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ de un animal normal. Tal y como se ha descrito anteriormente, un animal normal se refiere a un animal conocido por no padecer o ser susceptible de AHR anormal. Un animal del ensayo se refiere a un animal sospechoso de padecer o que es susceptible de padecer AHR anormal.

20 En una realización de la presente invención, en un animal que tiene AHR, una cantidad eficaz de un agente que se va a administrar a un animal es una cantidad que reduce sensiblemente la AHR en el animal, en comparación con antes de la administración del agente. En otra realización, una cantidad eficaz de un agente que se va a administrar a un animal, es una cantidad que reduce sensiblemente la AHR en el animal, en comparación con un nivel de AHR de las vías respiratorias en una población de animales con inflamación que está asociada con AHR, en la que no se administró el agente. El agente es capaz preferiblemente de reducir la AHR en un animal, incluso cuando el agente se administra después de la aparición de los síntomas físicos de la AHR (es decir, después del inicio de AHR aguda). Lo más preferiblemente, una cantidad eficaz del agente es una cantidad que reduce los síntomas de la AHR hasta el punto en el que ya no se detecta la AHR en el paciente. En otra realización, una cantidad eficaz del agente es una cantidad que previene o inhibe sustancialmente la aparición de la AHR cuando el agente se administra antes de la exposición del paciente a un estímulo provocador de AHR, tal como un alérgeno, de una manera que es suficiente para inducir la AHR en ausencia del agente.

25 En otra realización, una cantidad eficaz de un agente para uso en la presente invención, comprende una cantidad que da como resultado una mejora en el valor de $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ de un animal, de tal manera que el valor de $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ obtenido antes de la administración del agente cuando el animal se provoca con una primera concentración de metacolina, es el mismo que el valor de $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ obtenido después de la administración del agente cuando el animal se provoca con una cantidad doble de la primera concentración de metacolina. Una cantidad preferida de un agente comprende una cantidad que da como resultado una mejora en el valor de $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ de un animal, de tal manera que el valor de $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ obtenido antes de la administración del agente está entre aproximadamente 0,01 mg/ml y aproximadamente 8 mg/ml de metacolina, es el mismo que el valor de $PC_{20\text{metacolina}}VEF_1$ obtenido después de la administración del agente que es de aproximadamente 0,02 mg/ml a aproximadamente 16 mg/ml de metacolina.

30 Tal y como se ha descrito anteriormente en este documento, la eficacia de un agente para proteger a un animal que tiene AHR o es susceptible de AHR se puede determinar midiendo el porcentaje de mejora en VEF_1 y/o la relación de VEF_1/CVF antes y después de la administración del agente. En una realización, una cantidad eficaz de un agente comprende una cantidad que es capaz de reducir la limitación del flujo de aire de un animal, de modo que el valor de VEF_1/CVF del animal es de al menos aproximadamente el 80%. En otra realización, una cantidad eficaz de un agente comprende una cantidad que es capaz de reducir la limitación del flujo de aire de un animal de tal manera que el valor de VEF_1/CVF del animal mejora en al menos aproximadamente el 5%, o al menos aproximadamente 100 cc o PGFRG de 10L/min. En otra realización, una cantidad eficaz de un agente comprende una cantidad que mejora el VEF_1 de un animal, en al menos aproximadamente el 5%, y más preferiblemente entre aproximadamente el 6% y aproximadamente el 100%, más preferiblemente entre aproximadamente el 7% y aproximadamente el 100%, e incluso más preferiblemente entre aproximadamente el 8% y aproximadamente el 100% (o aproximadamente 200

ml) del VEF₁ previsto del animal. En otra realización, una cantidad eficaz de un agente comprende una cantidad que mejora el VEF₁ de un animal, en al menos aproximadamente el 5% y preferiblemente en al menos aproximadamente el 10%, e incluso más preferiblemente en al menos aproximadamente el 25%, e incluso más preferiblemente en al menos aproximadamente el 50%, e incluso más preferiblemente en al menos aproximadamente el 75%.

5 Un experto en la técnica será capaz de determinar que el número de dosis de un agente que se va a administrar a un animal depende del grado de la hiperreactividad de las vías respiratorias y de la afección subyacente, de la cual la AHR es un síntoma, y de la respuesta de un paciente individual al tratamiento. Además, el médico será capaz de determinar el momento apropiado para la administración del agente de una manera eficaz para reducir la AHR en el animal. Preferiblemente, el agente se administra hasta 48 horas antes de la exposición del paciente a una cantidad
10 de un estímulo provocador de AHR, eficaz para inducir AHR, y más preferiblemente hasta 36 horas, y más preferiblemente hasta 24 horas, y más preferiblemente hasta 12 horas, y más preferiblemente hasta 6 horas, hasta 5 horas, hasta 4 horas, hasta 3 horas, hasta 2 horas o hasta 1 hora antes de la exposición del paciente a una cantidad del estímulo provocador de AHR, eficaz para inducir AHR. En una realización, el agente se administra tan pronto como el paciente o el médico reconocen (es decir, inmediatamente) que el paciente ha estado expuesto o está a
15 punto de ser expuesto a un estímulo que provoca AHR, y especialmente un estímulo que provoca AHR, frente al cual el paciente está sensibilizado (es decir, un alérgeno). En otra realización, el agente se administra a la primera señal de desarrollo de AHR (es decir, AHR de inicio agudo), y preferentemente en el intervalo de al menos 2 horas desde la aparición de los síntomas de AHR, y más preferiblemente, al menos 1 hora, y más preferiblemente al menos 30 minutos, y más preferiblemente al menos 10 minutos, y más preferiblemente al menos 5 minutos después
20 de la aparición de los síntomas de AHR. Los síntomas de la AHR y los métodos para medir o detectar tales síntomas se han descrito con detalle anteriormente. Preferiblemente, tales administraciones se proporcionan hasta que aparecen signos de reducción de la AHR, y luego según sea necesario hasta que hayan desaparecido los síntomas de la AHR.

Haciendo referencia en particular al método de inhibir o prevenir la lesión por isquemia-reperfusión, una cantidad eficaz de un agente, y en particular un anticuerpo del factor B o un fragmento del mismo que se une a antígeno (o un polipéptido que se une a antígeno) para administrar a un animal, es una cantidad que inhibe de forma medible el daño histológico, incluyendo el daño oxidativo o la muerte celular, en el animal, en comparación con la ausencia de
25 administración del agente. En el caso de lesión renal por isquemia-reperfusión, una cantidad eficaz de un agente que se va a administrar a un animal, es una cantidad que inhibe de forma medible el aumento del nitrógeno ureico sérico o disminuye de forma medible la lesión histológica de los tejidos renales de los animales, en comparación con la ausencia de administración del agente. Una dosis única adecuada de un agente inhibidor que se va a administrar a un animal, es una dosis que es capaz de reducir o prevenir por lo menos uno de los síntomas, un tipo de lesión o los daños resultantes de la lesión por isquemia-reperfusión en un animal, cuando se administra una o varias veces durante un periodo de tiempo adecuado. Las dosis adecuadas de anticuerpos, que incluyen diversas vías de
30 administración, se han descrito con detalle anteriormente. En un aspecto, una cantidad eficaz de un agente que inhibe la lesión por isquemia-reperfusión para administrar a un animal, comprende una cantidad que es capaz de inhibir al menos un síntoma o un daño causado por la lesión por isquemia-reperfusión, sin ser tóxica para el animal.

Cualquiera de los métodos descritos en esta memoria se pueden utilizar en cualquier animal y, en particular, en cualquier animal de la clase de vertebrados, *Mammalia* (es decir, mamíferos), que incluyen sin limitación, primates, roedores, ganado y animales domésticos. Los mamíferos preferidos para el tratamiento utilizando la presente
40 invención son los seres humanos.

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de ilustrar y no están destinados a limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplos

45 Ejemplo 1

El siguiente ejemplo describe la producción de un nuevo inhibidor de la vía alternativa del complemento.

Los presentes inventores han creado varios hibridomas que producen anticuerpos monoclonales de ratón que se unen al factor B de ratón. En este estudio, los inventores se proponen caracterizar la capacidad de uno de estos anticuerpos para inhibir la vía alternativa del complemento. Los inventores también estudiaron este anticuerpo en un
50 modelo de pérdida fetal mediada con antifosfolípido. Tal y como se informó anteriormente (Girardi), los ratones carentes de factor B estaban protegidos en gran medida contra la pérdida fetal en este modelo, y los inventores plantearon la hipótesis de que un inhibidor exógeno de la vía alternativa sería un agente terapéutico eficaz en este modelo de enfermedad.

Métodos

55 *Construcción de una proteína de fusión factor B-Ig y purificación del factor B de ratón.* Se construyó un plásmido que codificaba dos de las repeticiones cortas de consenso (SCR) del gen del factor B unido a los dominios de bisagra, CH2 y CH3 de un isotipo IgG1 de ratón (Fig. 1). Estos dominios de SCR se escogieron porque forman parte del segmento eliminado del gen del factor B en los ratones *fB*^{-/-} utilizados en estos estudios.

Purificación del factor B de ratón. El factor B del complemento se purificó a partir de suero de ratón normal mediante purificación por afinidad. La columna de afinidad se creó mediante la unión de factor B de cabra anti-humano properdina (Diasorin, Stillwater, MN) a sefarosa activada con CNBr (Amersham, Arlington Heights, IL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A los ratones C57/B6J se les extrajo sangre mediante punción cardiaca, y la sangre se recogió en jeringas que contenían 50 µl de EDTA 500 mM con el fin de evitar la activación de la vía alternativa. La sangre se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos y se recogió el plasma. El plasma se diluyó a continuación 1:1 con tampón (EACA 50 mM, EDTA 10 mM, benzamidina 2 mM en PBS, pH 7,4) y se pasó a través de un filtro de 0,22, µm (GE Water Technologies). El plasma se añadió a la columna de afinidad y la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón. El factor B se eluyó usando LiCl₂ 5 M y se dializó durante una noche frente a PBS. La pureza del factor B, se verificó después por electroforesis en un gel de Tris-glicina al 10% y se tiñó con Coomassie (no se muestran los datos).

Obtención de anticuerpos monoclonales inhibidores que se dirigen al factor B del complemento. La deleción dirigida del factor B de ratón se llevó a cabo tal y como se ha descrito previamente (Matsumoto). Los ratones carentes de factor B se crearon con células madre embrionarias de la cepa Sv129 y a continuación se cruzaron con ratones C57BL/6 antes de la expansión de la colonia en F1. Los ratones carentes del factor B fueron inmunizados con 125 µg de la proteína de fusión recombinante factor B-Ig, emulsionada con adyuvante incompleto de Freund y luego se estimuló cuatro veces con intervalos de tres semanas. Los ratones se seleccionaron por el desarrollo de anticuerpos inhibidores del factor B, sometiendo a ensayo sus sueros en un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) usando placas recubiertas con factor B de ratón y un ensayo *in vitro* de inhibición de la vía alternativa del complemento (descrito más abajo). Un día después de la última inyección, células esplénicas de un ratón identificado por tener una fuerte respuesta inmune hacia el factor B, se fusionaron con la línea celular de mieloma en el Centro de Anticuerpos Monoclonales de la Universidad de Colorado. Los hibridomas candidatos se clonaron mediante dilución limitante, y se identificaron los clones capaces de inhibir la actividad de la vía alternativa. Uno de los hibridomas, A1379, se utilizó para estos experimentos. A1379 se purificó a partir del material sobrenadante del cultivo de tejidos con una columna de Proteína G-Sefarosa (Pharmacia, Uppsala, Suecia). LPS fue retirado del AcM purificado usando polimixina (Sigma). El ensayo del material lisado de amebocitos de *Limulus* (BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD) se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para verificar que el AcM tenía niveles de LPS inferiores a 1 UE/mg de AcM. La pureza del AcM se verificó a continuación por electroforesis en un gel de Tris-glicina al 10% y se tiñó con azul de Coomassie.

Análisis ELISA de los niveles de anticuerpo anti-factor B.

Los ratones se escrutaron en busca de una respuesta inmune frente a las inmunizaciones, sometiendo a ensayo sus sueros en un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) frente a factor B purificado. Placas de ELISA de noventa y seis pocillos (Costar, Corning, NY) fueron recubiertas con 125 ng de factor B purificado en tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ 15 mM, Na₂HCO₃ 35 mM) y se almacenaron durante una noche a 4°C. Las placas se lavaron después con 200 µl de PBS. La unión no específica fue bloqueada incubando las placas con 200 µl de 5% de BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en PBS. Las placas se lavaron dos veces con 200 µl de PBS con 0,1% de Tween 20, a continuación, se incubaron con suero diluido durante una hora. Las muestras se diluyeron 1:100 en PBS con 0,1% de Tween 20 y 0,1% de BSA, a continuación, las muestras se diluyeron adicionalmente en serie 1:1, siete veces. Las placas se lavaron después dos veces y se incubaron con 50 µl de IgG anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa (Cappel, Durham, Carolina del Norte). Las placas se lavaron después cuatro veces y se incubaron con 100 µl de H₂O₂ al 30% 1:1000 que contenía ABTS (Sigma), y se leyó la absorbancia a 405 nm con un lector de microplacas (Biorad, Richmond, CA).

Ensayos de inhibición de la vía alternativa del complemento. Los sueros con títulos detectables de anticuerpos anti-factor B se escrutaron luego en busca de la capacidad para inhibir la vía alternativa. Esto se realizó mediante un análisis *in vitro* de deposición de C3 sobre partículas de zimosano A (Sigma) (Quigg). Cincuenta mg de partículas de zimosano en 10 ml de NaCl 0,15 M se hirvieron durante 60 minutos, después se lavaron dos veces en PBS. Los sueros se sometieron a ensayo mezclando 1x10⁷ partículas de zimosano en una mezcla de reacción con una concentración final de EGTA 10 mM y MgCl₂ 5 mM. Se añadieron diez microlitros de sueros procedentes de ratones C57/B6 no manipulados como una fuente de complemento. Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo con un máximo de 70 µl de suero procedente de ratones inmunizados (para detectar la generación de anticuerpos inhibidores) o con anticuerpo purificado con una dosis ajustada desde 0,0625 µg hasta 8 µg por reacción. Las muestras se llevaron hasta un volumen final de 100 µl con PBS y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Las partículas de zimosano se lavaron dos veces con PBS frío, 1% de suero bovino fetal, y luego se incubaron con C3 anti-ratón de cabra conjugado con FITC (Cappel, Durham, Carolina del Norte) durante una hora en hielo. Las muestras se lavaron de nuevo dos veces, se resuspendieron en 0,5 ml de PBS, 1% de suero bovino fetal, y luego se analizaron por citometría de flujo. El porcentaje de inhibición se calculó usando la fórmula:

$$100 \times \left[1 - \frac{(\text{fluorescencia del canal medio de la muestra} - \text{ruido de fondo (sin suero)})}{(\text{fluorescencia del canal medio del testigo positivo} - \text{ruido de fondo})} \right]$$

Los fragmentos Fab del clon 1379 también se sometieron a ensayo para determinar la capacidad de inhibir la ruta alternativa utilizando el ensayo de zimosano. Los fragmentos Fab se generaron incubando el anticuerpo purificado con papaína-agarosa (ICN Biomedicals, Aurora, OH) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fragmentos

Fc y la IgG sin digerir se retiraron a continuación, aplicando el anticuerpo digerido a una columna de proteína G. Los fragmentos Fab se recogieron en el flujo a través, y los fragmentos Fc y la IgG sin digerir se eluyeron posteriormente con glicina-HCl 0,1 M, pH 2,8. Se utilizó 1 µg del Fab en la reacción de zimosano. Se encontró que el anticuerpo C3 anti-ratón policlonal utilizado en este ensayo tenía reactividad cruzada con varias especies. Por tanto, este ensayo se utilizó para someter a ensayo la inhibición con el clon 1379 de la vía alternativa en esas especies. El ajuste de la dosis del anticuerpo inhibidor se llevó a cabo tal y como se ha descrito anteriormente.

En otro ensayo de la capacidad del clon 1379 para inhibir la vía alternativa del complemento, los inventores sometieron a ensayo la capacidad de este anticuerpo para inhibir la lisis de eritrocitos de conejo no sensibilizados por suero humano. La sangre de conejo se mezcló 1:1 con una solución tampón compuesta por 20,5 g de dextrosa, 8,0 g de citrato de sodio (dihidratado), 4,0 g de NaCl, 0,55 g de ácido cítrico en un litro de agua destilada. Cinco ml de solución de eritrocitos se mezcló a continuación 1:9 con una solución de 1,1% de NaCl, 0,0025% de Na-5,5-dietil barbiturato, pH 7,35, EGTA 8 mM, MgCl₂ 2 mM. La mezcla se incubó a 37°C durante varios minutos y después se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C. Los eritrocitos se lavaron tres veces más antes de ser resuspendidos en 40 ml de la misma solución. Cincuenta µl de la suspensión anterior se añadieron a suero humano (5 a 100 µl), se añadió solución tampón para llevar el volumen final hasta 150 µl. Los eritrocitos en el tampón sin suero fueron utilizados como un testigo negativo, y los eritrocitos añadidos a 100 µl de agua destilada se utilizaron como testigos positivos (lisis completa). Las muestras se incubaron a 37°C durante 30 minutos con agitación ocasional para mantener las células en suspensión. Las reacciones se detuvieron añadiendo 1,5 ml de PBS frío y las muestras se centrifugaron a 1000 x g durante cinco minutos. La densidad óptica de cada material sobrenadante se leyó a 415 nm utilizando un espectrofotómetro (Biorad). Se observó que la lisis completa de los eritrocitos se provocaba con 10 µl de suero. La misma reacción se llevó a cabo a continuación, utilizando 10 µl de suero y concentraciones crecientes del clon 1379 (1 µg a 12 µg por reacción). El porcentaje de inhibición de la actividad de la vía alternativa se determinó utilizando la fórmula:

$$100 \times \left[1 - \frac{(DO_{\text{muestra}} - DO_{\text{de fondo}})}{(DO_{\text{testigo positivo}} - DO_{\text{de fondo}})} \right]$$

Farmacocinética in vivo del clon 1379. A los ratones se les extrajo previamente la sangre y luego se les inyectó por vía intraperitoneal (IP) o intravenosa (IV) dosis de uno o dos mg del clon 1379 del anticuerpo. Estas dosis fueron elegidas porque se estimó que serían equimolares con el factor B. El factor B está presente en el suero a aproximadamente ~200 µg/ml (o ~2,2 µM dado que el factor B es una proteína de 90 kD). Debido a que el anticuerpo 1379 tiene 150 kD y el volumen intravascular de un ratón adulto es de aproximadamente 3 ml, una inyección de un mg (6,7 µMol) debería dar como resultado una concentración circulante de ~2,2 µM. Debido a que el anticuerpo es divalente, se anticipó que esta inyección equimolar sería más que suficiente para provocar una inhibición completa de la vía alternativa. A los ratones se les extrajo sangre 1, 2, 6, 24, 48 y 96 horas después de la inyección del inhibidor. Los sueros de estos momentos de extracción se utilizaron a continuación en el ensayo de zimosano para evaluar la actividad de la vía alternativa.

Resultados

Generación de anticuerpos monoclonales inhibidores de la porción Ba del factor B. Los anticuerpos monoclonales para el factor B de ratón se generaron tal y como se ha descrito en la sección de métodos. El suero procedente de ratones inmunizados se sometió a ensayo para determinar la presencia de anticuerpos anti-factor B (datos no mostrados). Un clon, denominado 1379, fue elegido para una caracterización adicional debido al hecho observado de que el hibridoma crecía rápidamente, el anticuerpo es de la subclase IgG₁ (no es activador del complemento), y se observó que su material sobrenadante era un potente inhibidor de la vía alternativa del complemento. Después de la purificación del anticuerpo (datos no mostrados), el anticuerpo fue sometido a dos ensayos *in vitro* de la actividad de la vía alternativa (Figs. 2A y 2B). Usando el ensayo de zimosano, se encontró que el inhibidor inhibía completamente la vía alternativa cuando se añadían tres µg a una reacción que contenía 10 µl de suero. El anti-factor B y el factor B son aproximadamente equimolares a esta concentración (suponiendo que el factor B está presente a 200 µg/ml y tiene un peso molecular de 90.000 kD, hay 0,022 nMol en 10 µl de suero y 3 µg de anticuerpo con un peso molecular de 150.000 kD es igual a aproximadamente 0,02 nMol). En el ensayo de lisis de eritrocitos de conejo, la inhibición completa se logró con 6 µg de anticuerpo por 10 µl de suero humano en la reacción. La inhibición de la vía alternativa se sometió a ensayo a continuación utilizando fragmentos Fab preparados a partir del clon 1379. Cuando se utilizó un exceso molar de Fab procedente del clon 1379, se observó una inhibición completa de la actividad de la vía alternativa con este ensayo.

La capacidad de 1379 para inhibir la actividad de la vía alternativa en los sueros procedentes de múltiples especies de mamíferos diferentes, se sometió a ensayo después con el ensayo de zimosano. El anticuerpo 1379 era capaz de inhibir completamente la activación de la vía alternativa en la mayoría de las especies sometidas a ensayo (Tabla 1). El anticuerpo inhibía completamente la actividad de la vía alternativa en el suero procedente de ratones, ratas, seres humanos y varias especies de monos. Sin embargo, no se mostró ninguna actividad inhibidora frente al suero de perros o cobayas.

Tabla 1

Especies en las que la vía alternativa se inhibe totalmente con el AcM 1379
<ul style="list-style-type: none"> • Ratón • Ser humano • Rata • Babuino • Rhesus • Cerdo • Mono cangrejero • Caballo
Especies en las que la vía alternativa no se inhibe con el AcM 1379
<ul style="list-style-type: none"> • Perro • Cobaya

5 *Farmacocinética del anticuerpo 1379.* Los ratones fueron sometidos a ensayo para estudiar la inhibición de la vía alternativa en diversos momentos después de una única inyección del anticuerpo inhibidor. Un mg de anticuerpo produjo la inhibición completa en una hora, cuando se inyectó IV y en dos horas cuando se inyectó IP (Fig. 3). Los ratones que recibieron una inyección IP de un mg conservaban la inhibición completa de la vía alternativa a las 24 horas y los que recibieron una inyección de dos mg conservaban la inhibición completa hasta 48 horas después de la inyección. Los inventores también han inyectado 2 mg del anticuerpo 1379 repetitivamente i.p. cada dos días durante 14 días y han mostrado que se mantuvo la inhibición completa de la vía alternativa del complemento durante al menos 48 horas después de la última inyección (datos no mostrados). Estos datos sugieren fuertemente que este AcM de ratón no es reconocido como "extraño" y respalda su uso crónico *in vivo*. Finalmente, experimentos que utilizaban fragmentos F(ab) del anticuerpo, han mostrado que se consigue una inhibición de la vía alternativa a niveles aproximadamente equimolares como con el anticuerpo 1379 intacto (datos no mostrados).

15 *1379 se une a un epítipo en la región SCR3 de Ba.* La capacidad del anticuerpo 1379 para unirse a un panel de mutantes del factor B se estudió como se ha descrito previamente (Hourcade, 1995, *J. Biol. Chem.*) con el fin de caracterizar el sitio de unión del AcM. Los experimentos han mostrado que la introducción de ciertas sustituciones de alanina en las SCRs 2 y 3 del factor B humano, pero no en SCR1, da como resultado la pérdida de la unión del anticuerpo 1379 con el factor B. A partir de los 25 mutantes diferentes sometidos a ensayo, 1379 prácticamente no se unía a los mutantes B17 y B23 y conservaba menos de 20% de su capacidad de unión con el mutante B18. Estas son todas mutaciones de SCR3. Más específicamente, el mutante B17 sustituye 139-Tyr-140-Cys-141-Ser por His-Cys-Pro, las posiciones que son relevantes para el factor B maduro humano representado por SEQ ID NO: 2; el mutante B23 sustituye 182-Glu-183-Gly-184-Gly-185-Ser por Gly-Asn-Gly-Val, las posiciones también son relevantes para el factor B maduro humano representado por SEQ ID NO: 2. Por lo tanto, el anticuerpo 1379 se une al tercer dominio de SCR del factor B.

25 Conclusiones

Los presentes inventores han generado un nuevo anticuerpo monoclonal para el factor B de ratón identificado como el clon 1379. Este anticuerpo es un inhibidor específico de la vía alternativa del complemento y conduce a una inhibición completa de esta vía *in vitro* e *in vivo*. Una sola inyección i.p. de 1 mg condujo a una inhibición completa de la vía alternativa durante un máximo de 48 horas, y múltiples inyecciones dieron como resultado una inhibición prolongada de esta vía.

35 Empleando ensayos *in vitro*, se demostró que 1379 inhibe totalmente la actividad de la vía alternativa en el suero procedente de múltiples especies, incluyendo ratones, ratas, monos y seres humanos. Empleando ensayos de afinidad de la unión del anticuerpo con un panel de mutantes del factor B, se determinó que el sitio antigénico estaba en el dominio de SCR3 del factor B, parte de la región eliminada en los ratones *fB*^{-/-}. Esta región de la proteína del factor B es adyacente al sitio de escisión del factor D. La capacidad del fragmento Fab de 1379 para inhibir la actividad de la vía alternativa sugiere que no es únicamente un impedimento estérico de 1379 lo que impide la escisión, si no que el sitio de unión específica es un lugar decisivo en la escisión de la proteína mediada por el factor D. La eficacia de 1379 contra el suero procedente de tantas especies diferentes, sugiere que este sitio está muy conservado entre los mamíferos superiores.

40 Varios otros inhibidores solubles del complemento ya se han desarrollado y caracterizado (Quigg; Weisman; Heller; Granger; Pratt), pero el inhibidor descrito en este documento se cree que es el primero que inhibe selectivamente la vía alternativa en una amplia gama de especies animales. Al inhibir selectivamente la vía alternativa, 1379 puede tener varias ventajas en comparación con los inhibidores que funcionan a nivel de la convertasa C3. Al dejar intacta la vía clásica, este inhibidor puede tener menos efectos inmunosupresores. Por otra parte, el bloqueo de la vía clásica puede inducir realmente una autoinmunidad. El bloqueo selectivo de la vía alternativa ha mejorado un modelo de ratón de nefritis lúpica (Watanabe), mientras que la carencia de C3 no lo hizo. La vía alternativa se ha implicado específicamente en una variedad de modelos de enfermedad (Thurman; Watanabe; Girardi), destacando

el potencial terapéutico de un inhibidor específico de la vía alternativa.

Referencias

1. Thurman et al, 2003, *J Immunol* **170**:1517-1523
2. Watanabe et al., 2000, *J Immunol* **164**:786-794
- 5 3. Girardi et al, 2003, *J Clin Invest* **112**:1644-1654
4. Holers, V.M. 2003, *Clin Immunol* **107**:140-151
5. Densen et al., 1996, *Mol Immunol* **33**:68 (Resumen 270)
6. Matsumoto et al., 1997, *Proc Natl Acad Sci USA*. **94**:8720-8725
7. Figueroa y Densen, 1991, *Clin Microbiol Rev.* **4**:359-395
- 10 8. Quigg et al, 1998, *J Immunol* **160**:4553-4560
9. Weisman et al., 1990, *Science* **249**:146-151
10. Heller et al., 1999, *J Immunol* **163**:985-994
11. Granger et al., 2003, *Circulation* **108**:1184-1190
12. Pratt et al, 2003, *Am J Pathol* **163**:1457-65

15 Ejemplo 2

El siguiente ejemplo muestra que la activación del complemento a través de la vía alternativa es decisiva para el desarrollo de la hiperreactividad y la inflamación de las vías respiratorias, y muestra además que la inhibición de la vía alternativa de activación del complemento inhibe la hiperreactividad de las vías respiratorias.

- 20 Dada la eficacia de la inhibición de la activación del complemento antes de la exposición al alérgeno, los presentes inventores determinaron además la vía de activación del complemento. En el presente estudio los inventores informan de que la activación de la cascada del complemento a través de la vía alternativa es decisiva para el desarrollo de hiperreactividad de las vías respiratorias e inflamación de las vías respiratorias.

Métodos

Animales

- 25 Ratones hembra C57BL/6, de 8 a 12 semanas de edad, se obtuvieron de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME). Tal y como se ha descrito anteriormente, ratones que carecían de forma heterocigota el factor B (*fB +/-*) se entrecruzaron en F1 después de un cruce inicial con la cepa C57BL/6 y luego se entrecruzaron para generar una cepa *fB -/-*. Estos ratones luego se retrocruzaron durante 7 generaciones con ratones C57BL/6. Como ratones testigos se utilizaron ratones de la misma camada *fB +/-*. Ratones carentes de C4 (*C4 -/-*) retrocruzados durante 17
- 30 generaciones con ratones C57BL/6) se mantuvieron en las instalaciones de los animales. Todos los animales experimentales utilizados en este estudio se mantuvieron con dietas exentas de ovoalbúmina (OVA) y estaban bajo un protocolo aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales del National Jewish Medical and Research Center.

Protocolo experimental

- 35 Se sensibilizaron ratones mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de 20 µg de OVA (calidad V; Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO) o de ambrosía (*Ambrosia artemisiifolia*, Laboratorios Greer, Lenoir, NC) suspendida en 2,25 mg de hidróxido de aluminio (Alum Imuject; Pierce, Rockford, IL) los días 1 y 14 y después se estimularon las vías respiratorias, usando OVA o ambrosía nebulizadas (1% en PBS), con un nebulizador ultrasónico (DeVilbiss Health Care, Somerset, PA) durante diariamente 20 minutos, los días 27, 28 y 29.
- 40 Para la reconstitución de *fB* se administraron 10 µg, 1 µg o 0,1 µg de *fB* purificado (50 µl en PBS) mediante aplicación intranasal 1 hora antes de cada estímulo de las vías respiratorias a ratones no sensibilizados y ratones sensibilizados *fB -/-*. Como testigo se administró PBS.

- 45 En un estudio diferente 2 horas antes de cada estímulo con OVA, se administró un anticuerpo contra *fB* (anti-FB) a ratones sensibilizados, ya sea por inyección i.p. (2mg/tratamiento/ratón) o por nebulización. Para la nebulización, 4 ratones fueron colocados en una caja de plexiglás, y 0,5 mg de anticuerpos anti-*fB* (en 5 ml de PBS) fueron nebulizados empleando un nebulizador ultrasónico (DeVilbiss Health Care). Como testigo, IgG de rata con la misma dosis y volumen se inyectó i.p. o se nebulizó en los mismos momentos específicos. El día 31, la AHR se evaluó y los animales fueron sacrificados el mismo día para la recogida de fluido del BAL, sangre y tejido pulmonar.

Purificación del factor B

- 50 Para reconstituir la actividad de la vía alternativa en ratones *B-/-*, el factor B del complemento de ratón se purificó a partir de suero de ratón normal mediante purificación por afinidad. La columna de afinidad se creó uniendo factor B de cabra anti-humano y properdina (Diasorin, Stillwater, MN) a sefarsa activada con CNBr (Amersham, Arlington Heights, IL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se extrajo sangre de ratones C57/B6J mediante punción cardíaca, y la sangre se recogió en jeringas que contenían 50 µl de EDTA 500 mM con el fin de evitar la activación

de la vía alternativa. La sangre se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos y se recogió el plasma. El plasma se diluyó a continuación 1:1 con tampón (EACA 50 mM, EDTA 10 mM, benzamidina 2 mM en PBS, pH 7,4) y se pasó a través de un filtro de 0,22 µm (GE Water Technologies). El plasma se añadió a la columna de afinidad y la columna se lavó con 10 volúmenes de columna, de tampón. El factor B se eluyó usando LiCl₂ 5 M y se dializó durante una noche frente a PBS. La pureza del factor B se verificó a continuación mediante electroforesis en un gel de Tris-glicina al 10% y se tiñó con azul de Coomassie. La concentración de LPS se determinó mediante el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD) y se encontró que era inferior a 1 UE/mg de factor B purificado.

Generación de anticuerpos anti-factor B

10 Anticuerpos monoclonales anti-factor B de ratón se produjeron tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1. Brevemente, ratones carentes de factor B fueron inmunizados con una proteína de fusión recombinante creada a partir del segundo y tercer dominios de la repetición corta de consenso (SCR) del gen del factor B y una inmunoglobulina. Los dominios de SCR se eligieron porque forman parte del segmento deletado del gen del factor B en los ratones *fB*^{-/-}. Los ratones *fB*^{-/-} fueron inmunizados después con esta proteína y, a continuación se estimularon cuatro veces a intervalos de tres semanas. Un día después de la última inyección, las células del bazo se fusionaron con células de mieloma en el Centro de Anticuerpos Monoclonales de la Universidad de Colorado. Los clones que secretaban anticuerpos monoclonales (AcM) anti-factor B fueron identificados y caracterizados. Uno de los hibridomas, A1379, se utilizó para estos experimentos. A1379 se purificó a partir del material sobrenadante de cultivo de tejidos con una columna de Proteína G-Sefarosa (Pharmacia, Uppsala, Suecia). LPS se eliminó del AcM purificado usando polimixina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). El ensayo de material lisado de amebocitos de *Limulus* (Bio Whittaker, Inc., Walkersville, MD) se usó de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes para verificar que el AcM tenía niveles de LPS inferiores a 1 UE/mg de AcM. La pureza del AcM se verificó a continuación mediante electroforesis en un gel de Tris-glicina al 10% y se tiñó con azul de Coomassie.

Determinación de la función de las vías respiratorias

25 La capacidad de respuesta de las vías respiratorias se evaluó como un cambio en la función de las vías respiratorias después estimular con metacolina en aerosol (MCh) administrada durante 10 segundos (60 respiraciones/min, 500 µl de volumen de ventilación pulmonar) en concentraciones crecientes (6,25, 12,5, 25, 50 y 100 mg/ml). Ratones anestesiados (pentobarbital sódico, i.p., 70 a 90 mg/kg), con traqueotomía (cánula 18G) fueron sometidos a ventilación mecánica (160 respiraciones por minuto, volumen de ventilación pulmonar de 150 µl, presión espiratoria final positiva de 2-4 cm H₂O) y se determinó la función pulmonar (Takeda, 1997). La resistencia de las vías aéreas (RL) se calculó continuamente (Labview, National Instruments, TX) adaptando el flujo, el volumen y la presión a una ecuación de movimiento. Se tomaron los valores máximos de RL y se expresaron como un porcentaje de cambio respecto al valor de referencia después del aerosol en PBS. No había diferencias significativas en los valores de referencia de RL entre los ratones carentes o testigos respectivos.

Lavado broncoalveolar y medición de las citocinas

Después de determinar la función de las vías respiratorias, los pulmones se lavaron a través del tubo de la tráquea con solución salina equilibrada con Hank (1x1 ml, 37°C). El número de células del BAL se obtuvieron utilizando un contador de células (Coulter Counter, Coulter Co., Hialeah, FL). Los recuentos diferenciales de células se hicieron a partir de preparaciones citocentrifugadas y se calculó el porcentaje y el número absoluto de cada tipo de célula. Los niveles de citocinas se determinaron mediante ELISA en el fluido del BAL (Tompkinson). Los ELISAs de IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 (todos PharMingen, San Diego, CA) e IL-13 (R&D Systems, Minneapolis, MN) se realizaron de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Los niveles de C3a desArg en el fluido del BAL se midieron por ELISA en ratones no sensibilizados y sensibilizados, 24 horas después de la primera o segunda exposición al alérgeno, y 24 y 48 horas después de la tercera y la última exposición siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Cedarlane Laboratories, Homby, Ontario, Canadá).

Estudios histológicos e inmunohistoquímicos

Después de obtener el líquido del BAL, los pulmones se inflaron a través de la tráquea con 2 ml de formalina al 10% y después se fijaron en la misma solución por inmersión. Las secciones de tejido se tiñeron con hematoxilina y eosina, ácido periódico de Schiff (PAS) e inmunohistoquímicamente las células que contenían la proteína eosinófila básica principal (MBP), usando un anticuerpo de MBP de conejo anti-ratón (proporcionado por J.J. Lee, Mayo Clinic, Scottsdale, AZ). Los portaobjetos fueron examinados de forma ciega y una variedad de eosinófilos en el tejido peribronquial y las células caliciformes se analizaron por separado usando el programa informático NIH Scion Image (versión 1.62, desarrollado en el Instituto Nacional de Salud de los EE.UU. y disponible en Internet).

Medición de IgE total y de anticuerpos específicos de OVA

55 Los niveles séricos de IgE total y de IgE e IgG1 específica de OVA se midieron mediante ELISA tal y como se ha descrito previamente (Tompkinson). Los títulos de anticuerpos específicos de OVA de las muestras se relacionaron con patrones internos combinados, a los que se asignó arbitrariamente que tenían 500 unidades de ELISA (UE). El

nivel total de IgE se calculó por comparación con un patrón conocido de IgE de ratón convencional (55 3481, PharMingen).

Análisis estadístico

5 El análisis de la varianza (ANOVA) se utilizó para determinar el nivel de diferencia entre todos los grupos. Las comparaciones de todas las parejas se llevaron a cabo por la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey-Kramer. Los valores de la probabilidad (p) para significación se fijaron en 0,05. Los valores de todas las mediciones se expresan como el error medio \pm estándar de la media (SEM).

Resultados

10 *La activación del complemento a través de la vía alternativa es decisiva para el desarrollo de AHR después de la exposición de ratones sensibilizados al alérgeno*

15 Para determinar el papel de la vía alternativa en el desarrollo de AHR y la inflamación de las vías respiratorias, ratones *fB* *-/-* sensibilizados con OVA y no sensibilizados y ratones testigo correspondientes (*fB* *+/+*) se estimularon con un aerosol de OVA al 1% durante 3 días consecutivos. Los ratones *fB* *+/+* sensibilizados y estimulados mostraron una mayor capacidad de respuesta frente a MCh, en comparación con ratones *fB* *+/+* únicamente estimulados (Fig. 4). Por el contrario, los ratones *fB* *-/-* sensibilizados y estimulados mostraron una respuesta significativamente menor ($p < 0,01$) frente a MCh a lo largo de la curva de dosis-respuesta, en comparación con los ratones *fB* *+/+* sensibilizados y estimulados, y por lo tanto mostraron una marcada incapacidad para desarrollar AHR después de la sensibilización y la estimulación.

20 *La activación del complemento a través de la vía alternativa es decisiva para el desarrollo de inflamación de las vías respiratorias después de la exposición al alérgeno de ratones sensibilizados*

25 La inflamación de las vías respiratorias es un rasgo característico de una enfermedad alérgica de las vías respiratorias. Para evaluar la inflamación de las vías respiratorias, se obtuvo líquido del BAL y de tejido pulmonar 48 horas después de la última estimulación de las vías respiratorias. Ratones *fB* *+/+* sensibilizados y estimulados mostraron un aumento en el recuento total de células y especialmente en el número de eosinófilos en el fluido del BAL, en comparación con ratones únicamente estimulados que no tenían eosinófilos en el fluido del BAL (Fig. 5). Ratones *fB* *-/-* sensibilizados y estimulados mostraron un recuento total de células significativamente menor, así como un número menor de eosinófilos ($p < 0,01$) en el fluido del BAL, en comparación con ratones *fB* *+/+* sensibilizados y estimulados, pero aún significativamente mayor ($p < 0,01$) en comparación con los testigos únicamente estimulados. Del mismo modo, ratones *fB* *-/-* mostraron también un número menor de eosinófilos en el fluido del BAL después de la sensibilización y la estimulación con ambrosía, en comparación con testigos sensibilizados y estimulados con ambrosía (Fig. 5).

35 La sensibilización al alérgeno y la estimulación de las vías respiratorias conducen a un incremento de la inflamación peribronquial y en especial de la infiltración de eosinófilos, en comparación con únicamente la estimulación (Fig. 3). Sin embargo, ratones *fB* *-/-* sensibilizados y estimulados mostraban una inflamación peribronquial marcadamente reducida (Tabla 2) en comparación con ratones testigos sensibilizados y estimulados. Para cuantificar la infiltración de eosinófilos en el pulmón, se tiñeron secciones de tejidos con anti-proteína básica principal (datos no mostrados). En los ratones únicamente estimulados se detectaron solo algunos eosinófilos en el tejido peribronquial. La sensibilización y la estimulación posterior con alérgeno de ratones *fB* *+/+*, dio lugar a un aumento significativo en el número de eosinófilos peribronquiales (Tabla 2). Por el contrario, ratones *fB* *-/-* sensibilizados y estimulados mostraron una infiltración peribronquial con eosinófilos significativamente menor (Tabla 2).

45 Otra característica distintiva de la enfermedad alérgica de las vías respiratorias es la hiperplasia de células caliciformes de las células epiteliales de las vías respiratorias. Los pulmones se tiñeron con ácido periódico de Schiff para identificar las células mucosas en el epitelio de las vías respiratorias. En ratones sensibilizados y estimulados se encontró una gran cantidad de células mucosas teñidas positivas (Tabla 2) en contraste con los ratones únicamente estimulados, en los que no había células PAS positivas detectables (Tabla 2). Los ratones *fB* *-/-* sensibilizados y estimulados mostraban significativamente ($p < 0,001$) menos células mucosas en el epitelio de las vías respiratorias, que en comparación con ratones de tipo silvestre sensibilizados y estimulados.

La activación del complemento a través de la vía alternativa afecta a la producción de citocinas en el fluido del BAL

50 La producción de citocinas Th2 en los linfocitos T tiene una función clave en la inducción de la inflamación alérgica de las vías respiratorias y AHR. Para evaluar la respuesta de las citocinas después de la exposición al alérgeno, se determinaron las concentraciones de IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13 e IFN- γ en el fluido del BAL, 48 h después de la última exposición a ovoalbúmina. La sensibilización y la estimulación de ratones de tipo silvestre dio como resultado un aumento significativo ($p < 0,05$) en IL-4, IL-5 e IL-13 y una disminución significativa ($p < 0,05$) en IL-10, IL-12 e IFN- γ , en comparación con los testigos únicamente estimulados (datos no mostrados). Los niveles de citocinas T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-13) en el fluido del BAL se redujeron en los ratones *fB* *-/-* (datos no mostrados).

La carencia de fB no afecta a los niveles séricos de anticuerpos específicos de antígeno

5 Los niveles séricos de IgE total e IgE e IgG1 específicas de OVA se midieron 48 horas después del último estímulo de las vías respiratorias. Ratones *fB* *+/+* sensibilizados y estimulados mostraron un aumento de los niveles de IgE total y de IgE e IgG1 específicas de OVA, en comparación con ratones testigos únicamente estimulados (Tabla 3). Del mismo modo, los ratones *fB* *-/-* mostraron un aumento de los niveles de IgE total y de IgE e IgG1 específicas de OVA, que no eran estadísticamente diferentes de los ratones *fB* *+/+* sensibilizados y estimulados, lo que indica que la respuesta humoral a la sensibilización y exposición a alérgenos permanece intacta en estos ratones.

Tabla 2. Cuantificación de la hiperplasia de las células caliciformes e inflamación eosinofílica peribronquial

	<i>fβ</i> +/+ solo estimulado	<i>fβ</i> +/+ sensibilizado y estimulado	<i>fβ</i> -/- sensibilizado y estimulado	<i>C4</i> +/+ sensibilizado y estimulado	<i>C4</i> -/- sensibilizado y estimulado	Ac testigo sensibilizado y estimulado	anti- <i>fβ</i> i.p. sensibilizado y estimulado	anti- <i>fβ</i> neb sensibilizado y estimulado
células PAS-positivas (células/mm de MB)	N.D.	132 ± 35 *	36 ± 19 #	156 ± 27 *	149 ± 15 *	153 ± 33 *	26 ± 10 #	43 ± 12 #
células αMBP-positivas (células/mm de MB)	1,3 ± 0,9	80 ± 16 *	24 ± 14 #	95 ± 20 *	87 ± 21 *	95 ± 28 *	20 ± 9 #	33 ± 16 #

Los ratones fueron sensibilizados y estimulados tal y como se describe en los Métodos. El número de células caliciformes (células PAS positivas) y de eosinófilos peribronquiales (células positivas anti-proteína básica principal (MBP)) se determinó 48 h después de la última estimulación. Los valores medios ± SEM se muestran; *fβ* -/-: ratones carentes de factor B; *fβ* +/+ : ratones testigos de tipo silvestre congénitos; *C4* -/-: ratones carentes del factor 4 del complemento; *C4* +/+ : ratones testigos de tipo silvestre congénitos; Ac testigo: ratones C57BL/6 sensibilizados y estimulados tratados con el Ac testigo i.p.; anti-*fβ* i.p.: ratones C57BL/6 sensibilizados y estimulados tratados con anticuerpo anti-*fβ* i.p.; anti-*fβ* neb: ratones C57BL/6 sensibilizados y estimulados tratados con anticuerpo anti-*fβ* por inhalación; MB (membrana basal). **p*<0,05 en comparación con *fβ* +/+ únicamente estimulado, *fβ* -/- estimulado y anti-*fβ* i.p. sensibilizado y estimulado y anti-*fβ* neb sensibilizado y estimulado. #*p* <0,05 en comparación con *fβ* +/+ únicamente estimulado.

Tabla 3. Niveles de inmunoglobulinas séricas

	<i>fβ</i> +/+ solo estimulado	<i>fβ</i> +/+ sensibilizado y estimulado	<i>fβ</i> -/- solo estimulado	<i>fβ</i> -/- sensibilizado y estimulado	<i>C57BL/6</i> sensibilizado y estimulado	Ac testigo sensibilizado y estimulado	anti- <i>fβ</i> i.p. sensibilizado y estimulado	anti- <i>fβ</i> neb sensibilizado y estimulado
IgE total (ng/ml)	47,3 ± 11,2	219,8 ± 48,4 *	38,5 ± 12,5	198,3 ± 31,2 *	241,1 ± 37,6 *	238,5 ± 41,1 *	189,6 ± 33,2 *	229,5 ± 44 *
IgE específica de OVA (UE/ml)	<10	145,1 ± 36,7 *	<10	166,2 ± 42,1 *	153,8 ± 47,4 *	128,1 ± 30,8 *	99,1 ± 27,4 *	122,5 ± 39,5 *
IgG1 específica de OVA (UE/ml)	<10	189,1 ± 20,5 *	<10	155,9 ± 38,8 *	171,8 ± 71,1 *	146,5 ± 61,2 *	106,5 ± 28,9 *	120,1 ± 30,8 *

Los ratones fueron sensibilizados y estimulados tal y como se describe en los Métodos. Los niveles séricos de inmunoglobulinas se determinaron 48 h después de la última estimulación. Los valores medios ± EEM se muestran; *fβ* -/-: ratones carentes de factor B; *fβ* +/+ : ratones testigos de tipo silvestre congénitos; Ac testigo: ratones C57BL/6 sensibilizados y estimulados tratados con el Ac testigo i.p.; anti-*fβ* i.p.: ratones C57BL/6 sensibilizados y estimulados tratados con anticuerpo anti-*fβ* i.p.; anti-*fβ* neb: ratones C57BL/6 sensibilizados y estimulados tratados con anticuerpo anti-*fβ* por inhalación; UE/ml (unidades/ml de ELISA). **p*<0,05 en comparación con *fβ* +/+ únicamente estimulado y *fβ* -/- estimulado.

La activación de la vía clásica en este modelo no es esencial para el desarrollo de la enfermedad alérgica de las vías respiratorias

Para definir adicionalmente la vía del complemento decisiva para el desarrollo de respuestas alérgicas en los pulmones de ratones sensibilizados y estimulados, los inventores usaron ratones carentes del componente 4 del complemento (*C4* *-/-*), que es esencial para la activación de las vías clásica y de lectinas, en comparación con ratones *fB* *-/-*.

Para evaluar la activación de la vía del complemento, se determinaron los niveles de C3a desArg en el fluido del BAL. Los ratones únicamente estimulados mostraron bajos niveles de C3a desArg (datos no mostrados). Por el contrario, los ratones sensibilizados mostraron un aumento de los niveles de C3a desArg en el fluido del BAL después de la primera, segunda y tercera estimulación, presentando los valores más altos 48 horas después de la última estimulación (datos no mostrados). Curiosamente, los ratones *C4* *-/-* sensibilizados y estimulados mostraron niveles similares de C3a en comparación con los ratones de tipo silvestre sensibilizados y estimulados, en contraste con ratones *fB* *-/-* sensibilizados y estimulados, que mostraron una disminución de los niveles de C3a desArg en comparación con sus respectivos ratones de tipo silvestre sensibilizados y estimulados (datos no mostrados). Estos datos sugieren que tras la exposición al alérgeno de ratones sensibilizados, la activación del complemento se produce a través de la vía alternativa.

Los ratones *C4* *-/-* desarrollaban niveles similares de AHR que los ratones *C4* *+/+* sensibilizados y estimulados (Fig. 9). Del mismo modo, ratones *C4* *-/-* no mostraron ninguna disminución en los recuentos totales de células (media \pm SEM, $n = 10$; $163 \pm 35 \times 10^3$ células), o del número de linfocitos ($28 \pm 9 \times 10^3$ células) y eosinófilos ($98 \pm 23 \times 10^3$ células) en el fluido del lavado broncoalveolar (BAL), en comparación con los ratones testigos sensibilizados y estimulados ($n = 10$; 175 ± 53 ; 35 ± 12 ; $115 \pm 32 \times 10^3$ células, respectivamente) (datos no mostrados). Ratones *C4* *-/-* sensibilizados y estimulados adicionalmente mostraron aumentos similares en el número de eosinófilos peribronquiales y en el número de células calciformes, en comparación con los respectivos ratones de tipo silvestre sensibilizados y estimulados (Tabla 2). Estos hallazgos sugieren que la activación de la vía clásica en este modelo no es esencial para el desarrollo de la enfermedad alérgica de las vías respiratorias.

La falta de desarrollo de AHR y de inflamación de las vías respiratorias en ratones carentes de fB no es específica de OVA

Para evaluar si la falta de hiperreactividad de las vías respiratorias después de la sensibilización y el estímulo con alérgenos se debía a una falta de respuesta específica a la OVA, ratones *fB* *-/-* y de tipo silvestre fueron sensibilizados y estimulados con ambrosía. Los ratones *fB* *-/-* sensibilizados y estimulados con ambrosía mostraron una disminución en la capacidad de respuesta a MCh, mientras que los *fB* *+/+* desarrollaron una fuerte respuesta a MCh (Figs. 6A y 6B). Del mismo modo, la inflamación de las vías respiratorias en el fluido del BAL se redujo en ratones *fB* *-/-* sensibilizados y estimulados con ambrosía en comparación con los *fB* *+/+* (Fig. 6C).

La administración del factor B reconstituye la capacidad de desarrollar AHR e inflamación de las vías respiratorias en ratones fB -/-

Para reconstituir el factor B en el pulmón, ratones *fB* *-/-* recibieron una sola aplicación intranasal de 10 μ g, 1 μ g, 0,1 μ g de factor B purificado (Fig. 7) o un PBS antes de cada estímulo de las vías respiratorias. Ratones *fB* *-/-* sensibilizados y estimulados tratados con 0,1 μ g de factor B antes de cada estimulación, mostraron una disminución de la respuesta a MCh, similar a los ratones *fB* *-/-* sensibilizados y estimulados tratados con PBS, pero significativamente menor en comparación con los ratones *fB* *+/+* sensibilizados y estimulados (Fig. 7A). Los ratones sensibilizados y estimulados tratados con 1 μ g de factor B purificado mostraron un ligero incremento, pero no estadísticamente diferente, en la reactividad de las vías respiratorias, en comparación con ratones *fB* *-/-* sensibilizados y estimulados tratados con PBS o 0,1 μ g de factor B purificado (Fig. 7A). Por el contrario, ratones *fB* *-/-* sensibilizados y estimulados tratados con 10 μ g de factor B purificado antes de cada estímulo de las vías respiratorias, mostraron un aumento de la respuesta a MCh, similar a la de los ratones *fB* *+/+* sensibilizados y estimulados.

También el tratamiento de ratones *fB* *-/-* sensibilizados y estimulados con 10 μ g de factor B purificado, antes de cada estimulación de las vías aéreas, aumentó la inflamación de las vías respiratorias y especialmente el número de eosinófilos en el fluido del BAL, similar al número observado en ratones *fB* *+/+* sensibilizados y estimulados, mientras que el tratamiento con 0,1 μ g o 1 μ g de factor B purificado no pudo aumentar el número de eosinófilos en el fluido del BAL (Fig. 7B). Si el factor B se administraba antes de cada estímulo de las vías respiratorias pero a receptores no sensibilizados, no se observó AHR o respuestas inflamatorias de las vías respiratorias, lo que indica que la fase de sensibilización era necesaria para que las respuestas se desarrollaran después del estímulo, y también muestra que la fase de sensibilización en los ratones *fB* *-/-* estaba intacta. Estos datos en los ratones *fB* *-/-* muestran directamente que el factor B de la vía alternativa es decisivo para el desarrollo de una enfermedad alérgica de las vías respiratorias.

El tratamiento con un anticuerpo neutralizante de fB inhibe el desarrollo de AHR en ratones sensibilizados y estimulados

Para evaluar el papel de la activación del complemento a través de la vía alternativa en ratones sensibilizados y estimulados que no carecían del gen, ratones C57BL/6 fueron sensibilizados tal y como se describe en los Métodos. El anticuerpo 1379 anti-factor B descrito en el Ejemplo 1 se administró por vía sistémica o local mediante nebulización, lo que ha demostrado ser una vía eficaz para la administración de otros inhibidores del complemento.

5 Ratones normales, tratados después de la sensibilización, pero durante la fase de estimulación con anti-factor B de modo sistémico o local (nebulización), mostraron una disminución significativa de la AHR (Figs. 8A y 8B), así como una inhibición de la inflamación de las vías respiratorias y de la eosinofilia en las vías respiratorias (Fig. 8C). Además, la inflamación del tejido, el número de eosinófilos peribronquiales (Tabla 2), así como el número de células caliciformes (Tabla 2) se redujeron en estos ratones tratados con anti-fB.

10 eran significativamente más bajos en el fluido del BAL de ratones tratados con el anticuerpo de fB (datos no mostrados). Del mismo modo, el tratamiento de ratones C4 -/- sensibilizados y estimulados con anti-factor B disminuyó la capacidad de respuesta de sus vías respiratorias y la inflamación de las vías respiratorias (Fig. 10). Estos resultados están de acuerdo con estudios que utilizan inhibidores del complemento que no discriminan entre las vías clásica y alternativa, pero que bloquean el desarrollo de una respuesta tardía de las vías respiratorias, así como AHR.

15

Referencias

1. Busse et al., 2001, *N Engl J Med* **344**:350-62
2. Lee et al., 2001, *J Allergy Clin Immunol* **107**:945-57
3. Henson P., 2000, *Nat Immunol* **1**:190-2
- 20 4. Humbles et al., 2000, *Nature* **406**:998-1001
5. Krug et al., 2001, *Am J Respir Crit Care Med* **164**:1841-3
6. Drouin et al., 2001, *J Immunol* **166**:2025-32
7. Karp et al., 2000, *Nat Immunol* **1**:221-6
8. Drouin et al., 2002, *J Immunol* **169**:5926-5933
- 25 9. Bautsch et al., 2000, *J Immunol* **165**:5401-5
10. Walters et al., 2002, *Am J Respir Cell Mol Biol* **27**:413-8
11. Kalli et al., 1994, *Springer Semin Immunopathol* **15**:417-31
12. Weisman et al., 1990, *Science* **249**:146-51
13. Wong y Fearon, 1985, *J Immunol* **134**:4048-56
- 30 14. Li et al., 1993, *J Immunol* **151**:4295-305
15. Kim et al., 1995, *J Exp Med* **181**:151-9
16. Quigg et al., 1998, *J Immunol* **160**:4553-60
17. Holers et al., 2002, *J Exp Med* **195**:211-20
18. Rehrig et al., 2001, *J Immunol* **167**:5921-7
- 35 19. Rah et al., 2003, *J Allergy Clin Immunol* **111**:A916
20. Takeda et al., 1997, *J Exp Med* **186**:449-54
21. Tomkinson et al., 2001, *Am J Respir Crit Care Med* **163**:721-30
22. Taube et al., 2002, *J Immunol* **169**:6482-9
23. Oshiba et al., 1996, *J Clin Invest* **97**:1398-408
- 40 24. Oshiba et al., 1997, *J Immunol* **159**:4056-63
25. Hamelmann et al., 1999, *Am J Respir Cell Mol Biol* **21**:480-9
26. Kohl, 2001, *Mol Immunol* **38**:175-87
27. Schwartz et al., 1983, *J Immunol* **130**:1891-5

28. Mulligan et al., 1996, *J Clin Invest* **98**:503-12
29. Czermak et al., 1999, *Nat Med* **5**:788-92
30. Holers, 2000, *Immunopharmacology* **49**:125-31
31. Drouin et al., 2001, *J Immunol* **167**:4141-5
- 5 32. Carroll, 1998, *Annu. Rev. Immunol.* **16**:545-68
33. Fischer et al., 1996, *J Immunol* **157**:549-56
34. Wittmann et al., 1999, *J Immunol* **162**:6763-9
35. Braun et al., 2000, *J Immunol* **164**:3009-17
36. Abe et al., 2001, *J Immunol* **167**:4651-60
- 10 37. Hamelmann et al., 1999, *Am J Respir Crit Care Med* **160**:934-41
38. Hamelmann et al., 1997, *Am J Respir Crit Care Med* **155**:819-25
39. Corry et al., 1996, *J Exp Med* **183**:109-17
40. Wills-Karp et al., 1998, *Science* **282**:2258-61
41. Grunig et al., 1998, *Science* **282**:2261-3
- 15 42. Kopf et al., 2002, *Nat Med* **8**:373-8
43. Werfel et al., 2000, *J Immunol* **165**:6599-605
44. La Flamme et al., 2003, *J Immunol* **170**:470-476
45. Takafuji et al., 1996, *Allergy* **51**:563-8
46. DiScipio et al., 1999, *Immunol* **162**:1127-36
- 20 47. Elsner et al., 1994, *Blood* **83**:3324-31
48. Elsner et al., 1994, *Eur J Immunol* **24**:518-22

Ejemplo 3

- El siguiente ejemplo describe datos adicionales de la unión para un panel de anticuerpos anti-factor B producidos por los presentes inventores. Los ensayos se utilizaron para someter a ensayo la unión y/o la inhibición de la unión del factor B de ratón y del factor B humano, con diversos anticuerpos. Como se puede observar, el AcM 1379 se une e inhibe tanto el factor B de ratón como el humano. Por el contrario, el AcM denominado 624 se puede unir tanto al factor B de ratón como humano, pero no inhibe la vía alternativa humana. Un ELISA de competencia se utilizó para evaluar adicionalmente los anticuerpos. Como se puede observar, los anticuerpos 624, 691 y 1231 no bloquean la unión con 1379. Por tanto, estos anticuerpos se tienen que unir a la proteína en un sitio diferente, explicando por qué se unen al factor B sin inhibir su función *in vitro*. Sin embargo, los anticuerpos 395, 1322 y 1060 son inhibidores competitivos de 1379.

Tabla 4

Clon	Isotipo	Se une a fB de ratón	Se une a fB humano	Inhibe la vía alternativa de ratón (ensayo de zimosano)	Inhibe la vía alternativa humana (ensayo de lisis eritrocitaria de conejo)	Compite con 1379 en la unión a fB humano
1379	IgG1 κ	+++	+++	+++	+++	+++
395	IgG1 κ	+++	++	++	+++	+++
1322	IgG2b κ	+++	+++	+	++	+++

624	IgG1 κ	+++	+++	+	-	-
691	IgG1 κ	+++	+++	+	-	-
1060	IgG2b κ	+++	+++	+	++	++
1231	IgG1	+++	+++	+	-	-
E1128		-	+++	-	0	NA

Ejemplo 4

El siguiente ejemplo describe el cartografiado de epítomos de AcM 1379 en la superficie del factor B humano.

5 Los primeros experimentos para cartografiar el epítopo para el anticuerpo AcM 1379 indican que el epítopo o el sitio de unión del anticuerpo sobre el factor B no era lineal. El anticuerpo se une ávidamente a la proteína de longitud completa cuando se adhiere a una placa de ELISA. Los péptidos que tenían 10 aminoácidos de longitud se construyeron para abarcar la región de la proteína en donde se sabe que se produce la unión (SCR2-3). Cuando estos péptidos se adhirieron a una placa de ELISA, el anticuerpo no los reconoció, lo que indica que ninguna de estas secuencias lineales era reconocida como el epítopo.

10 Se creó un modelo de la superficie de unión conservada prevista o del epítopo del factor B humano que es reconocido por el AcM 1379. En pocas palabras, la estructura terciaria del factor B humano se construyó basándose en la estructura tridimensional determinada de CR2-SCR1-2 (identificación del Protein Data Bank (PDB) 1GHQ). El modelo final fue refinado al estado de energía mínima, con las limitaciones fijadas en los cuatro residuos Cys absolutamente conservados de cada SCR. La identidad de secuencia de SCR2-3 del factor B con SCR1-2 de CR2
15 es del 30% (la más alta), con SCR 15-16 del factor H del 25%, con CD46 del 20%. La Fig. 11 muestra el modelo de la estructura del factor B indicando las posiciones de los aminoácidos correspondientes al epítopo de AcM 1379 (en relación a SEQ ID NO: 2). Los residuos que se cree que forman el epítopo conformacional para el anticuerpo AcM 1379 son: Ala137, Tyr139, Ser141, Glu182, Ser185, Thr189, Glu190 y Ser192, aunque el epítopo puede contener solo unos pocos, sustancialmente todos o más residuos de los que se representan en la Fig. 11.

20 Este modelo se puede utilizar ahora para predecir los efectos de los mutantes del factor B descritos previamente por Hourcade (Hourcade, 1995, *J. Biol. Chem.*) que se emplearon inicialmente para caracterizar el epítopo del anticuerpo AcM 1379 (véase el Ejemplo 1). A continuación se muestran cuatro mutantes de este panel que contienen residuos pertenecientes al modelo de epítopo de AcM 1379, tal y como se muestra en la Fig. 11. Como se muestra a continuación, los mutantes B17 y B23, que mostraron en el Ejemplo 1 reducir la unión de AcM 1379,
25 tienen sustituciones particulares (indicadas en negrita y cursiva) que se han previsto que estén hacia adentro y, por lo tanto, que tal vez alteren la estructura del epítopo o de la superficie de unión conservada de AcM 1379. El mutante B16/17, a pesar de que contiene residuos que se encuentran dentro del epítopo modelado para AcM 1379, no se prevé que tenga mutaciones que puedan alterar la estructura del epítopo, lo que puede explicar por qué este mutante se une al anticuerpo en los experimentos iniciales de cartografiado. Del mismo modo, aunque el mutante
30 B23/24 también contiene residuos que están dentro del epítopo modelado para AcM 1379, este mutante también se une al anticuerpo en los experimentos iniciales de cartografiado, en donde los residuos que forman los sitios de contacto del anticuerpo no están probablemente alterados por las mutaciones. Este experimento también ilustra que el anticuerpo de la invención se puede unir a proteínas del factor B, o a porciones de las mismas, que tienen mutaciones conservadoras o mutaciones que no alteran sustancialmente este epítopo.

35 B17: Y139-C140-S141

Sus: H ***P***

B23: E182-G183-G184-S185

Sus: G ***N*** ***V***

B16/17: G136-A137-G138

40 Sus: ***N*** ***S*** ***S***

B23/24: S187-G188-T189-E190-P191-S192

Sus: ***D*** ***E*** ***T*** ***A*** ***V***

La Fig. 12 es un dibujo esquemático que muestra un complejo modelado de AcM 1379 (un fragmento Fab) que se une al factor B, en donde los lados que se unen al antígeno del Fab se han modelado para cubrir toda la región del

epítipo cartografiada, tal y como se definió anteriormente en la Fig. 11.

Ejemplo 5

El ejemplo siguiente muestra que la inhibición de la vía alternativa del complemento y, específicamente, la inhibición del factor B, inhibe y protege a los animales de una lesión renal por isquemia-reperfusión.

- 5 Se han realizado experimentos para someter a ensayo la eficacia del AcM 1379 para mejorar la lesión en el modelo de insuficiencia renal aguda isquémica. En este modelo, la insuficiencia renal aguda isquémica es inducida anestesiando los ratones y sujetando con pinzas los pedículos renales durante 24 minutos. A los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal 1 mg del AcM una hora antes de la inducción de la lesión. Este protocolo provoca una forma reversible de insuficiencia renal aguda isquémica, en donde la lesión máxima se presenta típicamente 24
- 10 horas después de que se retiran las pinzas de los pedículos renales y se restaurara el flujo sanguíneo en el riñón. La lesión renal se evaluó a continuación midiendo la acumulación de desechos nitrogenados tales como SUN y creatinina sérica y determinando la lesión morfológica de los riñones a través de un patólogo renal. Los inventores han mostrado que la vía alternativa del complemento se activa poco después de la reperfusión de los riñones y que esta activación contribuye a la lesión renal resultante.
- 15 El examen de los riñones por inmunofluorescencia y análisis de transferencia Western confirmó que el anticuerpo 1379 descrito en este documento, evitaba eficazmente la activación del complemento después de I/R. Tal y como se muestra en la Fig. 13, los ratones que se habían tratado previamente con 1379 mostraban aumentos leves en nitrógeno ureico sérico (SUN) 24 horas después de la reperfusión, en comparación con testigos de tipo silvestre (78 ± 15 mg/dL frente a 119 ± 15 mg/dL, $p < 0,05$, $n = 11$ para cada grupo). La lesión histológica también fue más leve en los ratones que se habían tratado con 1379. Cuando fueron catalogados por un patólogo de una manera ciega, los ratones tratados con 1379 mostraron una lesión tubular significativamente menor que los ratones testigos ($3,3 \pm 0,5$ frente a $4,9 \pm 0,1$, $p < 0,01$, $n = 10$ para cada grupo). Por lo tanto, 1379 impide eficazmente la activación del complemento en el riñón de ratón después de I/R, y el tratamiento previo con 1379 aminora la lesión funcional e histológica después de I/R.
- 20
- 25 En otro experimento, células epiteliales tubulares renales en cultivo se sometieron a dos horas de anoxia química, incubándolas con antimicina. Las células se expusieron a continuación a suero de ratón de nuevo aporte (como fuente de complemento), y la deshidrogenasa de lactato (LDH) se midió como un marcador de la muerte celular, y se expresó en unidades arbitrarias utilizando un ensayo comercial (Promega, Madison, WI). Las células que se habían expuesto a antimicina y a suero liberaban una cantidad significativamente mayor de LDH que las células expuestas únicamente a suero (100.140 ± 3307 para antimicina + suero frente a 69.255 ± 9754 , $p < 0,05$; datos no mostrados). Sin embargo, cuando el suero se incubó con el AcM 1379 antes de la incubación con las células, la liberación de LDH se redujo a 76.471 ± 7720 ($p < 0,01$ frente a las células tratadas con antimicina + suero; datos no mostrados). Por ello, el AcM 1379 protege a las células epiteliales tubulares renales hipóxicas que están expuestas a componentes de la vía alternativa ya sea *in vivo* o *in vitro*.
- 30
- 35 Si bien diversas realizaciones de la presente invención se han descrito con detalle, es evidente que los expertos en la técnica podrán realizar modificaciones y adaptaciones de esas realizaciones. Se debe entender expresamente, sin embargo, que tales modificaciones y adaptaciones están dentro del alcance de la presente invención, tal y como se establece en las siguientes reivindicaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Holers, Vernon Thurman, Joshua Taube, Christian Gelfand, Erwin Gilkeson, Gary

5 <120> Inhibición del factor B, de la vía alternativa del complemento y métodos relacionados.

<130> 2848-66-PCT

<150> 60/543,594

10 <151> 10-02-2004

<150> 60/636,239

<151> 14-12-2004

15 <150> US04/015040

<151> 13-05-2004

<160> 6

20 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 764

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Ser Asn Leu Ser Pro Gln Leu Cys Leu Met Pro Phe Ile Leu
 1 5 10 15

Gly Leu Leu Ser Gly Gly Val Thr Thr Thr Pro Trp Ser Leu Ala Arg
 20 25 30

Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser
 35 40 45

Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser
 50 55 60

Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly
 65 70 75 80

Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp Gln Lys Thr Val Arg Lys Ala
 85 90 95

Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg Pro His Asp Phe Glu Asn Gly
 100 105 110

Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr Asn Val Ser Asp Glu ile Ser
 115 120 125

Phe His Cys Tyr Asp Gly Tyr Thr Leu Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr
 130 135 140

ES 2 432 112 T3

Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn
145 150 155 160

Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys
165 170 175

Val Gly Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp Ser Val Thr Tyr His Cys Ser
180 185 190

Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly
195 200 205

Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr
210 215 220

Asp Thr Pro Gln Glu Val Ala Glu Ala Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu
225 230 235 240

Thr Ile Glu Gly Val Asp Ala Glu Asp Gly His Gly Pro Gly Glu Gln
245 250 255

Gln Lys Arg Lys Ile Val Leu Asp Pro Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr
260 265 270

Leu Val Leu Asp Gly Ser Asp Ser Ile Gly Ala Ser Asn Phe Thr Gly
275 280 285

Ala Lys Lys Cys Leu Val Asn Leu Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr Gly
290 295 300

Val Lys Pro Arg Tyr Gly Leu Val Thr Tyr Ala Thr Tyr Pro Lys Ile
305 310 315 320

Trp Val Lys Val Ser Glu Ala Asp Ser Ser Asn Ala Asp Trp Val Thr
325 330 335

Lys Gln Leu Asn Glu Ile Asn Tyr Glu Asp His Lys Leu Lys Ser Gly
340 345 350

Thr Asn Thr Lys Lys Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met Met Ser Trp
355 360 365

Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile
370 375 380

Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr
385 390 395 400

Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys

ES 2 432 112 T3

				405						410						415
Asn	Pro	Arg	Glu	Asp	Tyr	Leu	Asp	Val	Tyr	Val	Phe	Gly	Val	Gly	Pro	
			420					425					430			
Leu	Val	Asn	Gln	Val	Asn	Ile	Asn	Ala	Leu	Ala	Ser	Lys	Lys	Asp	Asn	
		435					440					445				
Glu	Gln	His	Val	Phe	Lys	Val	Lys	Asp	Met	Glu	Asn	Leu	Glu	Asp	Val	
	450					455					460					
Phe	Tyr	Gln	Met	Ile	Asp	Glu	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Cys	Gly	Met	
465					470					475					480	
Val	Trp	Glu	His	Arg	Lys	Gly	Thr	Asp	Tyr	His	Lys	Gln	Pro	Trp	Gln	
				485					490						495	
Ala	Lys	Ile	Ser	Val	Ile	Arg	Pro	Ser	Lys	Gly	His	Glu	Ser	Cys	Met	
			500					505						510		
Gly	Ala	Val	Val	Ser	Glu	Tyr	Phe	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Phe	
		515					520						525			
Thr	Val	Asp	Asp	Lys	Glu	His	Ser	Ile	Lys	Val	Ser	Val	Gly	Gly	Glu	
	530					535					540					
Lys	Arg	Asp	Leu	Glu	Ile	Glu	Val	Val	Leu	Phe	His	Pro	Asn	Tyr	Asn	
545					550					555					560	
Ile	Asn	Gly	Lys	Lys	Glu	Ala	Gly	Ile	Pro	Glu	Phe	Tyr	Asp	Tyr	Asp	
				565					570					575		
Val	Ala	Leu	Ile	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Leu	Lys	Tyr	Gly	Gln	Thr	Ile	
			580					585						590		
Arg	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Cys	Thr	Glu	Gly	Thr	Thr	Arg	Ala	Leu	Arg	
		595					600					605				
Leu	Pro	Pro	Thr	Thr	Thr	Cys	Gln	Gln	Gln	Lys	Glu	Glu	Leu	Leu	Pro	
	610					615					620					
Ala	Gln	Asp	Ile	Lys	Ala	Leu	Phe	Val	Ser	Glu	Glu	Glu	Lys	Lys	Leu	
625					630					635					640	
Thr	Arg	Lys	Glu	Val	Tyr	Ile	Lys	Asn	Gly	Asp	Lys	Lys	Gly	Ser	Cys	
				645					650					655		
Glu	Arg	Asp	Ala	Gln	Tyr	Ala	Pro	Gly	Tyr	Asp	Lys	Val	Lys	Asp	Ile	
			660					665						670		

ES 2 432 112 T3

Ser Glu Val Val Thr Pro Arg Phe Leu Cys Thr Gly Gly Val Ser Pro
675 680 685

Tyr Ala Asp Pro Asn Thr Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile
690 695 700

Val His Lys Arg Ser Arg Phe Ile Gln Val Gly Val Ile Ser Trp Gly
705 710 715 720

Val Val Asp Val Cys Lys Asn Gln Lys Arg Gln Lys Gln Val Pro Ala
725 730 735

His Ala Arg Asp Phe His Ile Asn Leu Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu
740 745 750

Lys Glu Lys Leu Gln Asp Glu Asp Leu Gly Phe Leu
755 760

<210> 2

<211> 739

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Thr Pro Trp Ser Leu Ala Arg Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala
20 25 30

Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr
35 40 45

Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp
50 55 60

Gln Lys Thr Val Arg Lys Ala Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg
65 70 75 80

Pro His Asp Phe Glu Asn Gly Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr
85 90 95

Asn Val Ser Asp Glu Ile Ser Phe His Cys Tyr Asp Gly Tyr Thr Leu
100 105 110

Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly
115 120 125

Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly
130 135 140

10

ES 2 432 112 T3

Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys Val Gly Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp
145 150 155 160

Ser Val Thr Tyr His Cys Ser Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln
165 170 175

Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser
180 185 190

Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr Asp Thr Pro Gln Glu Val Ala Glu Ala
195 200 205

Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu Thr Ile Glu Gly Val Asp Ala Glu Asp
210 215 220

Gly His Gly Pro Gly Glu Gln Gln Lys Arg Lys Ile Val Leu Asp Pro
225 230 235 240

Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr Leu Val Leu Asp Gly Ser Asp Ser Ile
245 250 255

Gly Ala Ser Asn Phe Thr Gly Ala Lys Lys Cys Leu Val Asn Leu Ile
260 265 270

Glu Lys Val Ala Ser Tyr Gly Val Lys Pro Arg Tyr Gly Leu Val Thr
275 280 285

Tyr Ala Thr Tyr Pro Lys Ile Trp Val Lys Val Ser Glu Ala Asp Ser
290 295 300

Ser Asn Ala Asp Trp Val Thr Lys Gln Leu Asn Glu Ile Asn Tyr Glu
305 310 315 320

Asp His Lys Leu Lys Ser Gly Thr Asn Thr Lys Lys Ala Leu Gln Ala
325 330 335

Val Tyr Ser Met Met Ser Trp Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp
340 345 350

Asn Arg Thr Arg His Val Ile Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn
355 360 365

Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu
370 375 380

Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val
385 390 395 400

Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala
405 410 415

ES 2 432 112 T3

Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp
 420 425 430

Met Glu Asn Leu Glu Asp Val Phe Tyr Gln Met Ile Asp Glu Ser Gln
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp
 450 455 460

Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln Ala Lys Ile Ser Val Ile Arg Pro Ser
 465 470 475 480

Lys Gly His Glu Ser Cys Met Gly Ala Val Val Ser Glu Tyr Phe Val
 485 490 495

Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Thr Val Asp Asp Lys Glu His Ser Ile
 500 505 510

Lys Val Ser Val Gly Gly Glu Lys Arg Asp Leu Glu Ile Glu Val Val
 515 520 525

Leu Phe His Pro Asn Tyr Asn Ile Asn Gly Lys Lys Glu Ala Gly Ile
 530 535 540

Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp Val Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys
 545 550 555 560

Leu Lys Tyr Gly Gln Thr Ile Arg Pro Ile Cys Leu Pro Cys Thr Glu
 565 570 575

Gly Thr Thr Arg Ala Leu Arg Leu Pro Pro Thr Thr Thr Cys Gln Gln
 580 585 590

Gln Lys Glu Glu Leu Leu Pro Ala Gln Asp Ile Lys Ala Leu Phe Val
 595 600 605

Ser Glu Glu Glu Lys Lys Leu Thr Arg Lys Glu Val Tyr Ile Lys Asn
 610 615 620

Gly Asp Lys Lys Gly Ser Cys Glu Arg Asp Ala Gln Tyr Ala Pro Gly
 625 630 635 640

Tyr Asp Lys Val Lys Asp Ile Ser Glu Val Val Thr Pro Arg Phe Leu
 645 650 655

Cys Thr Gly Gly Val Ser Pro Tyr Ala Asp Pro Asn Thr Cys Arg Gly
 660 665 670

Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile Val His Lys Arg Ser Arg Phe Ile Gln
 675 680 685

ES 2 432 112 T3

Val Gly Val Ile Ser Trp Gly Val Val Asp Val Cys Lys Asn Gln Lys
 690 695 700

Arg Gln Lys Gln Val Pro Ala His Ala Arg Asp Phe His Ile Asn Leu
 705 710 715 720

Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu Lys Glu Lys Leu Gln Asp Glu Asp Leu
 725 730 735

Gly Phe Leu

<210> 3

<211> 70

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Arg Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly Val Glu Ile Lys Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala Leu Glu Tyr Val Cys
 20 25 30

Pro Ser Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr Arg Thr Cys Arg Ser
 35 40 45

Thr Gly Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp Gln Lys Thr Val Arg
 50 55 60

Lys Ala Glu Cys Arg Ala
 65 70

10

<210> 4

<211> 60

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 4

Ile His Cys Pro Arg Pro His Asp Phe Glu Asn Gly Glu Tyr Trp Pro
 1 5 10 15

Arg Ser Pro Tyr Tyr Asn Val Ser Asp Glu Ile Ser Phe His Cys Tyr
 20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Leu Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr Cys Gln Val Asn
 35 40 45

Gly Arg Trp Ser Gly Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn
 50 55 60

20

<210> 5

<211> 48

<212> PRT

ES 2 432 112 T3

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys Val Gly
1 5 10 15

Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp Ser Val Thr Tyr His Cys Ser Arg Gly
20 25 30

Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly Gly Ser
35 40 45

5

<210> 6

<211> 761

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<400> 6

Met Glu Ser Pro Gln Leu Cys Leu Val Leu Leu Val Leu Gly Phe Ser
1 5 10 15

Ser Gly Gly Val Ser Ala Thr Pro Val Leu Glu Ala Arg Pro Gln Val
20 25 30

Ser Cys Ser Leu Glu Gly Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser Phe Gln Leu
35 40 45

Leu Gln Gly Gly Gln Ala Leu Glu Tyr Leu Cys Pro Ser Gly Phe Tyr
50 55 60

Pro Tyr Pro Val Gln Thr Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly Ser Trp Ser
65 70 75 80

Asp Leu Gln Thr Arg Asp Gln Lys Ile Val Gln Lys Ala Glu Cys Arg
85 90 95

Ala Ile Arg Cys Pro Arg Pro Gln Asp Phe Glu Asn Gly Glu Phe Trp
100 105 110

Pro Arg Ser Pro Phe Tyr Asn Leu Ser Asp Gln Ile Ser Phe Gln Cys
115 120 125

Tyr Asp Gly Tyr Val Leu Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr Cys Gln Glu
130 135 140

Asn Gly Arg Trp Asp Gly Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asp Gly Ala Gly
145 150 155 160

ES 2 432 112 T3

Tyr Cys Pro Asn Pro Gly Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys Val Gly Ser
 165 170 175
 Gln Tyr Arg Leu Glu Asp Ile Val Thr Tyr His Cys Ser Arg Gly Leu
 180 185 190
 Val Leu Arg Gly Ser Gln Lys Arg Lys Cys Gln Glu Gly Gly Ser Trp
 195 200 205
 Ser Gly Thr Glu Pro Ser Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr Asp Ser Pro
 210 215 220
 Gln Glu Val Ala Glu Ala Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu Thr Ile Glu
 225 230 235 240
 Gly Ala Asp Ala Glu Asp Gly His Ser Pro Gly Glu Gln Gln Lys Arg
 245 250 255
 Lys Ile Val Leu Asp Pro Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr Leu Val Leu
 260 265 270
 Asp Gly Ser Asp Ser Ile Gly Ser Ser Asn Phe Thr Gly Ala Lys Arg
 275 280 285
 Cys Leu Thr Asn Leu Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr Gly Val Arg Pro
 290 295 300
 Arg Tyr Gly Leu Leu Thr Tyr Ala Thr Val Pro Lys Val Leu Val Arg
 305 310 315 320
 Val Ser Asp Glu Arg Ser Ser Asp Ala Asp Trp Val Thr Glu Lys Leu
 325 330 335
 Asn Gln Ile Ser Tyr Glu Asp His Lys Leu Lys Ser Gly Thr Asn Thr
 340 345 350
 Lys Arg Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met Met Ser Trp Ala Gly Asp
 355 360 365
 Ala Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile Ile Ile Met
 370 375 380
 Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asn Pro Val Thr Val Ile Gln
 385 390 395 400
 Asp Ile Arg Ala Leu Leu Asp Ile Gly Arg Asp Pro Lys Asn Pro Arg
 405 410 415
 Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro Leu Val Asp
 420 425 430

ES 2 432 112 T3

Ser Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn Glu His His
435 440 445

Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asp Leu Glu Asn Val Phe Tyr Gln
450 455 460

Met Ile Asp Glu Thr Lys Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met Val Trp Glu
465 470 475 480

His Lys Lys Gly Asn Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln Ala Lys Ile
485 490 495

Ser Val Thr Arg Pro Leu Lys Gly His Glu Thr Cys Met Gly Ala Val
500 505 510

Val Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Met Val Asp
515 520 525

Asp Gln Lys His Ser Ile Lys Val Ser Val Gly Gly Gln Arg Arg Asp
530 535 540

Leu Glu Ile Glu Glu Val Leu Phe His Pro Lys Tyr Asn Ile Asn Gly
545 550 555 560

Lys Lys Ala Glu Gly Ile Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp Val Ala Leu
565 570 575

Val Lys Leu Lys Asn Lys Leu Lys Tyr Gly Gln Thr Leu Arg Pro Ile
580 585 590

Cys Leu Pro Cys Thr Glu Gly Thr Thr Arg Ala Leu Arg Leu Pro Gln
595 600 605

Thr Ala Thr Cys Lys Gln His Lys Glu Gln Leu Leu Pro Val Lys Asp
610 615 620

Val Lys Ala Leu Phe Val Ser Glu Gln Gly Lys Ser Leu Thr Arg Lys
625 630 635 640

Glu Val Tyr Ile Lys Asn Gly Asp Lys Lys Ala Ser Cys Glu Arg Asp
645 650 655

Ala Thr Lys Ala Gln Gly Tyr Glu Lys Val Lys Asp Ala Ser Glu Val
660 665 670

Val Thr Pro Arg Phe Leu Cys Thr Gly Gly Val Asp Pro Tyr Ala Asp
675 680 685

Pro Asn Thr Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile Val His Lys
690 695 700

ES 2 432 112 T3

Arg Ser Arg Phe Ile Gln Val Gly Val Ile Ser Trp Gly Val Val Asp
705 710 715 720

Val Cys Arg Asp Gln Arg Arg Gln Gln Leu Val Pro Ser Tyr Ala Arg
725 730 735

Asp Phe His Ile Asn Leu Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu Lys Asp Lys
740 745 750

Leu Lys Asp Glu Asp Leu Gly Phe Leu
755 760

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a antígeno que se une selectivamente al factor B dentro del tercer dominio de la repetición corta de consenso (SCR) y que se une selectivamente al factor B procedente de al menos ser humano y ratón, en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno evita la formación de un complejo C3bBb.
2. El anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a antígeno según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno se une al factor B y evita o inhibe la escisión del factor B por el factor D.
- 10 3. El anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a antígeno según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno se une al tercer dominio de la repetición corta de consenso (SCR) del factor B humano.
4. El anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a antígeno según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno se une selectivamente a un epítipo en el tercer dominio de SCR del factor B seleccionado entre el grupo que consiste en:
- 15 (a) un epítipo del factor B que incluye al menos una porción del factor B humano (SEQ ID NO: 2) que comprende desde la posición Tyr139 hasta la posición Ser185, o posiciones equivalentes a las mismas en una secuencia de factor B no humano;
- (b) un epítipo del factor B que incluye al menos una porción del factor B humano (SEQ ID NO: 2) que comprende desde la posición Tyr139 hasta la posición Ser141, o posiciones equivalentes a las mismas en una secuencia de factor B no humano;
- 20 (c) un epítipo del factor B que incluye al menos una porción del factor B humano (SEQ ID NO: 2) que comprende desde la posición Glu182 hasta la posición Ser185, o posiciones equivalentes a las mismas en una secuencia de factor B no humano; y
- (d) un epítipo del factor B que incluye al menos una porción del factor B humano (SEQ ID NO: 2) que comprende una cualquiera o varias de las siguientes posiciones o de sus posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano: Tyr139, Cys140, Ser141, Glu182, Gly184 o Ser185.
- 25 5. El anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a antígeno según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es de una subclase o de un isotipo que no activa el complemento.
- 30 6. El anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a antígeno según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
7. El anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a antígeno según la reivindicación 1, en el que el fragmento que se une a antígeno es un fragmento Fab.
8. El anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a antígeno según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 35 9. El anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a antígeno según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.
10. El anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a antígeno según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monovalente.
- 40 11. El anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a antígeno según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 1379 producido por la ATCC n° de depósito PTA-6230.
12. El anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a antígeno según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o el fragmento del mismo que se une a antígeno se une al factor B en el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 1379 producido por la ATCC n° de depósito PTA-6230.
- 45 13. Un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a antígeno que se une selectivamente al factor B, en el que el anticuerpo o el fragmento del mismo que se une a antígeno evita la formación de un complejo C3bBb; en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo que se une a antígeno inhibe competitivamente la unión específica del anticuerpo monoclonal 1379 producido por el depósito de la ATCC n° PTA-6230 con el factor B humano y de ratón; y en el que, cuando el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno se une al factor B humano, se inhibe la capacidad del anticuerpo monoclonal 1379 para inhibir la vía alternativa del complemento.
- 50 14. El anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno según la reivindicación 13, en el que el anticuerpo o el fragmento del mismo que se une a antígeno inhibe competitivamente la unión del anticuerpo

monoclonal 1379 al factor B humano, en donde la especificidad de unión comparativa se determina por un ensayo de competencia anticuerpo-anticuerpo en presencia de factor B humano.

- 5 15. Un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a antígeno que se une selectivamente al factor B humano, en el que el anticuerpo o el fragmento del mismo que se une a antígeno evita la formación de un complejo C3bBb; en donde el anticuerpo aislado o el fragmento del mismo que se une a antígeno inhibe competitivamente la unión específica de un segundo anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno, al factor B humano; y en donde el segundo anticuerpo o el fragmento del mismo que se une a antígeno se une al tercer dominio de SCR del factor B humano, y se une selectivamente al factor B procedente de al menos ser humano y ratón.
- 10 16. Una composición que comprende el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a antígeno, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
- 15 17. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para uso en un método para reducir o prevenir la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) o la inflamación de las vías respiratorias en un animal que tiene hiperreactividad de las vías respiratorias asociada con inflamación o inflamación de las vías respiratorias o que tiene riesgo de desarrollarlas.
18. El anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno según la reivindicación 17, para el uso según se ha reivindicado en la reivindicación 17, en donde el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno se administra al animal en una cantidad eficaz para reducir de forma medible la hiperreactividad de las vías respiratorias en el animal, en comparación con antes de la administración del anticuerpo o del fragmento que se une a antígeno.
- 20 19. El anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno según la reivindicación 17, para el uso según se ha reivindicado en la reivindicación 17, en donde el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno se administra al animal en una cantidad eficaz para reducir de forma medible la hiperreactividad de las vías respiratorias en el animal, en comparación con el nivel de hiperreactividad de las vías respiratorias en una población de animales que tienen inflamación en la que no se administró el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno.
- 25 20. El anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno según la reivindicación 17, para el uso según se ha reivindicado en la reivindicación 17, en donde la administración del anticuerpo o del fragmento que se une a antígeno disminuye la capacidad de respuesta del animal frente a metacolina o histamina.
- 30 21. El anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno según la reivindicación 17, para el uso según se ha reivindicado en la reivindicación 17, en donde el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno se administra con un vehículo farmacéuticamente adecuado seleccionado entre el grupo que consiste en: un polvo seco, dispersable; etanol anhidro; cápsulas pequeñas; liposomas; una pulverización nebulizada; y un excipiente inyectable.
- 35 22. El anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno según la reivindicación 17, para el uso según se ha reivindicado en la reivindicación 17, en el que el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno se administra en un vehículo o un dispositivo seleccionado entre el grupo que consiste en: etanol anhidro; un sistema de inhalación de polvo seco; un sistema de inhalación por ultrasonidos; un inhalador de dosis medida a presión; y un dispositivo de solución medida.
- 40 23. El anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno según la reivindicación 17, para el uso según se ha reivindicado en la reivindicación 17, en el que dicho anticuerpo o fragmento que se une a antígeno se administra a dicho mamífero en combinación con un agente seleccionado entre el grupo que consiste en: corticosteroides, β -agonistas (de acción prolongada o corta), modificadores de leucotrienos, antihistamínicos, inhibidores de fosfodiesterasas, cromoglicato de sodio, Nedocromil, teofilina, antagonistas de citocinas, antagonistas del receptor de citocinas, anti-IgE e inhibidores de la función de los linfocitos T.
- 45 24. El anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno según la reivindicación 17, para el uso según se ha reivindicado en la reivindicación 17, en el que dicha hiperreactividad de las vías respiratorias o inflamación de las vías respiratorias está asociada con una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonía por hipersensibilidad, neumonía eosinofílica, enfisema, bronquitis, bronquitis alérgica, bronquiectasia, fibrosis quística, tuberculosis, neumonitis por hipersensibilidad, asma ocupacional, sarcoidosis, síndrome de enfermedad de las vías respiratorias reactivas, enfermedad pulmonar intersticial, síndrome hipereosinofílico, rinitis, sinusitis, asma inducida por el ejercicio, asma inducida por la contaminación, tos variante de asma, enfermedad pulmonar parasitaria, infección por el virus sincitial respiratorio (VSR), infección por el virus de la parainfluenza (VPI), infección por rinovirus (RV) e infección por adenovirus.
- 50 25. El anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno según la reivindicación 17, para el uso según se ha reivindicado en la reivindicación 17, en el que la hiperreactividad de las vías respiratorias está asociada con la inflamación alérgica.
- 55 26. El anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno según la reivindicación 17, para el uso según se ha

reivindicado en la reivindicación 17, en el que la hiperreactividad de las vías respiratorias o la inflamación de las vías respiratorias está asociada con asma.

- 5 27. El anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno según la reivindicación 17, para el uso según se ha reivindicado en la reivindicación 17, en el que la hiperreactividad de las vías respiratorias o la inflamación de las vías respiratorias está asociada con EPOC.
28. El anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para uso en un método para reducir o evitar la lesión por isquemia-reperfusión en un animal que tiene lesión por isquemia-reperfusión o que tiene el riesgo de desarrollarla.
- 10 29. El anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno según la reivindicación 28, para uso según se reivindica en la reivindicación 28, en donde la lesión por isquemia-reperfusión es una lesión renal por isquemia-reperfusión.
- 15 30. El anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno según la reivindicación 28, para uso según se reivindica en la reivindicación 28, en donde el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno se administra al animal en una cantidad eficaz para inhibir de forma medible incrementos en el nitrógeno sérico ureico en el animal en comparación con la ausencia de administración del anticuerpo o del fragmento que se une a antígeno.
31. El anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno según la reivindicación 28, para uso según se reivindica en la reivindicación 28, en donde el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno se administra al animal en una cantidad eficaz para disminuir de forma medible la lesión histológica de los tejidos del riñón del animal en comparación con la ausencia de administración del anticuerpo o del fragmento que se une a antígeno.
- 20 32. El anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 17-31, para el uso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 17-31, en donde el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno se administra a través de una vía seleccionada entre el grupo que consiste en las vías oral, nasal, tópica, inhalada, intratraqueal, transdérmica, rectal y parenteral.
- 25 33. El anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 17-32, para el uso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 17-32, en donde el animal es un mamífero.
34. El anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 17-32, para el uso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 17-32, en donde el animal es un ser humano.

Fig. 1

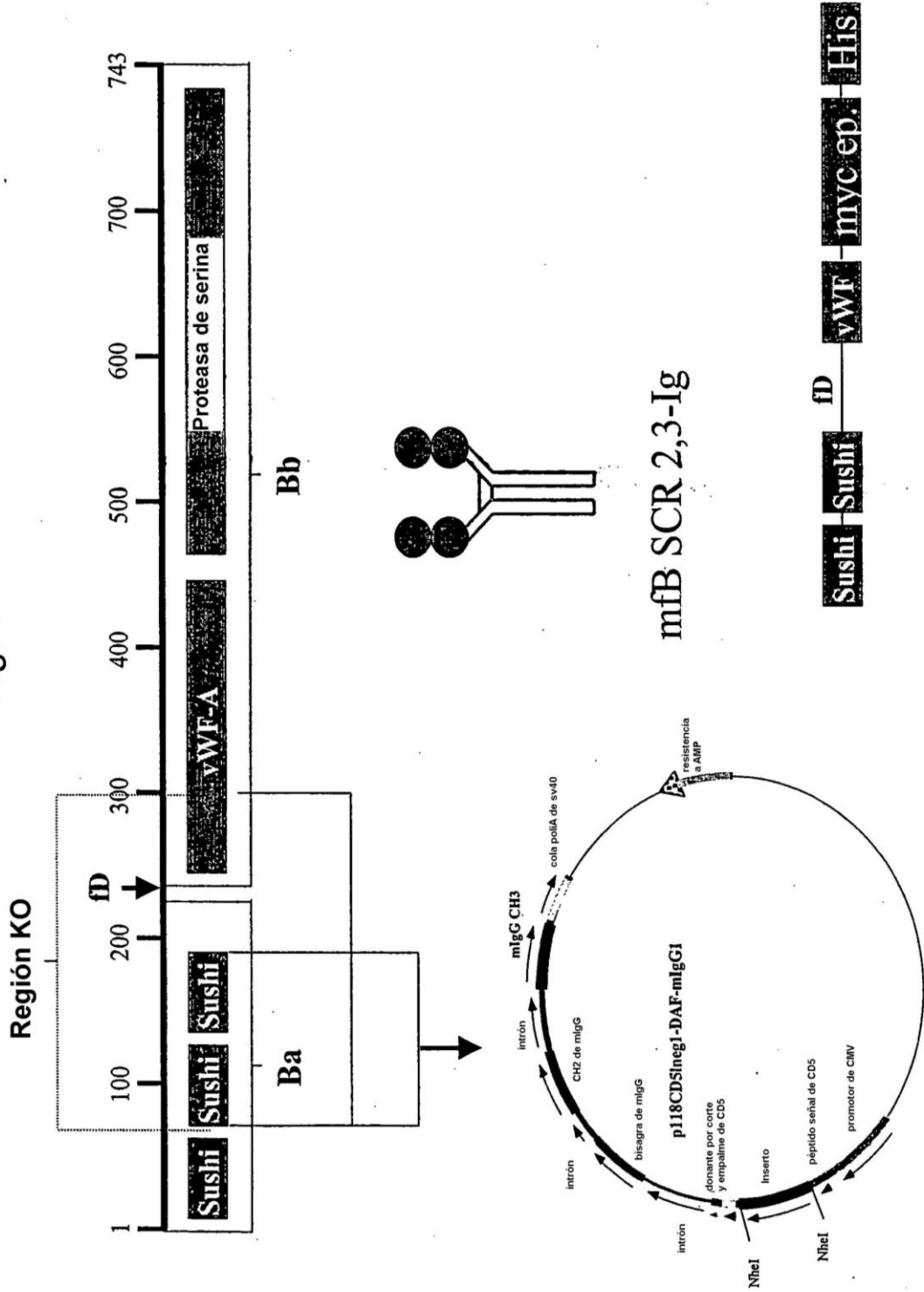


Fig. 2A

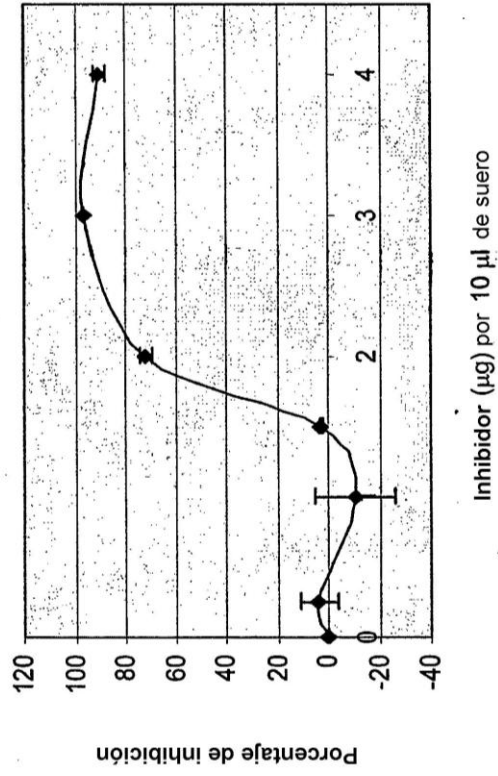
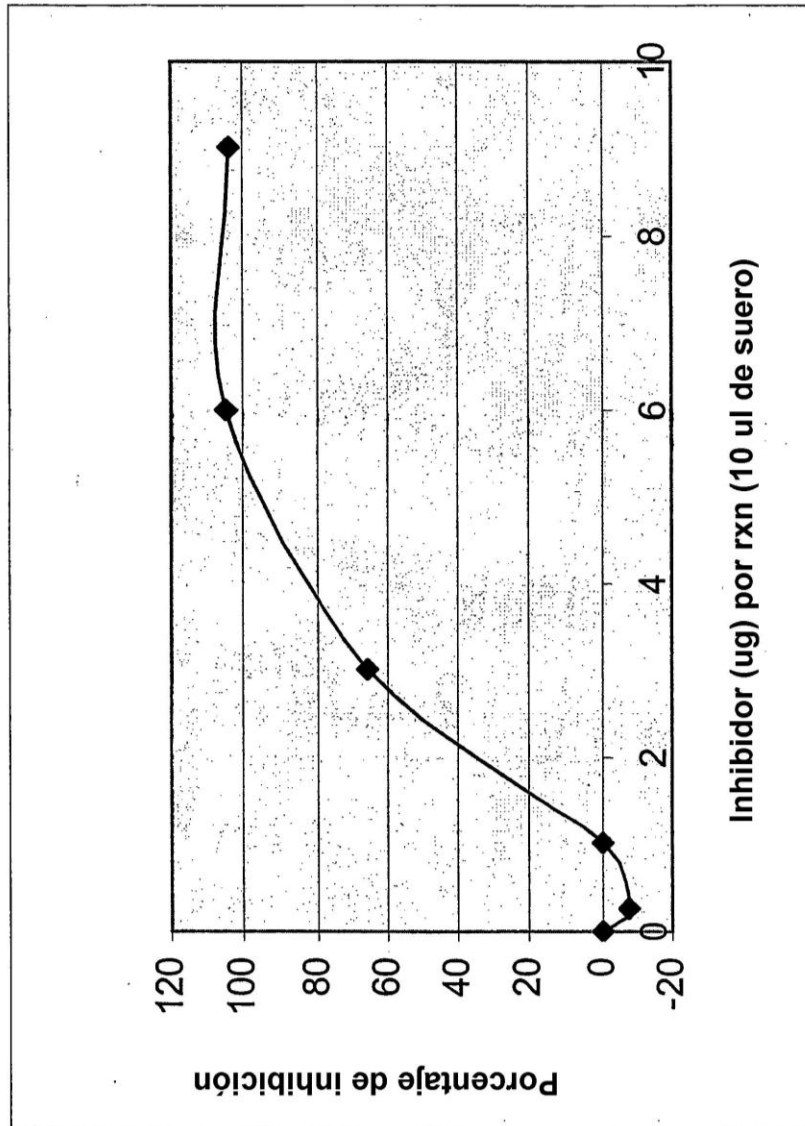


Fig. 2B



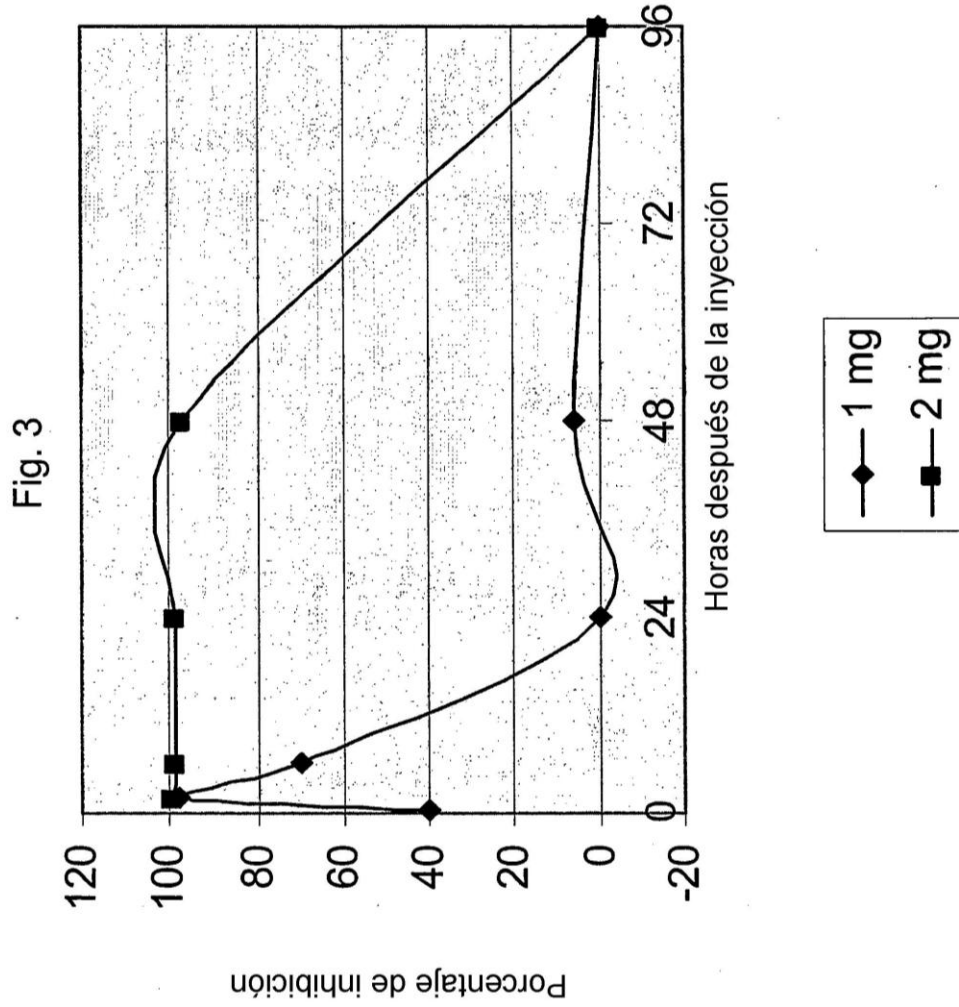


Fig. 4B

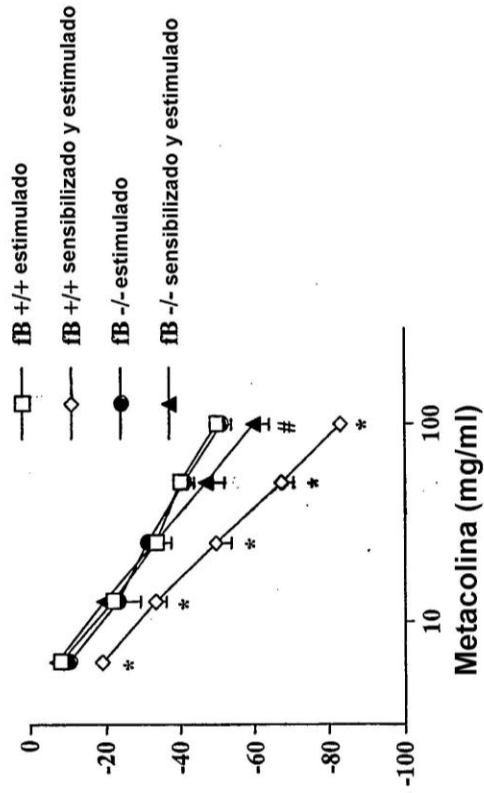


Fig. 4A

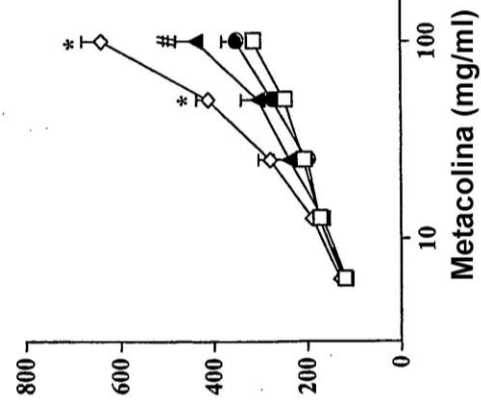
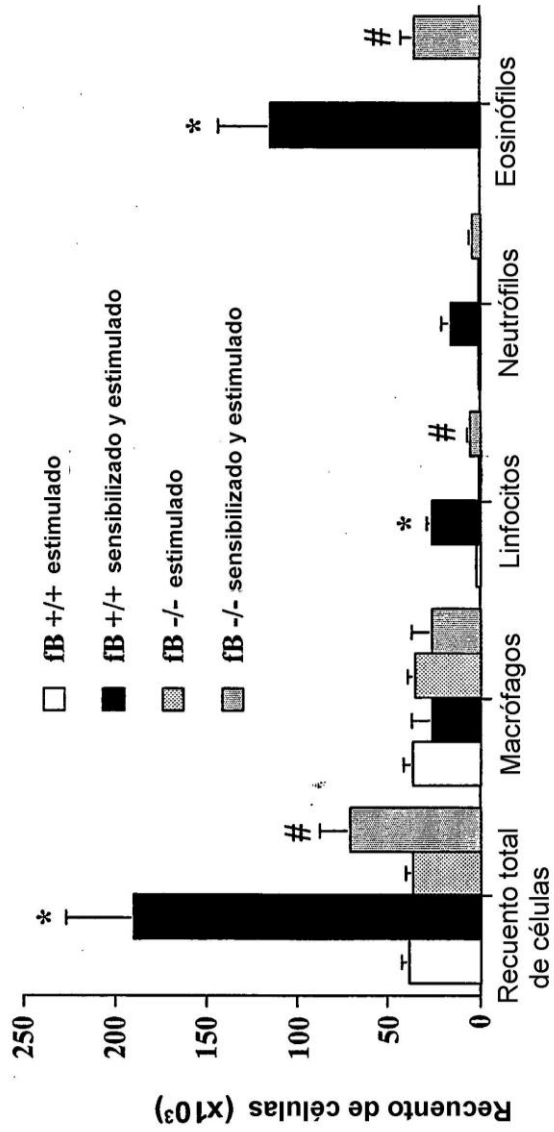


Fig. 5



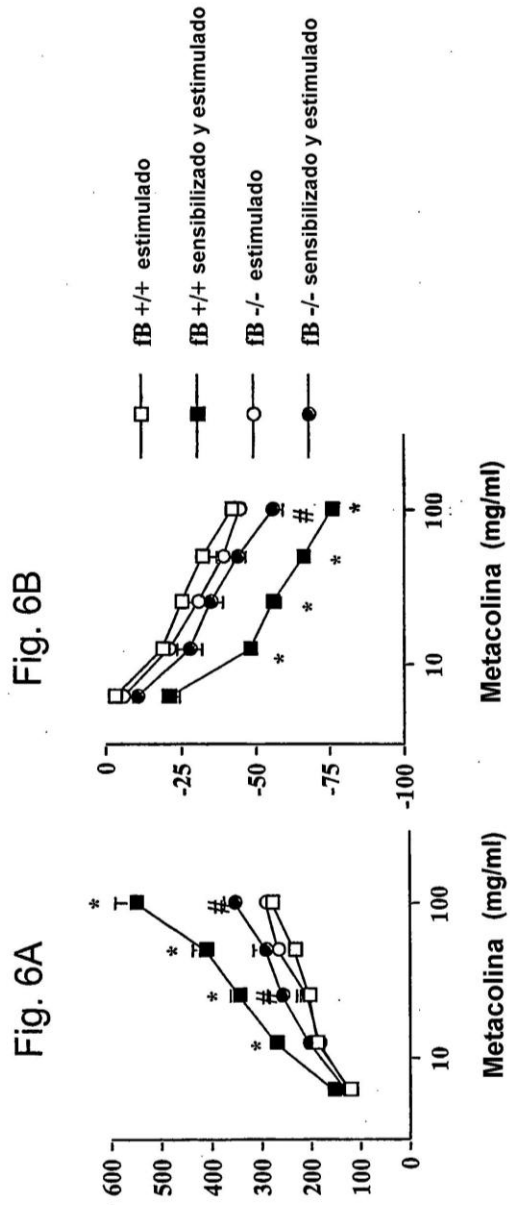


Fig. 6C

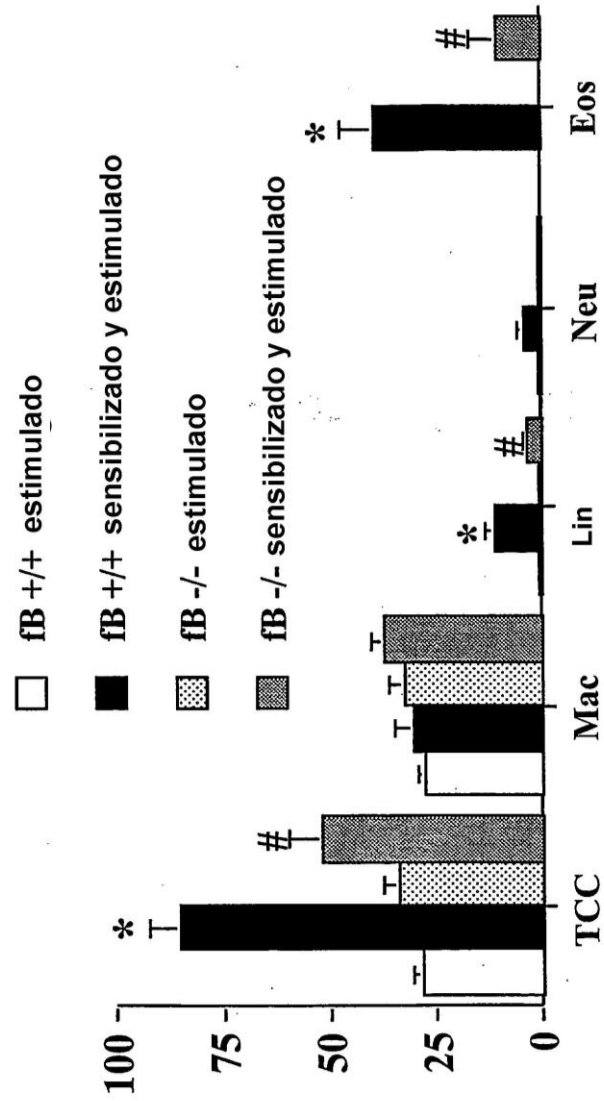


Fig. 7A

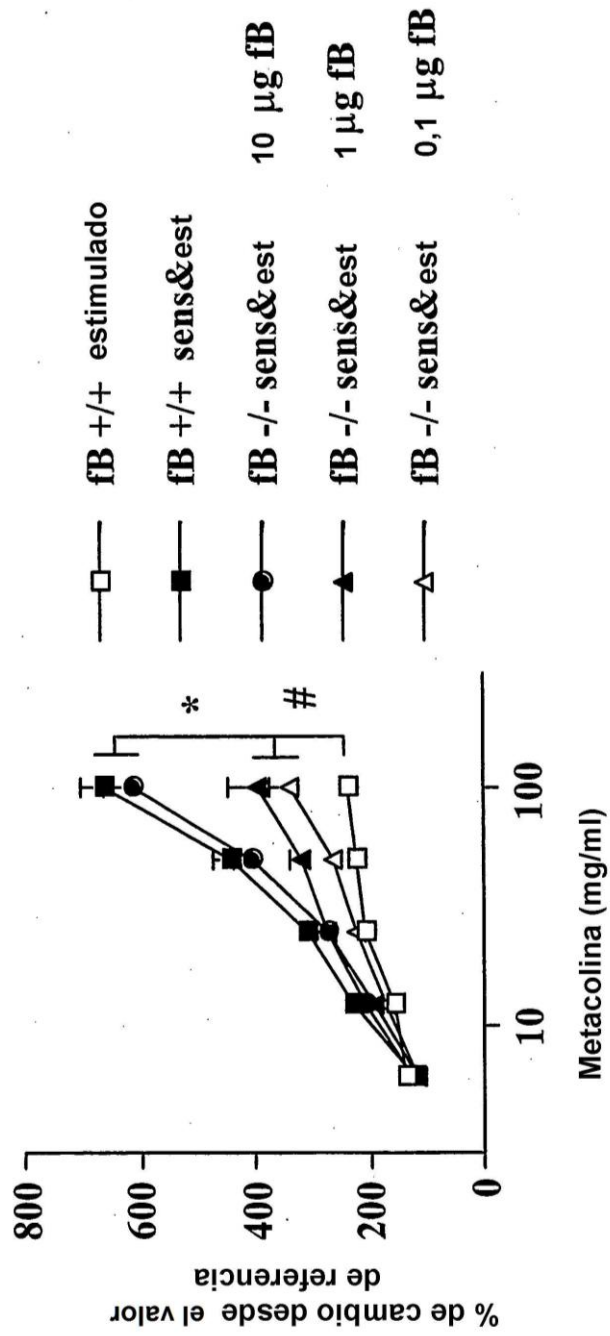
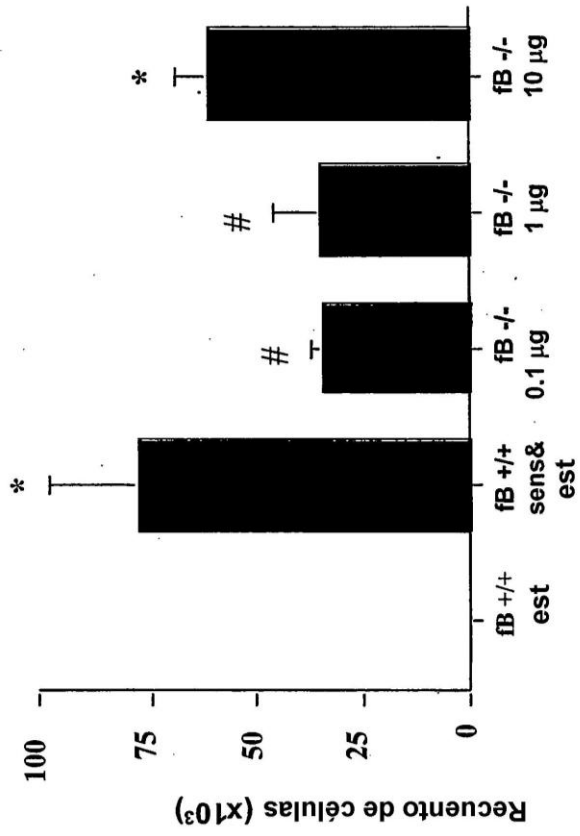


Fig. 7B



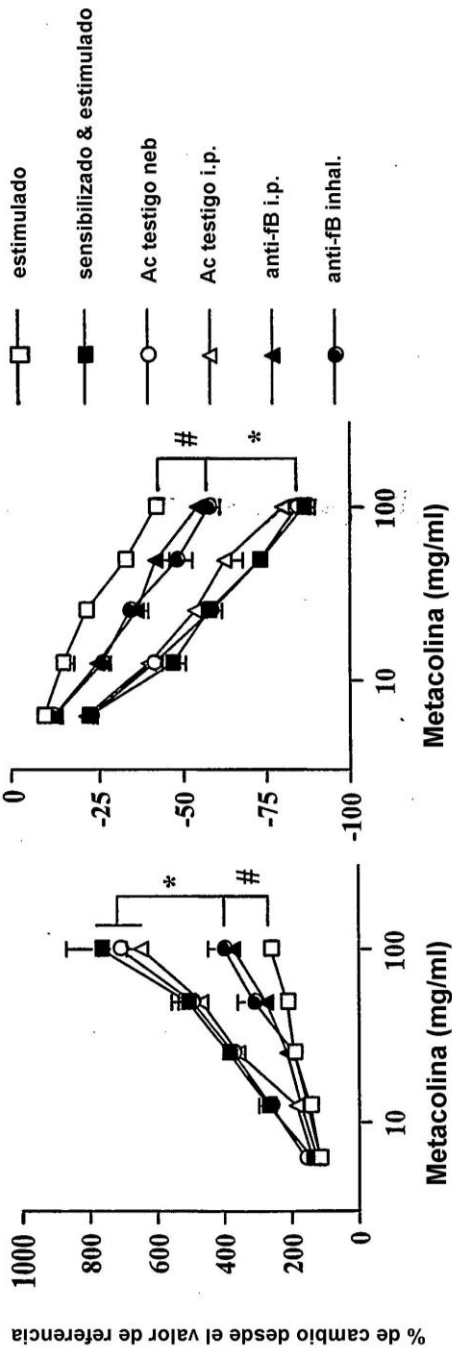


Fig. 8C

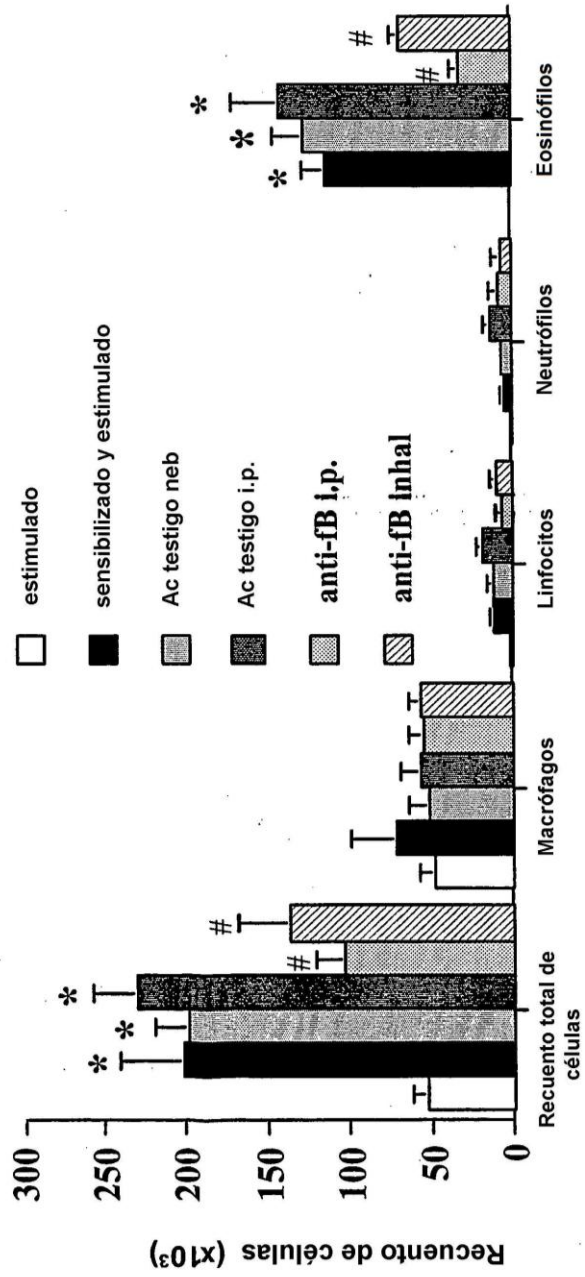


Fig. 9

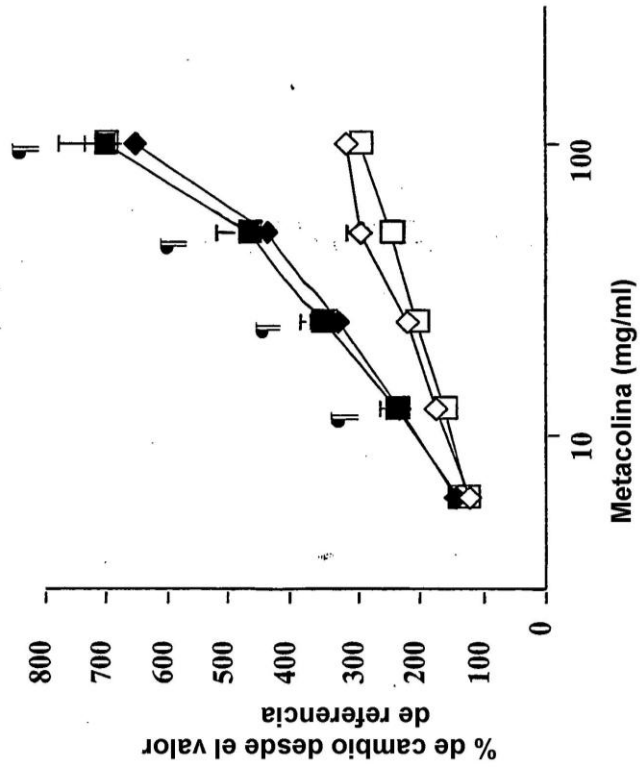


Fig. 10

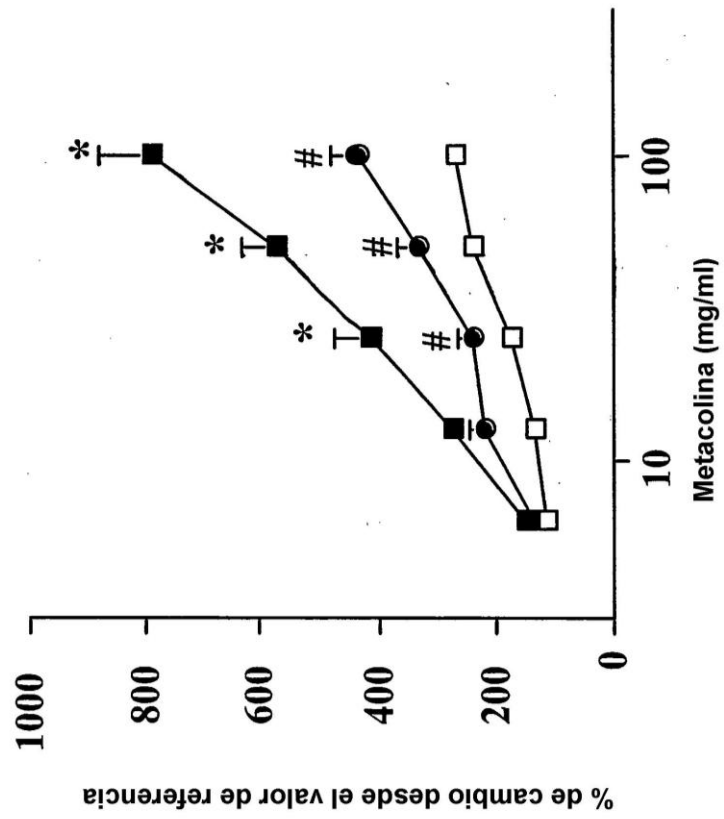


Fig. 11

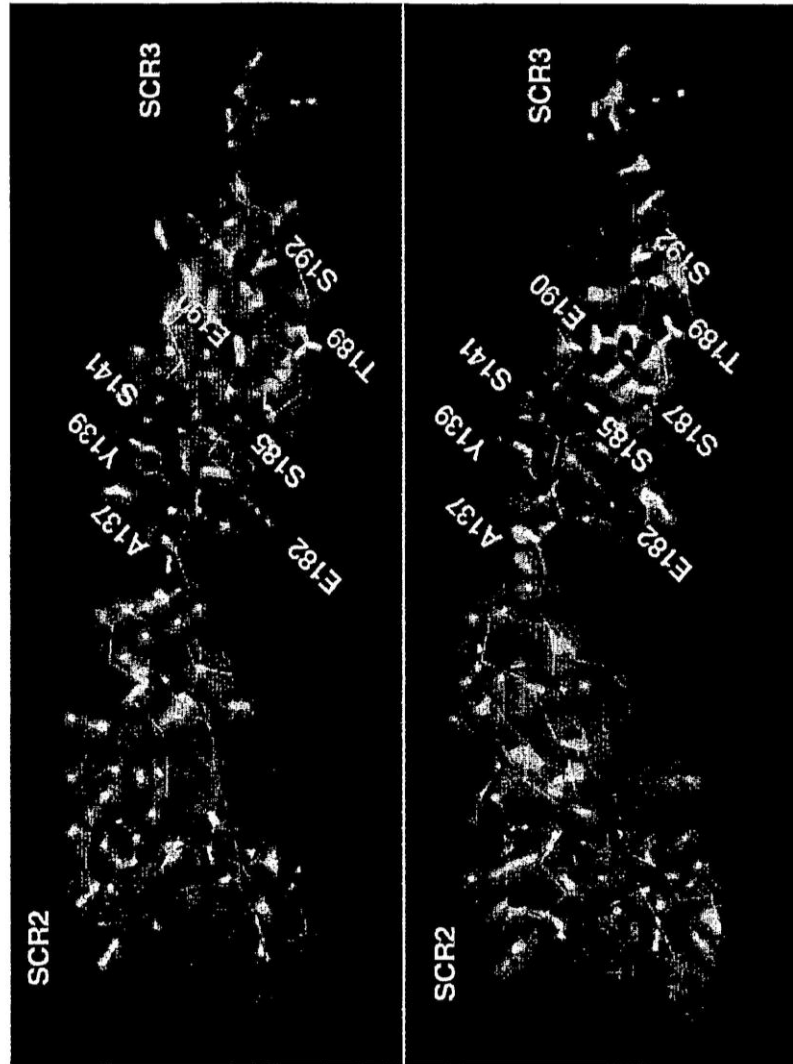


Fig. 12

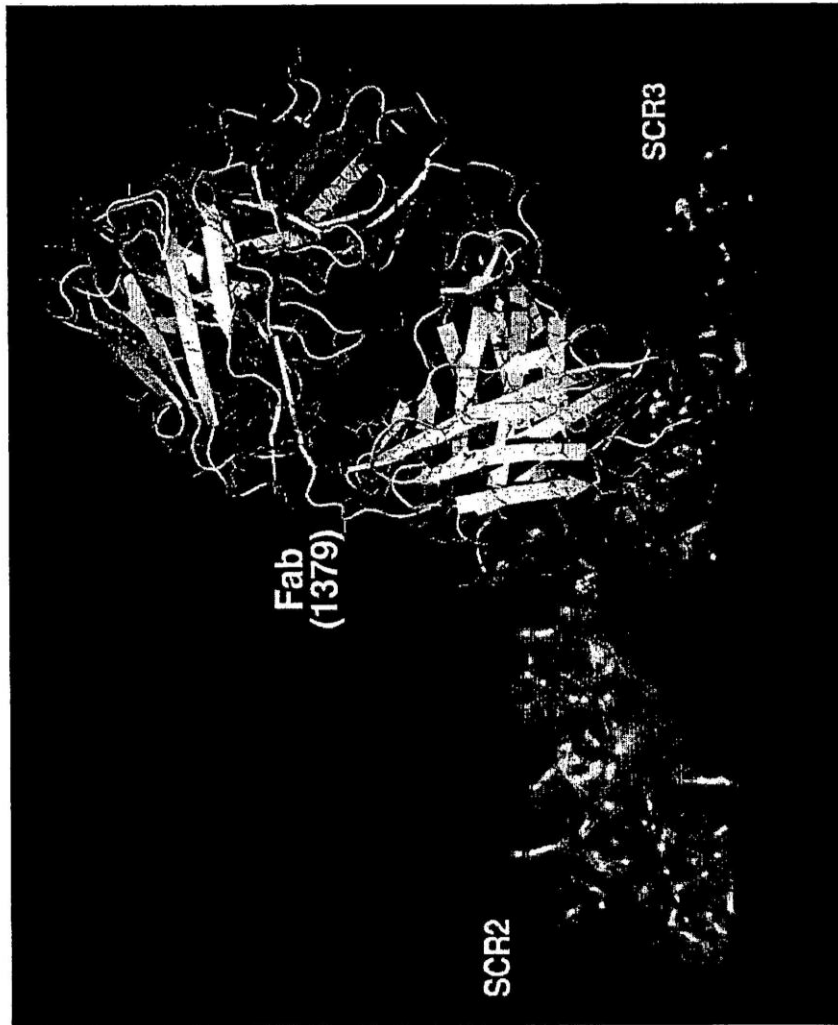


Fig. 13

