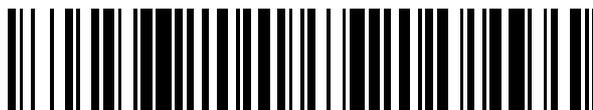


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 362**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2005 E 05779924 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 1755674**

54 Título: **Prolongación de la supervivencia de un aloinjerto por inhibición de la actividad del complemento**

30 Prioridad:

14.05.2004 US 571444 P

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

09.02.2015

73 Titular/es:

**ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
352 KNOTTER DRIVE
CHESHIRE, CT 06410, US**

72 Inventor/es:

**ROTHER, RUSSELL, P.;
WANG, HAO y
ZHONG, ZHEN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 528 362 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

Prolongación de la supervivencia de un aloinjerto por inhibición de la actividad del complemento

CAMPO TÉCNICO

La invención se refiere a las realizaciones como se caracterizan en las reivindicaciones.

- 5 La presente descripción se refiere a métodos para prolongar la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero. En particular, la presente descripción se refiere a prolongar la supervivencia de un aloinjerto administrando un inhibidor del complemento o formación del complemento terminal, especialmente un inhibidor de la escisión del complemento C5, además de uno o más fármacos que son inmunosupresores.

ANTECEDENTES

- 10 El trasplante de órganos es el tratamiento preferido para la mayoría de los pacientes con insuficiencia orgánica crónica. Aunque el trasplante de riñón, hígado, pulmón y corazón ofrece una excelente oportunidad para la rehabilitación a medida que los receptores vuelven a un estilo de vida más normal, está limitado por la idoneidad médica/quirúrgica de los receptores potenciales, una escasez creciente de donantes, y el fallo prematuro de la función orgánica transplantada.

- 15 El trasplante de células, tejidos y órganos se ha hecho muy habitual, y es a menudo un procedimiento que salva vidas. El trasplante de órganos es el tratamiento preferido para la mayoría de los pacientes con insuficiencia orgánica crónica. A pesar de la gran mejora en tratamientos para inhibir el rechazo, el rechazo continúa siendo el impedimento individual más grande para el trasplante orgánico con éxito. El rechazo incluye no sólo el rechazo agudo sino también el rechazo crónico. Las tasas de supervivencia a un año para riñones transplantados alcanzan el 88,3% con riñones de donantes muertos, y 94,4% con riñones recibidos de donantes vivos. Las tasas de supervivencia a cinco años correspondientes para los riñones transplantados son 63,3% y 76,5% (OPTN/SRTR Annual Report, 2002). Para los hígados, las tasas de supervivencia a un año son 80,2% y 76,5% para hígados procedentes de donantes muertos y vivos, respectivamente. Las tasas de supervivencia de injertos hepáticos a cinco años correspondientes son 63,5% y 73,0% (OPTN/SRTR Annual Report, 2002). El uso de fármacos inmunosupresores, especialmente ciclosporina A y más recientemente tacrolimus, ha mejorado drásticamente la tasa de éxito del trasplante de órganos, especialmente evitando el rechazo agudo. Pero como muestran los números anteriores, todavía existe la necesidad de mejorar las tasas de éxito, tanto a corto plazo como especialmente a largo plazo. Como se observa a partir de los números anteriores para trasplantes renales y hepáticos, las tasas de fallo a los cinco años de estos órganos transplantados son del orden de 25-35%. En el año 2001 solo, hubo más de 23.000 pacientes quienes recibieron un trasplante de órgano, de los cuales aproximadamente 19.000 fueron riñones o hígados (OPTN/SRTR Annual Report, 2002). Para este único año de trasplantes, con las técnicas actuales, se puede esperar que aproximadamente 5.000-6.000 de estos riñones e hígados transplantados fallarán en 5 años. Estos números no incluyen incluso otros órganos transplantados o tejidos transplantados o células tales como médula ósea.

- 35 Hay múltiples tipos de trasplantes. Éstos se describen en Abbas et al., 2000. Un injerto transplantado desde un individuo al mismo individuo se denomina un injerto autólogo o autoinjerto. Un injerto transplantado entre dos individuos genéticamente idénticos o singénicos se denomina un injerto singénico. Un injerto transplantado entre dos individuos genéticamente diferentes de la misma especie se denomina un injerto alogénico o aloinjerto. Un injerto transplantado entre individuos de diferentes especies se denomina un injerto xenogénico o xenoinjerto. Las moléculas que son reconocidas como extrañas en aloinjertos se denominan aloantígenos, y aquellas en xenoinjertos se denominan xenoantígenos. Los linfocitos o anticuerpos que reaccionan con aloantígenos o xenoantígenos se describen como alorreactivos o xenorreactivos, respectivamente.

- 45 Actualmente se realizan más de 40.000 trasplantes de riñón, de corazón, de pulmón, de hígado y de páncreas en los Estados Unidos de América cada año (Abbas et al., 2000). Otros posibles trasplantes incluyen, pero no se limitan a, tejido vascular, ojo, córnea, lente, piel, médula ósea, músculo, tejido conjuntivo, tejido gastrointestinal, tejido nervioso, hueso, células madre, islotes, cartílago, hepatocitos, y células hematopoyéticas. Desafortunadamente, hay muchos más candidatos para un trasplante que el que hay de donantes. Para superar esta escasez, se está realizando un esfuerzo importante para aprender cómo usar xenoinjertos. Aunque se están realizando progresos en este campo, el hecho es que actualmente la mayoría de los trasplantes son aloinjertos. Un trasplante alogénico, aunque actualmente es más probable que sea exitoso que un trasplante xenogénico, debe superar numerosos obstáculos para que tenga éxito. Hay varios tipos de ataques inmunológicos realizados por el receptor frente al órgano del donante, que pueden conducir a rechazo del aloinjerto. Estos incluyen rechazo hiperagudo, rechazo vascular agudo (incluyendo rechazo humoral acelerado y rechazo humoral agudo de novo), y rechazo crónico. El rechazo es normalmente un resultado de ataque de anticuerpo mediado por linfocitos T o humoral, pero puede incluir factores secundarios adicionales tales como los efectos del complemento y citocinas.

- 55 Un espacio siempre creciente entre el número de pacientes que requieren trasplante de órganos y el número de órganos de donantes disponibles se ha convertido en un problema importante en todo el mundo. Park et al., 2003. Se afirma que los individuos que han desarrollado anticuerpos anti-HLA están inmunizados o sensibilizados. Gloor,

2005. La sensibilización frente a HLA es la barrera principal para la utilización óptima de órganos procedentes de donantes vivos en trasplante clínico (Warren et al., 2004) debido al desarrollo de rechazo grave mediado por anticuerpos (ABMR). Por ejemplo, más del 50% de todos los individuos que esperan un trasplante de riñón son pacientes presensibilizados (Glotz et al., 2002) que tienen niveles elevados de aloanticuerpos ampliamente reactivos, que resultan de múltiples transfusiones, aloinjertos fallidos previos, o embarazo (Kupiec-Weglinski, 1996). El papel de ABMR es actualmente una de las áreas más dinámicas de estudio en trasplante, debido a que el reconocimiento de este tipo de rechazo puede conducir a pérdida aguda o crónica de función del aloinjerto. Mehra et al., 2003. Se ha informado de numerosos casos de ABMR, incluyendo rechazo hiperagudo (HAR) o rechazo humoral acelerado (ACHR), que se caracterizan por lesión aguda de aloinjerto que es resistente a terapia potente anti-linfocitos T, la detección de anticuerpos específicos del donante circulantes, y la deposición de componentes del complemento en el injerto. ABMR con aloanticuerpos circulantes elevados y activación del complemento que se produce en el 20-30% de los casos de rechazo agudo tiene un pronóstico peor que el rechazo celular. Mauiyyedi et al., 2002.

Los pacientes muy presensibilizados, que muestran niveles elevados de aloanticuerpos, sufren habitualmente un HAR inmediato y agresivo. En la práctica clínica, con grandes esfuerzos y avances significativos en la tecnología, HAR se evita obteniendo una prueba cruzada linfocitotóxica previa al trasplante para identificar pacientes sensibilizados con anticuerpos específicos para antígenos HLA de donantes. Sin embargo, los anticuerpos circulantes contra antígenos HLA de donantes u otros antígenos endoteliales no MHC también pueden ser responsables de una forma retrasada de rechazo humoral agudo, que está asociado con una mayor incidencia de la pérdida del injerto. Collins et al., 1999. Por lo tanto, el desarrollo de un nuevo modelo de animal presensibilizado para imitar ABMR en marcos clínicos sería beneficioso para estudios sobre el mecanismo, y para el progreso muy necesario en el manejo del rechazo de aloinjertos en hospedantes presensibilizados.

Algunos pacientes muy presensibilizados se pueden beneficiar de programas de intervención tales como inmunoadsorción (Palmer et al., 1989; Ross et al., 1993; Kriaa et al., 1995), plasmáferesis e inmunoglobulina intravenosa (Sonnenday et al., 2002; Rocha et al., 2003), que se han diseñado e implementado para eliminar temporalmente anticuerpos anti-donantes. Sin embargo, además de sus beneficios, las terapias mencionadas anteriormente portan con ellas numerosos inconvenientes, ya que algunos individuos son menos susceptibles a sus efectos (Kriaa et al., 1995; Hakim et al., 1990; Glotz et al., 1993; Tyan et al., 1994); son extremadamente caras, consumen tiempo, y arriesgadas (Salama et al., 2001). Además, el efecto transitorio y variable de estos protocolos ha limitado su impacto. Glotz et al., 2002; Kupin et al., 1991; Schweitzer et al., 2000. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas estrategias para reducir el riesgo y coste en la prevención de ABMR sería beneficioso para receptores presensibilizados que reciben un aloinjerto.

SUMARIO

En consecuencia, se proporcionan medios para prolongar la supervivencia de células, tejidos u órganos transplantados. En particular, se proporcionan medios para prolongar la supervivencia de células, tejidos u órganos alotransplantados. Estos medios implican usar uno o más inmunosupresores, además de un inhibidor de la actividad del complemento como se define en las reivindicaciones. También se proporciona el uso de uno o más inmunosupresores y un inhibidor de la actividad del complemento, como se define en las reivindicaciones, en la fabricación de uno o más medicamentos o paquetes de medicamentos. Tales medicamentos o paquetes de medicamentos son útiles para prolongar la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero sujeto.

En ciertas realizaciones, la inhibición de la actividad del complemento se efectúa mediante administración crónica de un fármaco dirigido contra el complemento C5 como se define en las reivindicaciones. Un fármaco que inhibe la actividad del complemento es un anticuerpo específico para uno o más componentes del complemento, por ejemplo C5. En ciertas realizaciones preferidas, el anticuerpo inhibe la escisión de C5 y de ese modo inhibe la formación tanto de C5a como de C5b-9. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico (por ejemplo, un anticuerpo humanizado), un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, Fab), un anticuerpo monocatenario, un Fv, o un anticuerpo de dominio. El receptor también se trata con uno o más fármacos inmunosupresores, por ejemplo ciclosporina A.

En ciertas realizaciones, se trata un receptor incompatible para el MHC (es decir, un receptor mamífero de un aloinjerto incompatible para el MHC), un receptor presensibilizado, o un receptor incompatible para ABO (es decir, un receptor mamífero de un aloinjerto incompatible para ABO). En este modelo, el receptor se trata de nuevo crónicamente con un inhibidor del complemento, preferiblemente un anticuerpo monoclonal anti-C5, junto con fármacos inmunosupresores, preferiblemente una administración crónica de ciclosporina A y una administración a corto plazo de ciclofosfamida. Esta terapia triple da como resultado una supervivencia prolongada del injerto en el receptor alotransplantado presensibilizado.

La presente descripción también describe métodos para prolongar la supervivencia de un aloinjerto en un receptor mamífero administrando al receptor agentes que modulan el nivel y/o relación de subclases y/o isotipos de inmunoglobulinas (Ig) anti-donantes en el receptor. En ciertas realizaciones, se prefiere un agente que reduce el nivel de IgG1 anti-donantes en el receptor. En ciertas realizaciones, se prefiere un agente que incrementa el nivel de IgG2a y/o IgG2b anti-donantes en el receptor. En ciertas realizaciones, se prefiere un agente que reduce la relación

de IgG1 anti-donantes/IgG2a o IgG2b anti-donantes en el receptor.

La presente descripción también describe un método para prolongar la supervivencia de un aloinjerto en un segundo receptor mamífero usando un aloinjerto que se ha acomodado en un primer receptor mamífero (es decir, el aloinjerto tiene supervivencia prolongada en el primer receptor). La presente descripción describe además un aloinjerto que es resistente a anticuerpos anti-donantes en un receptor mamífero, y el aloinjerto se prepara a partir de un primer receptor que ha acomodado el aloinjerto. En realizaciones preferidas, el primer receptor ha acomodado el aloinjerto al recibir un tratamiento como se describe aquí, tal como un tratamiento de terapia triple que implica administrar al primer receptor un fármaco que inhibe la actividad del complemento y dos agentes inmunosupresores.

También se proporcionan paquetes farmacéuticos. Un paquete farmacéutico de la presente descripción puede comprender un fármaco que inhibe la actividad del complemento como se define en las reivindicaciones y al menos un agente inmunosupresor. El paquete farmacéutico puede comprender además una etiqueta para la administración crónica. El paquete farmacéutico también puede comprender una etiqueta para la autoadministración por un paciente, por ejemplo un receptor de un injerto de trasplante, o instrucciones para un cuidador de un receptor de un injerto de trasplante. En ciertas realizaciones, el fármaco y el agente en el paquete farmacéutico están en una formulación o en formulaciones separadas que son adecuadas para la administración crónica y/o la autoadministración.

La presente descripción también proporciona formulaciones liofilizadas y formulaciones adecuadas para inyección. Ciertas realizaciones proporcionan una formulación de anticuerpo liofilizada que comprende un anticuerpo que inhibe la actividad del complemento y un lioprotector. En realizaciones preferidas, la formulación de anticuerpo es adecuada para administración crónica, por ejemplo la formulación de anticuerpo es estable. Realizaciones alternativas proporcionan un sistema de inyección que comprende una jeringuilla; la jeringuilla comprende un cartucho que contiene un anticuerpo que inhibe la actividad del complemento y está en una formulación adecuada para inyección.

Un anticuerpo como se define en las reivindicaciones y se emplea en diversas realizaciones de la presente descripción inhibe preferiblemente la formación de complemento terminal o C5a. En ciertas realizaciones, el anticuerpo que inhibe la formación de complemento terminal o C5a es un anticuerpo completo o un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo completo o fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humano, humanizado, quimerizado, o desimmunizado. En ciertas realizaciones, el anticuerpo completo o fragmento de anticuerpo puede inhibir la escisión del complemento C5. En ciertas realizaciones, el fragmento de anticuerpo es un Fab, un F(ab')₂, un Fv, un anticuerpo de dominio, o un anticuerpo monocatenario. En realizaciones preferidas, el fragmento de anticuerpo es pexelizumab. En realizaciones preferidas alternativas, el anticuerpo completo es eculizumab.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo, como se define en las reivindicaciones, que inhibe la actividad del complemento, está presente en forma de dosificación unitaria, que puede ser particularmente adecuada para la autoadministración. De forma similar, también puede estar presente en forma de dosificación unitaria un agente inmunosupresor de la presente descripción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A-1D muestran niveles de anticuerpos anti-donantes en receptores presensibilizados frente a los no sensibilizados bajo diferentes tratamientos.

Las Figuras 2A y 2B muestran la comparación entre la terapia triple que usa anticuerpo anti-C5, CsA y CyP en receptores de aloinjertos presensibilizados y terapia de combinación que usa solamente anticuerpo anti-C5 y CsA en receptores de aloinjertos presensibilizados. La Figura 2A compara la supervivencia de aloinjerto de corazón en diversos receptores bajo diferentes tratamientos según se indica. La Figura 2B muestra la histología e inmunohistología, por ejemplo, para infiltración linfocítica en aloinjertos de corazón de receptores en diferentes grupos.

La Figura 3 muestra la actividad del complemento terminal bloqueada por anticuerpo anti-C5 en comparación con agentes inmunosupresores.

Las Figuras 4A-4D comparan los niveles de anticuerpos anti-donantes en receptores presensibilizados de aloinjertos bajo monoterapia con anticuerpo anti-C5 solo, terapia de combinación doble con anticuerpo anti-C5 y CsA, y terapia de triple combinación con anticuerpo anti-C5, CsA y CyP.

Las Figuras 5A y 5B muestran el cambio de relaciones de isotipos de IgG en receptores de aloinjertos que se dejaron sin tratar o que estaban bajo diferentes tratamientos.

La Figura 6 muestra la expresión de nivel elevado de las proteínas Bcl-2 y Bcl-xl en injertos de corazón que sobreviven a largo plazo en comparación con injertos de corazón de animales no tratados.

La Figura 7 muestra segundo trasplante (retrasplante) de un injerto acomodado procedente de un primer

receptor de transplante.

La Figura 8 muestra los resultados de experimentos de retransplante.

La Figura 9 muestra los resultados de experimentos de retransplante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 Resumen: Rechazo de trasplantes o injertos

El rechazo hiperagudo se produce en minutos a horas después del trasplante, y es debido a anticuerpos preformados contra los antígenos del tejido trasplantado. Se caracteriza por hemorragia y oclusión trombótica de la vasculatura del injerto. La unión del anticuerpo al endotelio activa el complemento, y el anticuerpo y el complemento inducen un número de cambios en el endotelio del injerto que promueven trombosis intravascular y conducen a oclusión vascular, siendo el resultado que el órgano injertado sufre daño isquémico irreversible (Abbas et al., 2000). El rechazo hiperagudo está mediado a menudo por aloanticuerpos IgM preexistentes, por ejemplo aquellos dirigidos contra los antígenos del grupo sanguíneo ABO expresados en glóbulos rojos. Este tipo de rechazo, mediado por anticuerpos naturales, es la razón principal para el rechazo de xenotrasplantes. El rechazo hiperagudo debido a anticuerpos IgM naturales ya no es un problema importante con aloinjertos, debido a que los aloinjertos se seleccionan habitualmente para ser compatibles con el donante y el tipo de ABO del receptor. El rechazo hiperagudo de un aloinjerto compatible para ABO puede ocurrir todavía, habitualmente mediado por anticuerpos IgG dirigidos contra aloantígenos proteicos, tales como moléculas del MHC extrañas, o contra aloantígenos menos bien definidos expresados en células endoteliales vasculares. Tales anticuerpos pueden surgir como resultado de la exposición previa a aloantígenos a través de transfusión sanguínea, trasplante previo, o múltiples embarazos (denominándose esta exposición previa como "presensibilización"). Abbas et al., 2000.

El rechazo agudo es un proceso de lesión vascular y parenquimal mediado por linfocitos T, macrófagos, y anticuerpos, que comienza habitualmente después de la primera semana de trasplante. Abbas et al., 2001. Los linfocitos T desempeñan un papel central en el rechazo agudo al responder a aloantígenos, incluyendo moléculas del MHC, presentes en células endoteliales vasculares y parenquimales. Los linfocitos T activados provocan lisis directa de células del injerto, o producen citocinas que reclutan y activan células inflamatorias, que provocan necrosis. Tanto las células CD4⁺ como CD8⁺ pueden contribuir al rechazo agudo. La destrucción de células alogénicas en un injerto es muy específica, y una marca distintiva del exterminio por linfocitos T citotóxicos CD8⁺. Abbas et al., 2000. Los linfocitos T CD4⁺ pueden ser importantes mediando el rechazo agudo del injerto al segregar citocinas e inducir reacciones similares a hipersensibilidad de tipo retrasada en injertos, con ciertas pruebas disponibles que indican que los linfocitos T CD4⁺ son suficientes para mediar el rechazo agudo. Abbas et al., 2000. Los anticuerpos también pueden mediar el rechazo agudo después de que un receptor de injerto monta una respuesta inmunitaria humoral contra antígenos de la pared de vasos y los anticuerpos que se producen se unen a la pared de los vasos y activan el complemento. Abbas et al., 2000.

El rechazo crónico se caracteriza por fibrosis, produciéndose pérdida de estructuras orgánicas normales durante un período prolongado. La patogénesis del rechazo crónico está menos entendida que la del rechazo agudo. La oclusión arterial del injerto se puede producir como resultado de la proliferación de células del músculo liso de la íntima (Abbas et al., 2000). Este proceso se denomina arteriosclerosis acelerada o de injerto, y se puede desarrollar en cualquier trasplante de órgano vascularizado en 6 meses a un año después del trasplante.

Para que el trasplante tenga éxito, se deben de superar los varios modos de rechazo. Para prevenir el rechazo, se utilizan múltiples enfoques. Esto puede requerir la administración de inmunosupresores, a menudo varios tipos para prevenir los diversos modos de ataque, por ejemplo inhibición del ataque de linfocitos T, anticuerpos, y efectos de citocinas y del complemento. La selección previa de donantes para hacerlos compatibles con los receptores es también un factor importante para prevenir el rechazo, especialmente en la prevención del rechazo hiperagudo. La inmunoadsorción de anticuerpos anti-HLA antes del injerto puede reducir el rechazo hiperagudo. Antes del trasplante, al receptor u hospedante se le pueden administrar reactivos anti-linfocitos T, por ejemplo el anticuerpo monoclonal OKT3, globulina anti-timocítica (ATG), ciclosporina A o tacrolimus (FK 506). Adicionalmente, antes del trasplante, se le pueden administrar al hospedante glucocorticoides y/o azatioprina. Los fármacos usados para ayudar a prevenir el rechazo del trasplante incluyen, pero no se limitan a, ATG o ALG, OKT3, daclizumab, basiliximab, corticosteroides, 15-desoxiespergualina, ciclosporinas, tacrolimus, azatioprina, metotrexato, micofenolato mofetilo, 6-mercaptopurina, bredinina, brequinar, leflunamida, ciclofosfamida, sirolimus, anticuerpos monoclonales anti-CD4, CTLA4-Ig, anticuerpos monoclonales anti-CD154, anticuerpos monoclonales anti-LFA1, anticuerpos monoclonales anti-LFA-3, anticuerpos monoclonales anti-CD2, y anti-CD45.

Los aloinjertos se rechazan en parte por la activación de linfocitos T. El receptor del trasplante monta una respuesta de rechazo tras el reconocimiento de linfocitos T CD4⁺ de antígenos extraños en el aloinjerto. Estos antígenos son codificados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Hay moléculas de MHC tanto de Clase I como de Clase II. En seres humanos, las moléculas de MHC de clase I son HLA-A, HLA-B, y HLA-C. Las moléculas del MHC de clase II en seres humanos se denominan HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. En ratones, las moléculas del MHC de clase I son H-2K, H-2D y H-2L, y las moléculas del MHC clase II son I-A y I-E. Cuando los

linfocitos T CD4⁺ se unen a los antígenos del MHC extraños, se activan y sufren proliferación clonal. Los linfocitos T activados segregan citocinas que ayudan a activar monocitos/macrófagos, linfocitos B y linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. Los monocitos/macrófagos activados liberan agentes que dan como resultado daño tisular, y los linfocitos B producen autoanticuerpos que conducen a la destrucción tisular mediada por el complemento, y los linfocitos T CD8⁺ exterminan células del injerto de una manera específica del antígeno mediante la inducción de apoptosis y lisis celular.

Agentes inmunosupresores

Los numerosos fármacos utilizados para retrasar el rechazo del injerto (es decir, para prolongar su supervivencia) trabajan de muchas maneras. Los agentes inmunosupresores se usan ampliamente. Véase Stepkowski, 2000, para un repaso del mecanismo de acción de varios fármacos inmunosupresores. La ciclosporina A es uno de los fármacos inmunosupresores más ampliamente usados para inhibir el rechazo del injerto. Es un inhibidor de interleucina-2 o IL-2 (previene la transcripción del ARNm de interleucina-2). Más directamente, la ciclosporina inhibe la activación de calcineurina que ocurre normalmente con la estimulación del receptor de linfocitos T. Calcineurina desfosforila NFAT (factor nuclear de linfocitos T activados), permitiéndole entrar al núcleo y unirse al promotor de interleucina-2. Al bloquear este proceso, la ciclosporina A inhibe la activación de los linfocitos T CD4⁺ y la cascada de sucesos resultante, que se podría producir de otro modo. Tacrolimus es otro inmunosupresor que actúa inhibiendo la producción de interleucina-2.

Rapamicina (sirolimus), SDZ RAD, y los bloqueadores del receptor de interleucina-2 son fármacos que inhiben la acción de interleucina-2 y por lo tanto previenen la cascada de sucesos descrita anteriormente.

Los inhibidores de la biosíntesis de purina o de pirimidina también se usan para inhibir el rechazo del injerto. Éstos previenen la síntesis del ADN, y de ese modo inhiben la división celular, incluyendo la capacidad de los linfocitos T para dividirse. El resultado es la inhibición de la actividad de los linfocitos T al prevenir la formación de nuevos linfocitos T. Los inhibidores de la síntesis de purina incluyen azatioprina, metotrexato, micofenolato mofetilo (MMF) y mizorribina (bredinina). Los inhibidores de la síntesis de pirimidina incluyen brequinar sódico y leflunomida. La ciclofosfamida es un inhibidor de la síntesis tanto de purina como de pirimidina.

Aún otro método para inhibir la activación de linfocitos T es tratar al receptor con anticuerpos contra linfocitos T. OKT3 es un anticuerpo monoclonal murino contra CD3, que es parte del receptor de linfocitos T. Este anticuerpo inhibe al receptor de linfocitos T y suprime la activación de linfocitos T.

Otros numerosos fármacos y métodos para retrasar el rechazo de alotransplantes son conocidos y se usan por los expertos en la técnica. Un enfoque ha sido agotar los linfocitos T, por ejemplo por irradiación. Esto ha sido usado a menudo en transplantes de médula ósea, especialmente si hay una incompatibilidad parcial de HLA principal. Se ha usado la administración al receptor de un inhibidor (bloqueador) de la interacción del ligando de CD40 con CD40, y/o un bloqueador de la interacción de CD28-B7 (patente U.S. 6.280.957). La solicitud de patente PCT publicada WO 01/37860 muestra la administración de un anticuerpo monoclonal anti-CD3 e IL-5 para inhibir la respuesta inmunitaria Th1. La solicitud de patente PCT publicada WO 00/27421 muestra un método para la profilaxis o tratamiento del rechazo de transplante de córnea al administrar un antagonista del factor α de necrosis tumoral. Glotz et al. (2002) muestra que la administración de inmunoglobulinas intravenosas (IVIg) puede inducir una disminución profunda y sostenida en los títulos de anticuerpos anti-HLA, permitiendo de ese modo un transplante de un órgano incompatible para HLA. Protocolos similares han incluido intercambios de plasma (Taube et al., 1984) o técnicas de inmunoadsorción acopladas a agentes inmunosupresores (Hiesse et al., 1992), o una combinación de estos (Montgomery et al., 2000). Changelian et al. (2003) muestran un modelo en el que la inmunosupresión es provocada por un inhibidor oral de Janus cinasa 3 (JAK3), que es una enzima necesaria para la señalización apropiada de receptores de citocinas que usan la cadena gamma común (γ c) (interleucinas-2, -4, -7, -9, -15, -21), siendo el resultado una inhibición de la activación de linfocitos T. Los ácidos nucleicos antisentido contra ICAM-1 se han usado solos o en combinación con un anticuerpo monoclonal específico para antígeno 1 asociado a la función leucocitaria (LFA-1) en un estudio de transplante de aloinjerto de corazón (Stepkowski, 2000). De forma similar, se ha usado un anticuerpo anti-ICAM-1 en combinación con un anticuerpo anti-LFA-1 para tratar aloinjertos de corazón (Stepkowski, 2000). Los oligonucleótidos antisentido se han usado adicionalmente en conjunción con ciclosporina en modelos de aloinjertos de corazón o de riñón de rata, dando como resultado un efecto sinérgico para prolongar la supervivencia de los injertos (Stepkowski, 2000). El rechazo del transplante crónico se ha tratado administrando un antagonista de TGF- β , que es una citocina implicada en la diferenciación, proliferación y apoptosis (Publicación de Solicitud de Patente U.S. 2003/0180301).

Complemento y rechazo del transplante/injerto

El papel del complemento en el rechazo del transplante es bien conocido. Esto es especialmente cierto en el caso de xenotransplante, pero el complemento también desempeña un papel en el rechazo de alotransplantes. Para un repaso, véase Platt y Saadi, 1999. Un aspecto del papel del complemento es que se puede producir lesión de isquemia-reperfusión en el momento en el que un injerto orgánico se reperfusióna con la sangre del receptor. El complemento también puede provocar ciertas manifestaciones de rechazo de aloinjertos.

El sistema del complemento se describe con detalle en la patente U.S. 6.355.245. El sistema del complemento actúa conjuntamente con otros sistemas inmunológicos del cuerpo para defender frente a la intrusión de patógenos celulares y víricos. Hay al menos 25 proteínas del complemento, que se encuentran como una colección compleja de proteínas plasmáticas y cofactores de membrana. Las proteínas plasmáticas constituyen alrededor del 10% de las globulinas en suero de vertebrados. Los componentes del complemento logran sus funciones defensivas inmunitarias interactuando en una serie de sucesos intrincados pero precisos de escisión enzimática y unión a la membrana. La cascada del complemento resultante conduce a la producción de productos con funciones opsónicas, inmunorreguladoras, y líticas.

La cascada del complemento progresa vía la ruta clásica o la ruta alternativa. Estas rutas comparten muchos componentes, y, aunque difieren en sus etapas iniciales, convergen y comparten los mismos componentes del "complemento terminal" (C5 a C9) responsables de la activación y destrucción de células diana.

La ruta clásica del complemento se inicia típicamente mediante el reconocimiento por parte del anticuerpo de y la unión a un sitio antigénico en una célula diana. La ruta alternativa es habitualmente independiente del anticuerpo, y se puede iniciar por ciertas moléculas sobre superficies de patógenos. Ambas rutas convergen en el punto en el que el componente del complemento C3 se escinde por una proteasa activa (que es diferente en cada ruta) para producir C3a y C3b. Otras rutas que activan el ataque del complemento pueden actuar más tarde en la secuencia de sucesos, conduciendo a diversos aspectos de la función del complemento.

C3a es una anafilatoxina. C3b se une a células bacterianas y a otras células, así como a ciertos virus y complejos inmunitarios, y los etiqueta para su eliminación de la circulación. C3b en este papel es conocido como opsonina. La función opsónica de C3b se considera que es la acción antiinfecciosa más importante del sistema del complemento. Los pacientes con lesiones genéticas que bloquean la función de C3b tienen tendencia a infección por una amplia variedad de organismos patógenos, mientras que se encuentra que los pacientes con lesiones posteriores en la secuencia de la cascada del complemento, es decir, pacientes con lesiones que bloquean las funciones de C5, son más tendientes solamente a infección por *Neisseria*, y entonces sólo en cierto modo más tendientes (Fearon, 1983).

C3b también forma un complejo con otros componentes únicos para cada ruta para formar C5 convertasa clásica o alternativa, que escinde C5 en C5a y C5b. De este modo, C3 se considera como la proteína central en la secuencia de reacciones del complemento, puesto que es esencial tanto para las rutas alternativa como clásica (Wurzner et al., 1991). Esta propiedad de C3b está regulada por el Factor I de proteasas séricas, que actúa sobre C3b para producir iC3b. Mientras que todavía es funcional como opsonina, iC3b no puede formar una C5 convertasa activa.

C5 es una beta globulina de 190 kDa encontrada en suero normal a aproximadamente 75 µg/ml (0,4 µM). C5 está glicosilado, con alrededor de 1,5-3 por ciento de su masa atribuida a hidrato de carbono. C5 maduro es un heterodímero de una cadena alfa de 115 kDa de 999 aminoácidos que está enlazada mediante un disulfuro a una cadena beta de 75 kDa de 656 aminoácidos. C5 se sintetiza como un producto de proteína precursora monocatenario de un gen de una sola copia (Haviland et al., 1991). La secuencia del ADNc del transcrito de este gen predice un precursor pro-C5 segregado de 1659 aminoácidos junto con una secuencia líder de 18 aminoácidos.

El precursor pro-C5 se escinde después del aminoácido 655 y 659 para producir la cadena beta como un fragmento amino terminal (restos de aminoácidos +1 a 655) y la cadena alfa como un fragmento carboxi terminal (restos de aminoácidos 660 a 1658), con cuatro aminoácidos suprimidos entre las dos.

C5a es escindido de la cadena alfa de C5 mediante C5 convertasa alternativa o clásica como un fragmento amino terminal que comprende los primeros 74 aminoácidos de la cadena alfa (es decir, restos de aminoácidos 660-733). Aproximadamente el 20 por ciento de la masa de 11 kDa de C5a se atribuye a hidrato de carbono. El sitio de escisión para la acción de la convertasa está en o inmediatamente adyacente al resto de aminoácido 733. Un compuesto que se uniese a o estuviese adyacente a este sitio de escisión tendría el potencial para bloquear el acceso de las enzimas C5 convertasas al sitio de escisión, y de ese modo actuar como un inhibidor del complemento.

C5 también se puede activar por medios distintos de la actividad de C5 convertasa. La digestión limitada con tripsina (Minta y Man, 1977; Wetsel y Kolb, 1982) y el tratamiento con ácido (Yamamoto y Gewurz, 1978; Vogt et al., 1989) también pueden escindir C5 y producir C5b activo.

C5a es otra anafilatoxina. C5b se combina con C6, C7 y C8 para formar el complejo C5b-8 en la superficie de la célula diana. Al unir varias moléculas de C9, se forma el complejo de ataque a la membrana (MAC, C5b-9, complejo del complemento terminal-TCC). Cuando se insertan suficientes números de MACs en membranas de la célula diana, las aberturas que crean (poros de MAC) median la lisis osmótica rápida de las células diana. Concentraciones menores, no líticas, de MACs pueden producir otros efectos. En particular, la inserción en la membrana de pequeños números de los complejos de C5b-9 en células endoteliales y plaquetas puede provocar la activación celular perniciosa. En algunos casos, la activación puede preceder a la lisis celular.

Como se menciona anteriormente, C3a y C5a son anafilatoxinas. Estos componentes del complemento activado pueden disparar la desgranulación de mastocitos, lo que libera histamina y otros mediadores de la inflamación, dando como resultado la contracción del músculo liso, mayor permeabilidad vascular, activación leucocitaria, y otros

fenómenos inflamatorios, incluyendo proliferación celular que da como resultado hiper celularidad. C5a también funciona como un péptido quimiotáctico que sirve para atraer granulocitos proinflamatorios hacia el sitio de activación del complemento.

5 Se considera que los anticuerpos del receptor que se unen al complemento contra aloantígenos del donante son la causa principal de rechazo hiperagudo del injerto. Debido a la prueba de compatibilidad cruzada previa al
 10 trasplante, este prototipo de rechazo humoral ahora se observa raramente (Regele et al., 2001). Los datos están mostrando ahora que los mecanismos inmunitarios humorales pueden contribuir a otros tipos de rechazo del aloinjerto (Regele et al., 2001). Se encontró que los niveles elevados de anticuerpos reactivos con el panel, que indican presensibilización humoral, están asociados con supervivencia inferior del injerto de riñón (Opelz, 1992), se
 15 ha informado que la aparición de aloanticuerpos durante el período después del trasplante predice un resultado pobre del injerto (Jeannet et al., 1970; Halloran et al., 1992), y la eliminación selectiva de IgG del receptor mediante inmunoadsorción invirtió ciertos episodios de rechazo, indicando la contribución de mecanismos inmunitarios humorales al rechazo (Persson et al., 1995; Böhmig et al., 2000). La activación del complemento en un injerto puede
 20 indicar lesión del injerto mediada por anticuerpos. El producto de la escisión del complemento C4d es un marcador para la activación de la ruta clásica dependiente de anticuerpos. Los depósitos de C4d capilares en biopsias de aloinjertos de riñón se asociaron con un resultado pobre del injerto.

25 Recientemente, cada vez más pruebas indican que la activación del complemento contribuye significativamente a la sensibilización de receptores de aloinjertos y al desarrollo de lesión tisular en aloinjertos (Platt et al., 1999). Los anticuerpos son los mediadores más minuciosamente investigados de la activación de la ruta clásica del
 30 complemento. Clínicamente, se sabe que los aloanticuerpos activan el complemento (Baldwin et al., 2001). Halloran y Collins indican que la disposición de C4d en capilares peritubulares de aloinjertos renales es un marcador sensible y de diagnóstico de rechazo humoral agudo que se correlaciona fuertemente con la presencia de anticuerpos
 35 circulantes específicos del donante (Collins et al., 1999; Halloran, 2003). Pruebas adicionales sustentadoras se observan en animales con inhibición (Pratt et al., 1996; Pruitt et al., 1991; Forbes et al., 1978) o deficiencia (Pratt et al., 2000; Baurer et al., 1995) del complemento que muestran lesión inflamatoria significativamente reducida y
 40 respuestas inmunitarias anti-donante reducidas. En ABMR, se sugiere que el complemento es activado por la ruta clásica, y desempeña un papel principal en la patogénesis (Collard et al., 1997). Aunque el papel del complemento en HAR o rechazo vascular agudo (AVR) tras el xenotrasplante está bien documentado (Platt et al., 1999), todavía no se han elucidado los mecanismos precisos del complemento en la patogénesis de ABMR tras el alotrasplante.

45 El componente C5 del complemento se escinde para formar productos con múltiples efectos proinflamatorios, y de este modo representa una diana atractiva para la inhibición del complemento dentro de la respuesta inflamatoria mediada de forma inmunitaria. Como se describe anteriormente, C5a es una anafilatoxina y factor quimiotáctico
 50 poderosos. La activación celular mediante C5a induce la liberación de múltiples mediadores inflamatorios adicionales (Jose et al., 1983). Las rutas de activación del complemento (clásicas, alternativas, o ruta de lectina que se une a manano) conduce en último lugar a la formación del complejo de ataque a la membrana citolítico C5b-9
 55 (Kirschfunk, 2001), que puede mediar tanto la lesión tisular directa por lisis celular como la activación de células proinflamatorias a dosis sublépticas (Saadi et al., 1995; Papadimitriou et al., 1991). Por lo tanto, el bloqueo de la generación de tanto C5a como C5b-9 puede ser necesario para la inhibición óptima de la respuesta inflamatoria
 60 mediada por el complemento tras el trasplante. Al mismo tiempo, la inhibición de la cascada del complemento en C5 no altera la generación de C3b, conservando la opsonización mediada por C3b de microorganismos patógenos así como la solubilización y aclaramiento de complejos inmunitarios (Liszewski, 1993).

65 El efecto beneficioso de mAb anti-C5 se ha dado a conocer previamente en varios modelos experimentales, incluyendo reperfusión miocárdica (Vakeva et al., 1998), lupus eritematoso sistémico (Wang et al., 1996) y artritis reumatoide (Wang et al., 1995), así como en ensayos clínicos humanos (Kirschfink, 2001) de enfermedad autoinmunitaria, derivación cardiopulmonar e infarto agudo de miocardio. Además, la inactivación del complemento
 70 mediante un Ab monoclonal (mAb) anti-C5 funcionalmente bloqueante evitó HAR en modelos de xenotrasplante (Kroshus et al., 1995; Wang et al., 1999).

75 Se han ensayado métodos para retrasar el rechazo de alotrasplantes mediante la administración de inhibidores del complemento. La solicitud de patente PCT publicada WO 92/10205 describe el uso de una combinación de ciclosporina y un receptor del complemento soluble (sCR1) para inhibir el rechazo de un alotrasplante cardíaco en
 80 un modelo de rata presensibilizada. El receptor 1 del complemento se une a los complementos C3b y C4b. Las formas solubles del receptor 1 del complemento se producen de forma natural o se pueden generar vía procedimientos de ADN recombinante. Estos receptores del complemento solubles han inhibido in vitro las consecuencias de la activación del complemento (patente U.S. 6.057.131). En el documento WO 92/10205, se
 85 administró a ratas, que se habían presensibilizado al aloinjerto cardíaco que estaban recibiendo, ciclosporina A intramuscularmente a 10 mg/kg/día, comenzando dos días antes del trasplante y continuando hasta el momento del rechazo del injerto. Adicionalmente, se administró receptor 1 del complemento soluble (sCR1) como un bolo intravenoso único a 15 mg/kg inmediatamente antes de la reperfusión del injerto. Los animales del control sin
 90 tratamiento farmacéutico habían rechazado el injerto a un promedio de 3,8 días. Aquellos a los que se les administró ciclosporina A sola rechazaron los injertos a un promedio de 57 días (esto fue bastante variable, rechazando rápidamente dos ratas a 2 y 4 días, y una tercera rata rechazando a 166 días). Las ratas a las que se les administró
 95 sCR1 solo rechazaron los injertos a un promedio de 44 días. Aquellas ratas a las que se les administró la

combinación de ciclosporina A y sCR1 rechazaron los injertos a un promedio de 147 días. Se observó que la combinación de ciclosporina A crónica y un único bolo de sCR1 da como resultado un efecto sinérgico que prolonga enormemente el tiempo hasta el rechazo del injerto. Estudios más tempranos por Pruitt y Bollinger (1991) usaron un modelo similar de un aloinjerto de rata presensibilizada para mostrar que la administración de sCR1 solo para inactivar el complemento dio como resultado un incremento del tiempo antes del rechazo del injerto.

Sims et al. (patente U.S. 5.135.916) sugieren el uso de inhibidores del complemento, por ejemplo CD59 o anticuerpos contra C7 o C9 para bloquear la formación del complejo de C5b-9, para tratar el endotelio vascular de órganos y tejidos a transplantar. Esto evitaría la necrosis celular iniciada por C5b-9. Los inactivadores de C5b-9 se añadirían al perfusado o medio de almacenamiento para proteger las células del forro vascular de la activación del complemento en curso durante el almacenamiento in vitro. Adicionalmente, el órgano o tejido se protegería de los efectos citolíticos y trombóticos que surgen de la activación del complemento iniciada con el trasplante, evitando de ese modo el rechazo agudo mediado por el complemento. Sims et al. (patente U.S. 5.573.940 y patente U.S. 6.100.443) también enseñan un método para expresar CD59 en el tejido u órgano transplantado, para proteger el órgano transplantado del rechazo. Esto se puede lograr transfectando las células que se transplantan.

Aunque los varios fármacos desarrollados hasta la fecha en combinación con métodos de preselección de donantes y receptores para compatibilizar el aloinjerto del donante con el receptor han incrementado a lo largo del tiempo la duración promedio del tiempo de supervivencia de aloinjertos, muchos aloinjertos son no obstante rechazados durante el tiempo de vida del receptor. En general, los avances de la técnica anterior han estado dirigidos principalmente para acabar con el rechazo agudo del injerto. Además, el papel de componentes del complemento terminal activados en rechazo de aloinjerto mediado por anticuerpos no se ha examinado usando inhibidores que seleccionan especialmente como diana la cascada del complemento al nivel de la proteína C5. Los métodos descritos aquí y como se ejemplifican en los Ejemplos avanzan la técnica de alotransplantes al inhibir el rechazo crónico de aloinjertos, en particular aloinjertos en un receptor presensibilizado. Se presentan nuevos métodos para prolongar adicionalmente la supervivencia del aloinjerto usando una combinación apropiada de fármacos inmunosupresores en combinación con una administración crónica de un inhibidor del complemento.

Métodos y usos

Los medios descritos aquí se usan para prolongar la supervivencia del aloinjerto. Los medios incluyen generalmente usar un inhibidor de la actividad del complemento como se define en las reivindicaciones, en combinación con uno o más inmunosupresores.

Los inhibidores adecuados adicionales del complemento son conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden obtener anticuerpos frente a componentes individuales del complemento activado, por ejemplo anticuerpos frente a C5a, C7, C9, etc. (véanse, por ejemplo, patente U.S. 6.534.058; solicitud de patente publicada U.S. US 2003/0129187; y patente U.S. 5.660.825). Se conocen proteínas que inhiben la lisis mediada por el complemento, incluyendo CD59, CD55, CD46 y otros inhibidores de C8 y C9 (véase, por ejemplo, la patente U.S. 6.100.443). La patente U.S. 6.355.245 enseña un anticuerpo que se une a C5 y evita que sea escindido en C5a y C5b, evitando así la formación no sólo de C5a sino también del complejo de C5b-9. También se conocen proteínas conocidas como receptores del complemento y que se unen al complemento (véase la Solicitud de Patente PCT Publicada WO 92/10205 y la patente U.S. 6.057.131). El uso de formas solubles de receptores del complemento, por ejemplo CR1 soluble, puede inhibir las consecuencias de la activación del complemento, tales como el estallido oxidativo de neutrófilos, hemólisis mediada por el complemento, y producción de C3a y C5a. Los expertos en la técnica reconocen lo anterior como algunos, pero no todos, de los métodos conocidos para inhibir el complemento y su activación.

Los inmunosupresores adecuados incluyen, pero no se limitan a, ATG o ALG, OKT3, daclizumab, basiliximab, corticosteroides, 15-desoxiespergualina, ciclosporinas, tacrolimus, azatioprina, metotrexato, micofenolato mofetilo, 6-mercaptopurina, bredinina, brequinar, leflunamida, ciclofosfamida, sirolimus, anticuerpos monoclonales anti-CD4, CTLA4-Ig, anticuerpos monoclonales anti-CD154, anticuerpos monoclonales anti-LFA1, anticuerpos monoclonales anti-LFA-3, anticuerpos monoclonales anti-CD2, y anti-CD45.

Un aloinjerto puede incluir un órgano transplantado, parte de un órgano, tejido o célula. Estos incluyen, pero no se limitan a, corazón, riñón, pulmón, páncreas, hígado, tejido vascular, ojo, córnea, lente, piel, médula ósea, músculo, tejido conjuntivo, tejido gastrointestinal, tejido nervioso, hueso, células madre, islotes, cartílago, hepatocitos, y células hematopoyéticas.

Al menos parte de la razón para el fallo de los aloinjertos es que una respuesta por parte del receptor de un aloinjerto es la activación del complemento. Esto da como resultado la formación de C5a y C5b-9, que son moléculas proinflamatorias potentes que ayudan a provocar fallo del injerto. Sin estar atados por ninguna teoría propuesta, se teoriza que la inhibición de la formación de C5a y de C5b-9, o la inhibición de C5a y C5b-9 que estén presentes, ayudaría a prevenir el fallo del injerto. Además, se teoriza que en tanto que el aloinjerto esté presente, el receptor continuará intentando montar una respuesta inmunitaria contra el injerto, y esta respuesta incluirá intentos de producir C5a y C5b-9. Si no se previene, esta respuesta del complemento conducirá a rechazo vascular agudo a corto plazo, y podría contribuir a rechazo crónico del injerto a largo plazo. Los métodos de la técnica anterior de uso

de inhibidores de la actividad del complemento estaban limitados a administrar estos inhibidores solamente en el momento del trasplante. Esto fue de ayuda para prevenir el rechazo agudo, pero como ilustran los resultados descritos aquí, se obtienen resultados mejorados mediante la administración de tales inhibidores a un plazo más largo. Esta administración a largo plazo ayuda a prevenir un rechazo crónico del aloinjerto, en oposición a solo
5 ayudar a prevenir un rechazo agudo. El resultado es una supervivencia a más largo plazo del aloinjerto en comparación con no administrar un inhibidor de la actividad del complemento o administrar tal inhibidor sólo en el momento del trasplante del aloinjerto. Aunque muy habitualmente es deseable que el aloinjerto sobreviva durante el tiempo de vida que quede del receptor, hay veces en las que el aloinjerto se necesita solamente para un período de tiempo más corto, por ejemplo un órgano puente para superar el tiempo hasta que el propio órgano del receptor se pueda recuperar por sí mismo, en cuyo momento ya no se necesitará el aloinjerto. La duración de tiempo que se
10 necesitará tal injerto variará, pero habitualmente será mayor que el tiempo al que se produciría el rechazo agudo, y puede ser suficientemente prolongado para que ocurra el rechazo crónico. Este período de supervivencia deseada para un injerto puente puede ser varios meses, por ejemplo seis meses.

Para demostrar que la inhibición a largo plazo de la actividad del complemento prolongará la supervivencia del aloinjerto, se llevaron a cabo experimentos en los que se inhibió la activación del complemento de una manera crónica y no simplemente en el momento del trasplante. El tratamiento crónico significa el tratamiento durante un período prolongado hasta el tiempo de vida del aloinjerto. Este puede ser un tratamiento diario, pero no está limitado al tratamiento diario. El tratamiento crónico mantendrá una cantidad eficaz del fármaco en el receptor del aloinjerto. Por ejemplo, un método preferido es incluir el anticuerpo monoclonal anti-C5 eculizumab en el tratamiento. En
20 estudios de personas que sufren hemoglobinuria nocturna paroxística (PNH), eculizumab se ha administrado a una dosis de 900 mg/paciente una vez cada 12-14 días. Se ha encontrado que esta dosificación bloquea completa y consistentemente la actividad del complemento terminal, y ha inhibido enormemente los síntomas de PNH (Hillmen et al., 2004). La dosis administrada es capaz de bloquear los efectos del complemento durante aproximadamente dos semanas antes de que el eculizumab se inactive o se elimine del cuerpo. Por lo tanto, un tratamiento crónico de eculizumab puede ser, por ejemplo, la administración de 900 mg al receptor del aloinjerto una vez cada dos
25 semanas durante el tiempo de vida restante del paciente. De forma similar, otros fármacos se pueden suministrar crónicamente según sea necesario, ya sea sobre una base diaria o si se requiere otro calendario para mantener una cantidad eficaz del fármaco en el receptor del aloinjerto. Debido a que es bien conocido que el rechazo del injerto puede estar provocado por más de solamente la activación del complemento, por ejemplo mediante actividad de linfocitos T, los experimentos incluyeron inmunosupresores, tales como ciclosporina, para ayudar adicionalmente a
30 prevenir el rechazo del injerto.

Un método preferido para inhibir la actividad del complemento es usar un anticuerpo monoclonal que se une a C5 del complemento y evita que C5 se escinda. Esto evita la formación tanto de C5a como de C5b-9 mientras que al mismo tiempo permite la formación de C3a y C3b, que son beneficiosos para el receptor. Tales anticuerpos que son
35 específicos para el complemento humano son conocidos (patente U.S. 6.355.245). Estos anticuerpos descritos en la patente U.S. 6.355.245 incluyen tanto un anticuerpo completo o de anticuerpo de longitud completa (ahora denominado eculizumab) como un anticuerpo monocatenario (ahora denominado pexelizumab). Un anticuerpo similar contra C5 de ratón se denomina BB5.1 (Frei et al., 1987). BB5.1 se utilizó en los experimentos expuestos más abajo. Los anticuerpos para inhibir la actividad del complemento no necesitan ser anticuerpos monoclonales. Pueden ser, por ejemplo, anticuerpos policlonales. Adicionalmente pueden ser fragmentos de anticuerpos. Un
40 fragmento de anticuerpo incluye, pero no se limita a, un Fab, F(ab'), F(ab')₂, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo de dominio y un Fv. Además, es bien conocido por los expertos en la técnica que los anticuerpos pueden ser humanizados (Jones et al., 1986), quimerizados, o desimmunizados. Un anticuerpo también puede comprender una porción Fc mutada, de manera que el Fc mutante no active el complemento. Los anticuerpos a usar en la
45 presente descripción pueden ser cualquiera de estos. Es preferible usar anticuerpos humanizados cuando el receptor del aloinjerto es un ser humano.

Administración y formulaciones

La administración del inhibidor de la actividad del complemento como se define en las reivindicaciones se lleva a cabo según métodos conocidos por los expertos en la técnica. Estos inhibidores se administran preferiblemente
50 antes del momento del trasplante del aloinjerto, o en el momento del trasplante continuando la administración de una manera crónica. Estos inhibidores se pueden administrar adicionalmente durante un episodio de rechazo en el caso de que se produzca tal episodio.

La presente descripción también proporciona usos de un fármaco que inhibe la actividad del complemento como se define en las reivindicaciones y un agente inmunosupresor en la fabricación de un medicamento o paquete de medicamento. Tal medicamento o paquete de medicamento es útil para prolongar la supervivencia del aloinjerto en un receptor, en particular la supervivencia crónica del aloinjerto. En realizaciones preferidas, el medicamento o paquete de medicamento se formula y prepara de manera que sea adecuado para la administración crónica al receptor del aloinjerto, por ejemplo se emplean formulaciones estables. En ciertas realizaciones, el medicamento o paquete de medicamento se formula y se prepara de manera que sea adecuado para la administración concurrente del fármaco que inhibe la actividad del complemento como se define en las reivindicaciones y el fármaco
60 inmunosupresor al receptor del aloinjerto. En ciertas realizaciones, el medicamento o paquete de medicamento se formula y se prepara de manera que sea adecuado para la administración secuencial (en cualquier orden) del

fármaco que inhibe la actividad del complemento como se define en las reivindicaciones y el fármaco inmunosupresor al receptor del aloinjerto.

5 Un paquete farmacéutico de la presente descripción puede comprender un fármaco que inhibe la actividad del complemento como se define en las reivindicaciones y al menos un agente inmunosupresor. El paquete farmacéutico puede comprender además una etiqueta para la administración crónica. El paquete farmacéutico puede comprender también una etiqueta para la autoadministración por un paciente, por ejemplo un receptor de un injerto de trasplante, o instrucciones para un cuidador de un receptor de un injerto de trasplante. En ciertas realizaciones, el fármaco y el agente en el paquete farmacéutico están en una formulación o formulaciones distintas que son adecuadas para la administración crónica y/o autoadministración.

10 La presente descripción también proporciona formulaciones liofilizadas y formulaciones adecuadas para inyección. Ciertas realizaciones proporcionan una formulación de anticuerpo liofilizada que comprende un anticuerpo que inhibe la actividad del complemento y un lioprotector. En realizaciones preferidas, la formulación del anticuerpo es adecuada para la administración crónica, por ejemplo la formulación del anticuerpo es estable. Realizaciones alternativas proporcionan un sistema de inyección que comprende una jeringuilla; la jeringuilla comprende un cartucho que contiene un anticuerpo que inhibe la actividad del complemento y está en una formulación adecuada para inyección.

20 Un anticuerpo como se define en las reivindicaciones y como se emplea en diversas realizaciones de la presente descripción inhibe preferiblemente la formación de complemento terminal o C5a. En ciertas realizaciones, el anticuerpo que inhibe la formación del complemento terminal o C5a es un anticuerpo completo o un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo completo o el fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humano, humanizado, quimerizado o desinmunizado. En ciertas realizaciones, el anticuerpo completo o el fragmento de anticuerpo puede inhibir la escisión del complemento C5. En ciertas realizaciones, el fragmento de anticuerpo es un Fab, un F(ab')₂, un Fv, un anticuerpo de dominio, o un anticuerpo monocatenario. En realizaciones preferidas, el fragmento de anticuerpo es pexelizumab. En realizaciones preferidas alternativas, el anticuerpo completo es eculizumab.

30 En ciertas realizaciones, el anticuerpo como se define en las reivindicaciones, que inhibe la actividad del complemento, está presente en una forma de dosificación unitaria, que puede ser particularmente adecuada para la autoadministración. De forma similar, también puede estar presente en forma de dosificación unitaria un agente inmunosupresor de la presente descripción. Un producto formulado de la presente descripción se puede incluir en un recipiente, típicamente, por ejemplo, un vial, cartucho, jeringuilla llenada previamente, o pluma desechable. También se puede usar un dosificador, tal como el dispositivo dosificador descrito en la patente U.S. 6.302.855, por ejemplo, con un sistema de inyección de la presente descripción.

35 Una formulación "estable" es aquella en la que el fármaco (por ejemplo, un anticuerpo) o agente en ella retiene esencialmente su estabilidad física y química y su integridad con el almacenamiento. Existen en la técnica diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad proteica, y se repasan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. Por ejemplo, el grado de agregación tras la liofilización y almacenamiento se puede usar como un indicador de la estabilidad proteica. Por ejemplo, una formulación "estable" puede ser aquella en la que menos de alrededor de 10%, y preferiblemente menos de alrededor de 5% de la proteína está presente como un agregado en la formulación. En otras realizaciones, se puede determinar cualquier incremento en la formación de agregados tras la liofilización y almacenamiento de la formulación liofilizada. Por ejemplo, una formulación liofilizada "estable" puede ser aquella en la que el incremento en agregado en la formulación liofilizada es menor que alrededor de 5%, y preferiblemente menor que alrededor de 3%, cuando la formulación liofilizada se almacena a 2-8°C durante al menos un año. En otras realizaciones, la estabilidad de la formulación proteica se puede medir usando un ensayo de actividad biológica.

50 Una "formulación reconstituida" es aquella que se ha preparado disolviendo una formulación proteica liofilizada en un diluyente de manera que la proteína se dispersa en la formulación reconstituida. La formulación reconstituida es adecuada para la administración (por ejemplo administración parenteral) a un paciente a tratar con la proteína de interés, y, en ciertas realizaciones de la invención, puede ser aquella que sea adecuada para la administración subcutánea.

55 Una formulación reconstituida isotónica es preferible en ciertas realizaciones. Por "isotónica" se quiere decir que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán generalmente una presión osmótica de alrededor de 250 a 350 mOsm. La isotonicidad se puede medir usando una presión de vapor o un osmómetro de tipo congelación por hielo, por ejemplo.

Un "lioprotector" es una molécula que, cuando se combina con un fármaco (por ejemplo, anticuerpo) de interés previene o reduce significativamente la inestabilidad química y/o física del fármaco (por ejemplo, anticuerpo) con la liofilización y almacenamiento subsiguiente. Los lioprotectores ejemplares incluyen azúcares tales como sacarosa o trehalosa; un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina tal como betaína; una sal

liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes trihidroxilados o alcoholes de azúcares superiores, por ejemplo glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol, y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; Pluronic; y sus combinaciones. El lioprotector preferido es un azúcar no reductor, tal como trehalosa o sacarosa.

5 El lioprotector se añade a la formulación preliofilizada en una "cantidad lioprotectora", lo que significa que, tras la liofilización del fármaco (por ejemplo, anticuerpo) en presencia de la cantidad lioprotectora del lioprotector, el fármaco (por ejemplo, anticuerpo) retiene esencialmente su estabilidad física y química y su integridad con la liofilización y almacenamiento.

10 El "diluyente" de interés aquí es aquel que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para la administración a un ser humano) y es útil para la preparación de una formulación reconstituida. Los diluyentes ejemplares incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWF1), una disolución de pH tamponado (por ejemplo, disolución tamponada con fosfato), disolución salina estéril, disolución de Ringer o disolución de dextrosa.

15 Un "conservante" es un compuesto que se puede añadir al diluyente para reducir esencialmente la acción bacteriana en la formulación reconstituida, facilitando de este modo la producción de una formulación reconstituida de múltiples usos, por ejemplo. Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en la que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga), y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol.

20 Un "agente de voluminosidad" es un compuesto que añade masa a la mezcla liofilizada y contribuye a la estructura física de la torta liofilizada (por ejemplo, facilita la producción de una torta liofilizada esencialmente uniforme que mantiene una estructura de poros abiertos). Los agentes de voluminosidad ejemplares incluyen manitol, glicina, polietilenglicol y sorbitol.

25 En consecuencia, una formulación de anticuerpo liofilizada estable se puede preparar usando un lioprotector (preferiblemente un azúcar tal como sacarosa o trehalosa), formulación liofilizada la cual se puede reconstituir para generar una formulación reconstituida estable que tiene una concentración de anticuerpo que es significativamente mayor (por ejemplo de alrededor de 2-40 veces mayor, preferiblemente 3-10 veces mayor, y lo más preferible 3-6 veces mayor) que la concentración de anticuerpo en la formulación preliofilizada. Tales concentraciones proteicas elevadas en la formulación reconstituida se consideran particularmente útiles cuando la formulación está destinada a la administración subcutánea. A pesar de la concentración proteica muy elevada en la formulación reconstituida, la formulación reconstituida puede ser estable (es decir, no presenta niveles significativos o inaceptables de inestabilidad química o física de la proteína) a 2-8°C durante al menos alrededor de 30 días. Véase la patente U.S. 6.821.515. En ciertas realizaciones, la formulación reconstituida es isotónica.

35 Cuando se reconstituye con un diluyente que comprende un conservante (tal como agua bacteriostática para inyección, BWF1), la formulación reconstituida se puede usar como una formulación de múltiples usos. Tal formulación es útil, por ejemplo, cuando un paciente requiere administraciones frecuentes del fármaco o anticuerpo y/o agente para tratar una afección médica crónica. La ventaja de una formulación de múltiples usos es que facilita el uso para el paciente, reduce los desechos al permitir el uso completo de los contenidos del vial, y da como resultado ahorros de coste significativos para el fabricante puesto que varias dosis se envasan en un único vial (menores costes de llenado y transporte).

40 La presente descripción también describe un método para preparar una formulación, que comprende las etapas de: (a) liofilizar una mezcla de un anticuerpo y un lioprotector; y (b) reconstituir la mezcla liofilizada de la etapa (a) en un diluyente de manera que la formulación reconstituida sea isotónica y estable.

45 También se describe aquí un artículo de fabricación que comprende: (a) un recipiente que contiene una mezcla liofilizada de un anticuerpo y un lioprotector; y (b) instrucciones para reconstituir la mezcla liofilizada con un diluyente hasta una concentración de anticuerpo deseable en la formulación reconstituida. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que contiene un diluyente (por ejemplo agua bacteriostática para inyección (BWF1) que comprende un alcohol aromático).

50 Un sistema de inyección de la presente descripción puede emplear una pluma de suministro de medicación como se describe en la patente U.S. 5.308.341. Las plumas de suministro de medicación se han desarrollado para facilitar la autoadministración de la medicación. Una medicación de la presente descripción puede ser un fármaco que inhibe la actividad del complemento, por ejemplo un anticuerpo específico contra el complemento C5, y/o un agente inmunosupresor. Una pluma de suministro de medicación incluye un contenedor de vial en el que se puede acoplar un vial de insulina u otra medicación. El contenedor de vial es una estructura alargada generalmente tubular con extremos proximales y distales. El extremo distal del contenedor de vial incluye un medio de montaje para acoplar una cánula de aguja de dos extremos. El extremo proximal también incluye medio de montaje para acoplar un cuerpo de pluma que incluye un accionador y un aparato de ajuste de la dosis. Un vial desechable que contiene medicación para uso con el contenedor de vial de la técnica anterior incluye un extremo distal que tiene un tabique elastomérico punzable que se puede punzar por un extremo de una cánula de aguja de dos extremos. El extremo

proximal de este vial incluye un tapón dispuesto de forma deslizable en acoplamiento hermético fluido con la pared cilíndrica del vial. Esta pluma de suministro de medicación se usa insertando el vial de medicación en el contenedor de vial. Entonces se conecta un cuerpo de la pluma al extremo proximal del contenedor de vial. El cuerpo de la pluma incluye un aparato de ajuste de la dosis para diseñar una dosis de medicación a suministrar por la pluma, y un aparato accionador para mover el tapón del vial distalmente una distancia que corresponde a la dosis seleccionada.

El usuario de una pluma monta una cánula de aguja de dos extremos en el extremo distal del contenedor de vial, de manera que el punto proximal de la cánula de aguja perfora el tabique en el vial. El paciente selecciona entonces una dosis y hace funcionar a la pluma para mover el tapón distalmente para suministrar la dosis seleccionada. El aparato seleccionador de la dosis vuelve a cero al inyectar la dosis seleccionada. El paciente retira entonces y desecha la cánula de aguja, y conserva la pluma de suministro de medicación de la técnica anterior en una localización conveniente para la siguiente administración de medicación requerida. La medicación en el vial se agotará después de varias de tales administraciones de medicación. El paciente separa entonces el contenedor de vial del cuerpo de la pluma. El vial vacío se puede eliminar entonces y desechar. Se puede insertar un nuevo vial en el contenedor de vial, y el contenedor de vial y el cuerpo de la pluma se pueden volver a ensamblar y usar como se explica anteriormente.

En consecuencia, una pluma de suministro de medicación tiene generalmente un mecanismo de accionamiento para la dosificación exacta y facilidad de uso. Un mecanismo de dosificación, tal como un pulsador giratorio, permite al usuario ajustar de forma exacta la cantidad de medicación que se inyectará por la pluma desde un vial de medicación preenvasado. Para inyectar la dosis de medicación, el usuario inserta la aguja bajo la piel y oprime el pulsador una vez tanto como se deje oprimir. La pluma puede ser un dispositivo completamente mecánico, o se puede combinar con circuitería electrónica para ajustar de forma exacta y/o indicar la dosis de medicación que se inyecta al usuario. Véase la patente U.S. 6.192.891.

La presente descripción también presenta formulaciones de liberación controlada o liberación extendida adecuadas para la administración crónica y/o autoadministración de una medicación.

Las diversas formulaciones se pueden administrar a un paciente que necesite de tratamiento (por ejemplo, un receptor de un aloinjerto) con la medicación (por ejemplo, un anticuerpo de la presente descripción y al menos un agente inmunosupresor) mediante administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua a lo largo de un período de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasnovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación.

En ciertas realizaciones, una formulación se administra al paciente mediante administración subcutánea (es decir, por debajo de la piel). Para tales fines, la formulación se puede inyectar usando una jeringuilla. Sin embargo, existen otros dispositivos para la administración de la formulación, tales como dispositivos de inyección (por ejemplo los dispositivos Inject-ease® y Genject®); plumas inyectoras (tales como GenPen®); dispositivos sin agujas (por ejemplo MediJector® y BioJector®); y sistemas de suministro de parches subcutáneos.

Los presentes métodos y usos se describen con referencia a los siguientes Ejemplos, que se ofrecen a título de ilustración y no pretenden limitar la descripción de ninguna manera. Se utilizan técnicas estándar bien conocidas en la técnica, o las técnicas específicamente descritas más abajo. Aquí se usan las siguientes abreviaturas: ABMR, rechazo mediado por anticuerpos; ACHR, rechazo humoral acelerado; ACR, rechazo celular agudo; AVR, rechazo vascular agudo; CsA, ciclosporina; CyP, ciclofosfamida; HAR, rechazo hiperagudo; MCP-1, proteína quimiotáctica monocítica 1; MST, tiempo medio de supervivencia; POD, día tras la operación.

Ejemplo 1

Métodos

Animales y fármacos inmunosupresores. Ratonos C3H (H-2^k) adultos machos y ratones BALB/c (H-2^d) (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine) que pesan 25-30 g se escogieron como donantes y receptores, respectivamente. En los grupos que reciben inmunosupresión, a los receptores se les inyectó con CsA (15 mg/kg/día, s.c., diariamente desde el día 0 hasta el rechazo de punto final o hasta el día 100), o con CyP (40 mg/kg/día, i.v., en el día 0 y 1), o con mAb anti-C5 (clon BB5.1, Alexion Pharmaceuticals Inc., 40 mg/kg/día, i.p., día 0-2, seguido de dos veces a la semana, día 0-60). Los animales se enjaularon en condiciones convencionales en el Animal Care Facility, University of Western Ontario, y se cuidaron según las directrices establecidas por el Canadian Council on Animal Care. Olfert et al., 1993.

Presensibilización de la piel. Se cortaron injertos de piel de grosor completo procedentes de donantes C3H en trozos cuadrados de 1 x 1 cm² y se transplantaron en la parte posterior del tórax de receptores BALB/c una semana antes del trasplante de corazón de los mismos donantes. El rechazo se definió como necrosis completa de los injertos de piel.

Trasplante cardíaco abdominal y cervical. Siete días después de la presensibilización de la piel, corazones de ratón C3H se transplantaron en el abdomen de receptores BALB/c presensibilizados mediante anastomosis de la aorta del donante y la aorta del receptor, y la arteria pulmonar del donante y la vena cava inferior del receptor. En los grupos con retransplante, los segundos injertos de corazón procedentes de ratones C3H sin tratamiento previo o de

receptores BALB/c presensibilizados que sobreviven a largo plazo se transplantaron en el área cervical de los receptores que poseen un primer injerto de corazón abdominal que sobrevive a largo plazo, mediante anastomosis de la aorta del donante y la arteria carótida del receptor, y la arteria pulmonar del donante y la vena yugular externa del receptor (extremo a lado). Los injertos de corazón se monitorizaron diariamente hasta el rechazo excepto que se indique de otro modo, y el rechazo se definió como cese total de pulsación.

Grupos experimentales. Los receptores presensibilizados se asignaron al azar a ocho grupos, consistiendo cada uno en ocho animales: Grupo 1, ratones sin tratamiento; Grupo 2, ratones tratados con CsA; Grupo 3, ratones tratados con CyP; Grupo 4, ratones tratados con CsA más CyP; Grupo 5, ratones tratados con mAb anti-C5; Grupo 6, ratones tratados con mAb anti-C5 más CsA; Grupo 7, ratones tratados con mAb anti-C5 más CyP; Grupo 8, ratones tratados con mAb anti-C5 en combinación con CsA y CyP. Cuando los pulsos cardíacos ya no fueron palpables, o a POD100, los injertos se retiraron para la histología normal, la inmunohistoquímica y el análisis de transferencia western, se recogieron muestras de suero para el análisis de citometría de flujo y el ensayo hemolítico del complemento. Cinco animales adicionales se colocaron y sacrificaron en los grupos 6 y 8 a POD3 (MST para los grupos 1-5, 7) para permitir comparaciones a un punto de tiempo uniforme. También se recogieron muestras de suero a POD 11, 21, 28 y 60 en el Grupo 8, para detectar los cambios secuenciales de los niveles de anticuerpo anti-donante y la actividad del complemento. Además, cuando receptores presensibilizados tratados con terapia triple portaron un primer injerto de corazón durante 100 días, se retransplantaron con un segundo corazón. Como segundo corazón, se usó un corazón de C3H sin tratamiento previo o un corazón de C3H que sobrevive durante 100 días procedente de otro receptor BALB/c presensibilizado. En cada grupo de retransplante se incluyeron ocho animales.

Histología del injerto. Las muestras tisulares se fijaron en formaldehído tamponado al 10%. Los especímenes se embebieron entonces en parafina, y se seccionaron para la tinción con H&E. Las secciones microscópicas se examinaron de manera enmascarada para determinar la gravedad del rechazo por un patólogo. Los criterios para el rechazo del injerto incluyeron la presencia de vasculitis, trombosis, hemorragia e infiltración linfocítica. Estos cambios se puntuaron como: 0, sin cambio; 1, cambio mínimo; 2, cambio leve; 3, cambio moderado; o 4, cambio notable.

Inmunohistoquímica. Se cortaron secciones de cuatro micrómetros a partir de muestras tisulares embebidas en gel Tissue-Tek O.C.T gel (Optimum Cutting Temperature, Skura Finetek, Torrance, CA) montadas en portaobjetos de vidrio de microscopio revestidos con gelatina y teñidos mediante un método de tinción indirecta estándar con inmunoperoxidasa con avidina-biotina usando un kit Elite Vectastain ABC (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Los especímenes se tiñeron para células CD4⁺ y CD8⁺ con mAb anti-CD4 de ratón de rata conjugado con biotina (clon YTS 191.1.2, Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby, Ontario, Canadá) y con mAb anti-CD8 de ratón de rata conjugado con biotina (clon 53-6.7, Pharmingen, Franklin Lakes, NJ), respectivamente. Se detectó infiltración monocítica/macrofágica intrainjerto al teñir con mAb anti-Mac-1 de ratón de rata conjugado con biotina (Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby, Ontario, Canadá). La deposición de IgG e IgM de ratón en los injertos se detectó usando anti-IgG de ratón de cabra y anti-IgM de ratón de cabra conjugados con biotina (Cedarlane). Para la identificación de la deposición del complemento, las secciones se incubaron en serie con Abs policlonales anti-C3 o anti-C5 de cabra (Quidel, San Diego, CA), anti-IgG de cabra de conejo biotinilado (Vector Laboratories), y estreptavidina conjugada con HRP (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA). Los portaobjetos se lavaron con disolución salina tamponada con fosfato entre etapas, y se examinaron bajo el microscopio de luz. Se llevaron a cabo controles negativos omitiendo los anticuerpos primarios. La inmunotinción se puntuó en cinco campos de potencia elevada de cada sección, y se llevaron a cabo cinco experimentos independientes. Las secciones de tinción con inmunoperoxidasa se clasificaron de 0 a 4+ según la intensidad de la tinción: 0, negativo; 1+, equívoco; 2+, tinción débil; 3+, tinción moderada; y 4+, tinción muy intensa.

Citometría de flujo. Los anticuerpos circulantes anti-IgG y anti-IgM específicos de los donantes se evaluaron en el suero del receptor mediante citometría de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Glotz et al., (1993); Tyan et al. (1994). De forma breve, se aislaron esplenocitos de ratón C3H y se incubaron a 37°C durante 30 minutos con suero procedente de un control sin tratamiento previo y grupos experimentales. Para teñir para IgG total, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgM, las células se lavaron e incubaron con anticuerpo de cabra conjugado con FITC específico para la porción Fc de IgG de ratón, o con anticuerpo de cabra conjugado con ficoeritrina específico para la cadena μ de IgM de ratón Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), o con anti-IgG1 de ratón de cabra conjugado con FITC (CALTAG Laboratories, Burlingame, CA), o con anti-IgG2a de ratón de cabra conjugado con FITC (CALTAG), o con anti-IgG2b de ratón de cabra conjugado con FITC (CALTAG). Después de 1 hora de tinción a 4°C, las células se lavaron con PBS, se resuspendieron a 5×10^6 /ml, y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la intensidad media de la fluorescencia del canal, que representa la reactividad de unión a anticuerpo.

Ensayo hemolítico del complemento. El mAb anti-C5 purificado se diluyó en serie dos veces (175-0,1 μ g/ml) en tampón GVB²⁺ (disolución salina tamponada con gelatina Veronal: 0,1% de gelatina, 141 mM de NaCl, 0,5 mM de MgCl₂, 0,15 mM de CaCl₂, y 1,8 mM barbitol sódico), y se añadió por triplicado (50 μ l/pocillo) a una placa de 96 pocillos. Se diluyó suero de ratón BALB/c hasta 40% v/v con tampón GVB²⁺ y se añadió (50 μ l/ml) a las filas de la misma placa de 96 pocillos, de manera que la concentración final del suero de ratón BALB/c en cada pocillo fue 20%. La placa se incubó entonces a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 min. mientras se

prepararon eritrocitos de pollo. Los eritrocitos de pollo se lavaron 5 x 1 ml con tampón GVB²⁺ y se resuspendieron hasta una concentración final de 5 x 10⁷/ml en GVB²⁺. Se sensibilizaron cuatro mililitros de los eritrocitos de pollo añadiendo anticuerpo policlonal anti-RBC de pollo (Intercell Technologies, Hopewell, NJ, 0,1% v/v), y las células se incubaron a 4°C durante 15 min. con vórtice frecuente. Las células se lavaron entonces 2 x 1 ml con GVB²⁺ y se resuspendieron hasta un volumen final de 2,4 ml en GVB²⁺. Los eritrocitos de pollo (30 µl/pocillo, 2,5 x 10⁶ células) se añadieron a la placa que contiene suero y mAb anti-C5 como se describe anteriormente, se mezclaron bien, y se incubaron a 37°C durante 30 min. La placa se centrifugó entonces a 1000 x g durante 2 min., y se transfirieron 85 µl del sobrenadante a una nueva placa de microtitulación de 96 pocillos. La placa se leyó a OD 415 nm usando un lector de microplacas, y el porcentaje de hemólisis se determinó usando esta fórmula:

$$\% \text{ de hemólisis} = 100 \times \frac{(\text{OD muestra}) - (\text{OD control de GVB}^{2+})}{(\text{OD control lisado } 100\% - (\text{OD control de GVB}^{2+}))}$$

obteniéndose el control lisado al 100% mediante la adición de 100 µl de GVB²⁺ que contiene 0,1% de NP-40 a 30 µg/ml de eritrocitos de pollo como se preparan anteriormente.

Análisis de transferencia western. El tratamiento con ultrasonidos de muestras de corazón congeladas se llevó a cabo en tampón de lisis (RIPA) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a 4°C durante 1 minuto, a intervalos de 10 segundos, seguido de la microcentrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes aclarados se cuantificaron inmediatamente por triplicado en busca del contenido de proteína usando el kit de ensayo de proteínas compatible con detergente (BIO-RAD). Los lisados de corazón (10 µg de proteína/pocillo) se separaron en NuPAGE, geles de Bis-Tris de gradiente de 4-12% y sistema de tampón MES (Invitrogen), y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (tamaño de poros 0,45 µm; Invitrogen) usando un aparato de transferencia semiseco (BIO-RAD). Las membranas se cortaron apropiadamente a los pesos moleculares correctos para permitir el desarrollo de las transferencias con dos anticuerpos primarios diferentes por transferencia, de manera que cada transferencia se expuso a un anticuerpo de ensayo y un anticuerpo de control interno para asegurar la igualdad de carga de muestra. Los anticuerpos primarios de ensayo que incluyen suero policlonal de conejo anti-Bcl-2 (N-19) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y suero policlonal de conejo anti-Bcl-XS/L (M-125) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) se usaron para detectar la expresión intrainjerto de las proteínas Bcl-2 y Bcl-xl. Como anticuerpo primario de control interno, se usó suero policlonal de conejo anti-calsecuestrina (Calbiochem) (Kobayashi et al., 1999). La detección de la unión del anticuerpo primario se llevó a cabo como se describe previamente (Arp et al., 1996) exponiendo transferencias incubadas lavadas a una fracción anti-IgG de conejo de cabra policlonal conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP; Roche Laboratories), y desarrollando después apropiadamente mediante exposición para potenciar la quimioluminiscencia para anticuerpos conjugados a HRP (Roche Laboratories).

Análisis estadístico. Los datos se dan como la media ± SD. La supervivencia del aloinjerto entre grupos experimentales se comparó usando la prueba log-rank. Los hallazgos histológicos e inmunohistológicos se analizaron usando la prueba de la U de Mann-Whitney. Los datos citométricos de flujo y los datos de transferencia western se analizaron usando ANOVA de una vía. Las diferencias con valores de p menores que 0,05 se consideraron significativas.

Ejemplo 2

La presensibilización con injerto de piel de donante C3H induce ACHR mediado por anticuerpo en aloinjertos de corazón de receptores BALB/c.

Para desarrollar un modelo de animal pequeño adecuado que imite a pacientes presensibilizados en el hospital y estudiar ABMR, se ha desarrollado un nuevo modelo de ABMR de ratón totalmente incompatible con MHC a través de la presensibilización de receptores de ratón. En este modelo, receptores BALB/c se presensibilizaron con injertos de piel de donantes C3H una semana antes del trasplante de corazón procedente del mismo donante. Siete días después de la presensibilización con piel del donante, el nivel sérico de anticuerpo anti-IgG pero no IgM de donante estaba notablemente elevado y alcanzó un nivel pico en los receptores BALB/c presensibilizados (Figura 1A). Entonces se llevó a cabo el trasplante de corazón procedente del mismo donante en estos receptores muy sensibilizados. Sin inmunosupresión, los injertos de corazón de C3H fueron rechazados rápidamente en 3,1 ± 0,4 días mediante ACHR, caracterizado por trombosis severa, hemorragia e infarto (Figura 1B-a). Por el contrario, los mismos injertos de corazón en receptores BALB/c sin sensibilizar (con un tiempo de supervivencia media, MST, de 8,2 ± 0,8 días) muestran la histología normal en el día tras la operación (POD) 3 (Figura 1B-b). Cuando se comparan con receptores BALB/c sin sensibilizar en el mismo día, los injertos de corazón en animales presensibilizados revelaron anticuerpo anti-IgG masivo y deposición del complemento (C3 y C5), pero infiltración mínima de células CD4⁺ y CD8⁺ (Tabla 1). Además, los niveles circulantes anti-IgG de donante en receptores presensibilizados fueron significativamente mayores que aquellos de los mismos receptores no sensibilizados que recibieron un injerto de corazón en POD3 (P < 0,01, Figura 1C). Sin embargo, anti-IgM de donante permaneció en niveles muy bajos tanto en circulación (Figura 1C) como en injertos de corazón (Tabla 1), y no mostró diferencia significativa entre receptores no sensibilizados y sensibilizados. Además, se mostraron niveles normales de actividad hemolítica del

complemento en receptores de corazón tanto presensibilizados como no sensibilizados sin tratamiento (Figura 1D). Estos datos indican que este es un modelo de trasplante ideal para estudiar ABMR en receptores presensibilizados, en el que el complemento juega un papel importante en la patogénesis.

Tabla 1.

5 Comparación de cambios inmunohistológicos de aloinjertos de corazón de C3H en receptores BALB/c no sensibilizados y presensibilizados en el POD3

Grupos	No sensibilizados	Presensibilizados
IgG	1+	4+
IgM	1+	1+
C3	2+	3+
C5	2+	3+
CD4	0	1+
CD8	0	1+

Grados de tinción con inmunoperoxidasa: 0, negativo; 1+, equívoco; 2+, débil; 3+, moderado; 4+, intenso.

mAb anti-C5 en combinación con CsA y CyP evita ABMR y logra la supervivencia indefinida de aloinjerto de corazón en receptores de ratones presensibilizados.

10 Se ha mostrado que el complemento desempeña un papel importante en ABMR. Sin embargo, se desconoce el efecto inhibitor de bloquear funcionalmente la cascada del complemento terminal a nivel de C5 en receptores muy sensibilizados. En el estudio presentado aquí, se usó el modelo presensibilizado para estudiar la eficacia de mAb anti-C5 bien solo o bien combinado con CsA y/o CyP en la prevención de ABMR. Como se presenta en la Figura 2A, el tratamiento con CsA o CyP o con los dos fármacos en combinación no evitó ABMR, y los injertos fueron rechazados en $3,0 \pm 0,0$ días, $3,3 \pm 0,5$ días y $3,5 \pm 0,6$ días, respectivamente, con características patológicas típicas de ACHR, incluyendo trombosis intravascular y hemorragia intersticial (Figura 2B-b, c, d), que fueron indistinguibles de los injertos de corazón en receptores BALB/c presensibilizados no tratados (Figura 2B-a). La monoterapia anti-C5 o combinada con CyP no fue capaz de mejorar la supervivencia del injerto, y los injertos de corazón fueron rechazados mediante ACHR (Figura 2B-e, f) en $3,5 \pm 0,6$ días y $3,2 \pm 0,4$ días, respectivamente (Figura 2A). Aunque la terapia de combinación de mAb anti-C5 y CsA, el protocolo capaz de inducir supervivencia a largo plazo del aloinjerto de corazón en animales no sensibilizados, prolongó marginalmente la supervivencia del injerto en este modelo presensibilizado, los injertos de corazón también fueron rechazados mediante rechazo humoral severo con vasculitis, trombosis, hemorragia e infiltración celular mínima (Figura 2B-g) en $11,9 \pm 1,8$ días (Figura 2A). Por el contrario, la terapia triple de mAb anti-C5 en combinación con CsA y CyP logró la supervivencia indefinida del injerto de corazón durante 100 días (Figura 2A) en animales presensibilizados ($P < 0,01$ frente a los animales sin tratamiento o tratados con monoterapia o con dos fármacos en combinación) sin signos de rechazo (Figura 2B-h). En este modelo de ratón presensibilizado, como se muestra en la Tabla 2, sólo se observó infiltración de células CD4⁺ y CD8⁺ intrainjerto menor en los receptores que rechazaron sus corazones de injerto en 3 días. Sin embargo, el número de estos linfocitos T aumentó ligeramente si los injertos de corazón sobrevivieron más tiempo en receptores tratados con mAb anti-C5 más CsA en el momento del rechazo (POD11) y en receptores tratados con terapia triple en las etapas tempranas de la supervivencia del injerto (por ejemplo POD11). Además, con el tratamiento continuo de CsA en el grupo de terapia triple, la infiltración de células CD4⁺ y CD8⁺ se inhibió en injertos de corazón que sobreviven a largo plazo en POD60 y 100. Además, se encontró infiltración de células Mac-1⁺ intrainjerto moderada, incluyendo monocitos y macrófagos, en animales no tratados y en animales tratados con CsA, con CyP o con CsA más CyP, mientras que la infiltración de estas células se redujo significativamente en animales tratados con mAb anti-C5 (Tabla 2). Estos resultados indican que bloquear funcionalmente mAb anti-C5 permite el uso y eficacia de agentes inmunosupresores convencionales, previniendo de ese modo ABMR y logrando la supervivencia indefinida del injerto de corazón en receptores presensibilizados.

Tabla 2.

40 Grados de tinción con inmunoperoxidasa de aloinjertos de corazón en receptores de ratones presensibilizados en la necropsia

Grupos	Fecha para la recogida de muestras (POD)	C3	C5	CD4	CD8	Mac-1	IgG	IgM
No tratado	3	3+	3+	1+	1+	3+	4+	1+
CsA	3	3+	3+	1+	1+	3+	4+	1+
CyP	3	3+	3+	1+	1+	3+	3+	1+
CsA+CyP	3	3+	3+	1+	1+	3+	3+	1+
Anti-C5mAb	3	3+	0	1+	1+	2+	4+	1+
Anti-C5mAb+CsA	11	3+	0	2+	2+	2+	4+	1+
Anti-C5mAb+CyP	3	3+	0	1+	1+	2+	3+	1+
Anti-C5mAb+CsA+CyP	3	3+	0	1+	1+	2+	3+	1+
Anti-C5mAb+CsA+CyP	11	3+	0	2+	2+	1+	3+	1+
Anti-C5mAb+CsA+CyP	60	3+	0	1+	1+	0	2+	1+

Anti-C5mAb+CsA+CyP	100	3+	2+	0	0	0	2+	1+
--------------------	-----	----	----	---	---	---	----	----

Grados: 0, negativo; 1+, equívoco; 2+, débil; 3+, moderado; 4+, intenso.

mAb anti-C5 inhibe completamente la actividad hemolítica del complemento total y la deposición local de C5 en receptores presensibilizados que reciben un aloinjerto de corazón.

5 Se mostró previamente que mAb anti-C5 bloquea la escisión de la proteína C5 del complemento en las moléculas proinflamatorias C5a y C5b-9 (Kroshus et al., 1995), y bloquea completa y consistentemente la actividad del complemento terminal en ratones (Wang et al., 1999). En el estudio actual, la actividad del complemento terminal se midió evaluando la capacidad de sueros de ratón receptor para lisar eritrocitos de pollo presensibilizados con anticuerpo, y se comparó en el mismo punto de tiempo (POD3). El tratamiento de ratones con CsA o CyP, o con los dos fármacos en combinación, no tuvo ningún efecto sobre la actividad del complemento terminal, mientras que el tratamiento con mAb anti-C5, ya sea solo o combinado con CsA o/y CyP, inhibió completamente esta actividad (Figura 3; $P < 0,01$, frente a animales sin tratamiento previo y animales no tratados, así como animales tratados con CsA, con CyP, o con CsA más CyP). Además, los sueros obtenidos a partir de animales tratados con mAb anti-C5 en varios puntos de tiempo más tempranos mostraron actividad hemolítica similarmente disminuida, sugiriendo que el complemento terminal del suero fue inhibido a lo largo del período del tratamiento. Además, la deposición de C5 local en injertos de corazón se previno completamente en los receptores presensibilizados tratados con mAb anti-C5, pero no en animales presensibilizados no tratados, o tratados con CsA, con CyP, y con CsA más CyP (Tabla 2). Como se predijo, el tratamiento con mAb anti-C5 no previno la deposición de C3 en los injertos (Tabla 2). Estos resultados sugieren que la terapia anti-C5 bloquea completamente la actividad del complemento total tras el aloinjerto cardíaco en receptores muy sensibilizados.

20 Los injertos de corazón que sobreviven a largo plazo en animales presensibilizados son resistentes a lesión humoral en presencia de nivel bajo de anticuerpos anti-donante y complemento – una situación de acomodamiento.

25 Para investigar adicionalmente el papel de mAb anti-C5 en el rechazo humoral, se midieron los niveles de aloanticuerpos anti-donante en sueros de receptores mediante citometría de flujo, y la deposición de anticuerpos intrainjerto usando técnicas de inmunotinción en diferentes grupos. La Figura 4A muestra que, en el POD3, los receptores BALB/c presensibilizados no tratados tuvieron niveles elevados de anticuerpos anti-IgG de donante circulantes. Cuando los receptores presensibilizados recibieron monoterapia o dos fármacos en combinación, CsA y/o CyP disminuyeron parcialmente los niveles de anti-IgG de donante circulantes, mientras que el tratamiento con mAb anti-C5, ya sea solo o combinado con CsA o CyP, no afectó adicionalmente los niveles de anticuerpos anti-donante en el mismo día. Por el contrario, con terapia triple de mAb anti-C5, CsA y CyP, se disminuyó gradualmente un nivel elevado de anti-IgG de donante circulante y alcanzó un nivel bajo en el POD60, permaneciendo después en este nivel hasta el día 100 (Figura 4B). Similar a los niveles de anticuerpos circulantes en los diferentes grupos de tratamiento, la Tabla 2 muestra que estaba presente una fuerte deposición de anti-IgG de ratón en los injertos de corazón rechazados rápidamente de animales presensibilizados sin tratamiento o tratados con monoterapia o con dos fármacos en terapia de combinación. De forma interesante, con terapia triple, la deposición de anticuerpo IgG se atenuó gradualmente hasta un nivel leve en injertos de corazón que sobreviven a largo plazo en el POD 100 (Figura 4C-a, Tabla 2). En este modelo, IgM permaneció en niveles muy bajos en injertos de corazón en circulación (Figura 4A, B) o transplantados (Figura 4C-b, Tabla 2) en receptores presensibilizados con o sin tratamiento. Además, el tratamiento con mAb anti-C5 eliminó la actividad del complemento hasta un nivel indetectable hasta el día 60, seguido de una recuperación progresiva hasta niveles de preagotamiento en el POD 100 tras discontinuar la terapia anti-C5 en receptores de ratón presensibilizados que reciben terapia triple (Figura 4D). Además, también se detectó deposición de C5 intrainjerto en animales presensibilizados que sobreviven 100 días (Tabla 2). Estos datos demuestran que se produce acomodamiento continuado del trasplante en receptores presensibilizados tratados con terapia triple, a pesar de la presencia de anticuerpos anti-injerto y la activación del complemento.

45 mAb anti-C5 en combinación con CsA y CyP reduce la relación IgG1/IgG2a y conduce a un desplazamiento en la subclase de IgG hacia IgG2b en receptores con injertos acomodados.

50 Para determinar si la terapia triple a base de mAb anti-C5 induciría un desplazamiento en la subclase de IgG, que puede estar asociado con acomodación, se compararon los niveles séricos de las subclases de IgG anti-donante de IgG1, IgG2a e IgG2b entre receptores no tratados y los receptores con injerto de corazón acomodado. Los sueros de receptores no tratados contenían el isotipo predominante IgG1, indicado por una relación elevada de IgG1/IgG2a (Figura 5A). Por el contrario, se observó una reducción significativa en la relación de IgG1/IgG2a en los receptores que portan injertos acomodados (Figura 5A, $P < 0,01$). Además, los receptores presensibilizados con los injertos de corazón acomodados presentaron un mayor nivel de IgG2b anti-donante en comparación con los mismos receptores con injertos rechazados (Figura 5B, $P < 0,01$). Además, el patrón de isotipos de IgG en los receptores tratados con monoterapia o con dos fármacos en combinación es indistinguible de aquel de animales no tratados. Estos datos indican que el isotipo IgG1 anti-donante puede estar asociado con rechazo de injerto, mientras que la producción de la subclase IgG2b anti-donante puede funcionar como un anticuerpo protector y desempeña un papel importante en la inducción de acomodación.

55 mAb anti-C5 en combinación con CsA y CyP induce expresión intrainjerto de Bcl-2 y Bcl-xl en receptores de ratón muy sensibilizados.

Para determinar si existe una relación causal entre la expresión intrainjerto de proteínas protectoras y la resistencia del rechazo a lesión humoral en este modelo, se empleó el análisis de transferencia western para detectar proteínas de interés en tejidos de injerto de corazón procedentes de receptores de ratón muy sensibilizados. Se encontró que los injertos de corazón que sobreviven a largo plazo expresan niveles elevados de proteínas Bcl-2 y Bcl-x1 en el POD100, y estas proteínas se detectaron tan pronto como 12 días después del trasplante de corazón en receptores muy sensibilizados que reciben terapia triple a base de mAb anti-C5 (Figura 6). Por el contrario, no hubo proteínas Bcl-2 y Bcl-x1 expresadas en injertos de corazón de animales no tratados (Figura 6) o animales tratados con monoterapia o con dos fármacos en terapia de combinación. Este resultado sugiere que la resistencia del injerto a lesión humoral en animales que sobreviven de forma indefinida está asociada con la protección proporcionada por las proteínas Bcl-2 y Bcl-x1 en este modelo presensibilizado.

Receptores presensibilizados con un primer injerto de corazón acomodante aceptan un segundo injerto de corazón acomodado pero rechazan un segundo injerto de corazón sin tratamiento previo procedente de los mismos donantes.

La capacidad de los injertos acomodados para resistir el rechazo no se ha ensayado directamente en condiciones patofisiológicas en las que los injertos sin tratamiento previo sufren rechazo tras el alotrasplante. En este modelo, para determinar si receptores presensibilizados con un primer injerto de corazón acomodante aceptarán un segundo injerto acomodado pero rechazarán un segundo injerto sin tratamiento previo, se llevaron a cabo escenarios de retransplante. Después de que los injertos de corazón de C3H acomodados sobrevivieron hasta el punto del día 100, momento en el que se detectaron bajos niveles de aloanticuerpos (Figura 4B) y la actividad del complemento volvió a niveles de pretratamiento (Figura 4D), en receptor BALB/c presensibilizado tratado con terapia triple a base de mAb anti-C5, estos receptores recibieron un segundo injerto de corazón. Específicamente, se transplantó un corazón de C3H sin tratamiento previo (Figura 7A) o acomodado en el día 100 (Figura 7B) procedente de otro receptor BALB/c presensibilizado en el cuello de los receptores presensibilizados que poseen un primer corazón de C3H acomodante. Estos receptores rechazaron un segundo corazón sin tratamiento previo a los $6,6 \pm 1,1$ días (Figura 8A) con AVR severo (Figura 8B-a), mientras que el primer corazón continuó sobreviviendo. Por el contrario, cuando los corazones acomodados que habían sobrevivido ya durante 100 días en ratones presensibilizados diferentes se usaron como segundo injertos, estos injertos fueron aceptados por los receptores presensibilizados que poseen un primer injerto de corazón acomodante (Figura 8A). No hubo signos de rechazo en esos segundos injertos de corazón acomodados 90 días después del segundo trasplante (Figura 8B-b). Estos datos indican que los injertos acomodados se hacen resistentes a los efectos de anticuerpos anti-donante y del complemento que normalmente median el rechazo de aloinjertos en estos receptores presensibilizados. Además, el hecho de que el hospedante del injerto acomodado rechazó un nuevo injerto sugiere que la acomodación implica cambios al injerto.

Receptores presensibilizados que son tratados con CsA rechazan injertos de corazón acomodados.

Se llevó a cabo otro retransplante para determinar si la acomodación en este modelo presensibilizado estaría provocada por los cambios en los injertos y/o los receptores. Específicamente, después de que se acomodaron injertos de corazón de C3H en ratones BALB/c presensibilizados durante 100 días, el injerto de corazón acomodado se retransplantará entonces en un segundo receptor BALB/c presensibilizado que está siendo tratado con CsA sola (Figura 7C), una terapia que puede prevenir el rechazo celular pero no puede prevenir el rechazo humoral acelerado de un corazón de C3H reciente en ratones presensibilizados. Los injertos de corazón de C3H acomodados fueron rechazados rápidamente en receptores BALB/c presensibilizados tratados con CsA. Después del retransplante, la patología en injertos de corazón acomodados cambió de ACHR normal (Figura 9A) a ACHR severo con hemorragia intersticial masiva pero pocos infiltrados celulares (Figura 9B). Además, niveles elevados de IgG anti-donante y niveles normales de actividad hemolítica del complemento en estos receptores que reciben un corazón de C3H acomodado fueron similares a aquellos de receptores presensibilizados tratados con CsA que reciben un corazón de C3H sin tratamiento previo. Este resultado indica además que la acomodación inducida por la terapia triple a base de mAb anti-C5 puede originarse a partir de mecanismos que implican cambios no sólo para el injerto, sino también para el receptor.

Ejemplo 3

Rechazo vascular agudo en un modelo de trasplante de corazón

Se llevaron a cabo experimentos para determinar si la inclusión de un inhibidor de la formación de complemento terminal atenuaría el rechazo vascular agudo, y si el uso de tal inhibidor conjuntamente con un inmunosupresor lograría la supervivencia del aloinjerto a largo plazo. En este conjunto de experimentos, se usó un anticuerpo monoclonal anti-C5 junto con ciclosporina. El modelo usado fue un trasplante de corazón heterotópico de aloinjerto procedente de ratones C3H en ratones BALB/c. Este modelo es un modelo de rechazo vascular agudo restrictivo, siendo los ratones C3H y BALB/c fuertemente histoincompatibles para MHC. Los trasplantes y otros métodos se llevaron a cabo como se describe en Wang et al. (2003).

Trasplante cardíaco heterotópico

El trasplante cardíaco heterotópico intraabdominal se llevó a cabo como se describió previamente por Wang et al.

(2003). De forma breve, se llevó a cabo una esternotomía de la línea media en el donante, y el injerto de corazón se perfusionó lentamente in situ con 1,0 ml de disolución lactada de Ringer heparinizada fría a través de la vena cava inferior y la aorta antes de que se ligasen y se dividiesen la vena cava superior y las venas pulmonares. La aorta ascendente y la arteria pulmonar se cortaron transversalmente, y el injerto se retiró del donante. El injerto se revascularizó entonces con anastomosis de extremo a lado entre la arteria pulmonar del donante y la vena cava inferior del receptor, así como la aorta del donante y la aorta abdominal del receptor, usando sutura de nailon 11-0. El latido del corazón injertado se monitorizó diariamente mediante palpación abdominal directa. El grado de pulsación se puntuó según: A, latiendo fuertemente; B, disminución notable en la intensidad de pulsación; o C, cese total de impulsos cardíacos. Cuando los impulsos cardíacos ya no fueron palpables, el injerto se retiró para histología rutinaria. En ciertos casos, los ratones en los que el injerto todavía estaba funcionando se sacrificaron para llevar a cabo la histología.

Resultados

Ratones (ratones macho de 8-12 semanas de edad que pesan 25-30 g) se dividieron en seis grupos experimentales con seis a ocho ratones por grupo. El transplante ocurrió en el día 0. Los cambios histológicos se comprobaron en el punto final (siendo el punto final el fallo del injerto), o en algunos casos se sacrificó un ratón antes del fallo del injerto. La dosis de BB5.1 que se administró (40 mg/kg de peso corporal, tres veces por semana) se conocía de estudios previos para inhibir completamente la actividad del complemento terminal.

Grupo 1' (control) – a los ratones se les administró 0,75 ml de disolución salina intraperitonealmente en los días -1, 0, 1 y 2. Subsiguientemente, estos ratones se trataron con 0,75 ml de disolución salina intraperitonealmente tres veces por semana (lunes, miércoles, viernes) hasta el punto final.

Grupo 2' (ciclosporina A sola) – a los ratones se les administró 15 mg/kg de peso corporal de ciclosporina A subcutáneamente de forma diaria, comenzando en el día 0 (día del transplante) hasta el punto final.

Grupo 3' (anticuerpo anti-complemento solo) – a los ratones se les administró el anticuerpo anti-C5 de ratón BB5.1 (Frei et al., 1987) a 40 mg/kg de peso corporal intraperitonealmente en los días -1, 0, 1 y 2, seguido de 40 mg/kg de peso corporal administrado tres veces por semana (lunes, miércoles, viernes) hasta el punto final.

Grupo 4' (anticuerpo anti-complemento hasta el día 14 después del transplante más ciclosporina A) – a los ratones se les administró el anticuerpo anti-C5 de ratón BB5.1 a 40 mg/kg de peso corporal intravenosamente en los días -1 hasta el día 14, y también se les administró ciclosporina A a 15 mg/kg de peso corporal de forma diaria comenzando en el día 0 hasta el punto final. Obsérvese que esto difiere de los otros grupos por cuanto el BB5.1 se administró intravenosamente y de una forma diaria.

Grupo 5' (anticuerpo anti-complemento hasta el día 28 después del transplante más ciclosporina A) – a los ratones se les administró el anticuerpo anti-C5 de ratón BB5.1 a 40 mg/kg de peso corporal intraperitonealmente en los días -1, 0, 1 y 2, seguido de 40 mg/kg de peso corporal administrado tres veces por semana (lunes, miércoles, viernes) hasta el día 28, y también se les administró ciclosporina A a 15 mg/kg de peso corporal de una forma diaria comenzando en el día 0 hasta el punto final.

Grupo 6' (anticuerpo anti-complemento crónicamente hasta 100 días más ciclosporina) – a los ratones se les administró el anticuerpo anti-C5 de ratón BB5.1 a 40 mg/kg de peso corporal intraperitonealmente en los días -1, 0, 1 y 2, seguido de 40 mg/kg de peso corporal administrado tres veces por semana (lunes, miércoles, viernes) hasta 100 días, y también se les administró ciclosporina A a 15 mg/kg de peso corporal de una forma diaria comenzando en el día 0 hasta 100 días.

Los resultados de este experimento se muestran en las Tablas 3 y 4. La Tabla 3 muestra el tiempo de supervivencia para los injertos. La Tabla 4 expone las puntuaciones histológicas.

Tabla 3
Supervivencia del aloinjerto

Grupo (Tratamiento)	Supervivencia individual (días)	Tiempo medio de supervivencia (días)
1'. Disolución salina	8, 8, 8, 8, 8, 9	8,3 ± 0,5
2'. Ciclosporina A	14, 15, 15, 16, 16,16, 17	15,5 ± 1,1
3'. BB5.1	7, 8, 8, 8, 8, 9	8,0 ± 0,6
4'. BB5.1 hasta el día 14 + ciclosporina A	35, 38, 43, 45, 46, 47	42,3 ± 4,8
5'. BB5.1 hasta el día 28 + ciclosporina A	77, 80, 80, 81, 82	80 ± 1,9
6'. BB5.1 hasta el día 100 + ciclosporina A	>100 días (7 ratones; se sacrificó uno para histología)	> 100 días

Tabla 4
Puntuaciones de la mediana de cambios histológicos de aloinjertos de corazón en la necropsia

Grupos	Vasc*	Infar	Linf	Trom	Hemo	Fibrin	PMN
1'. Disolución salina (punto final)	3,0	3,0	1,0	4,0	3,0	3,0	3,0
2'. Ciclosporina A (punto final)	2,0	1,0	2,0	3,0	2,0	2,0	3,0
3'. BB5.1 (punto final)	2,0	1,0	2,0	2,0	1,0	0,0	0,0
4'. BB5.1 hasta el día 14 + ciclosporina A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5'. BB5.1 28 días + Ciclosporina A (día 8 tras la operación)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5'. BB5.1 28 días + Ciclosporina A (punto final)	0,0	0,0	1,0	1,0	2,0	1,0	0,0
6'. BB5.1 hasta el día 100 + Ciclosporina A (día 100 tras la operación)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Puntuaciones de la mediana: 0 - normal; 1- cambio mínimo; 2 – cambio leve; 3 – cambio moderado; 4 – cambio notable. N/A – no disponible.

5 *Vasc - vasculitis; Infar - infarto; Linf – infiltración linfocítica; Trom - trombosis; Hemo - hemorragia; Fibrin – deposición de fibrina; PMN – infiltrado de células polimorfonucleares

Los resultados indican los efectos sinérgicos de usar un fármaco inhibidor del complemento además de un inmunosupresor. En ratones no tratados, los injertos fueron rechazados en alrededor de 8 días. El uso del inmunosupresor ciclosporina A sola de forma crónica diariamente dio como resultado un incremento en la supervivencia del injerto hasta aproximadamente 15 días después del trasplante. El uso del anticuerpo anti-C5 BB5.1 para inhibir la formación de complemento terminal no tuvo ningún efecto por sí mismo, produciéndose el rechazo del injerto a los 8 días después del trasplante como en el grupo de control (Grupo 1'). La combinación de BB5.1 hasta el día 28 después del trasplante más ciclosporina A mostró un efecto sinérgico, prolongándose la supervivencia del injerto hasta aproximadamente el día 80. Un resultado más sorprendente es aquel del Grupo 5' en el que BB5.1 y ciclosporina A se administraron cada uno crónicamente después del trasplante. En este caso, la supervivencia del injerto fue mayor que 100 días (tanto como están actualmente disponibles los datos). Adicionalmente, los resultados histológicos mostrados en la Tabla 4 indican que la administración de tanto BB5.1 como ciclosporina A protegió al injerto de cambios mucho mejor que BB5.1 o ciclosporina A sola, y que la administración crónica de BB5.1 y ciclosporina A protegió al injerto en tal grado que incluso a los 100 días después del trasplante no hubo cambios histológicos observados en los corazones injertados. Un tiempo de supervivencia de 100 días en estos modelos se considera que es el estándar de oro. Se cree que una supervivencia de 100 días en el modelo indica que habrá una supervivencia indefinida del aloinjerto. Cuando la administración de BB5.1 se detuvo después de 28 días, los injertos estaban protegidos pero comenzaron a mostrar ciertos cambios histológicos mínimos a leves hacia alrededor del día 80, que fue el tiempo en el que se produjo el fallo del injerto.

Los ratones del Grupo 4' se trataron de forma diferente por cuanto se les administró BB5.1 de forma diaria mediante una administración intravenosa. Estos animales enfermaron, mostrando pérdida de peso y retención urinaria, y se sacrificaron en el momento en el que los corazones injertados todavía estaban latiendo aunque su función había disminuido. Este fue el primer grupo de ratones estudiado, y se desconoce por qué se observaron estos efectos de enfermedad. Estos efectos de enfermedad no se observaron cuando el BB5.1 se administró intraperitonealmente con un calendario de tres veces por semana. Como se observa más abajo en el Ejemplo 4, la administración diaria de BB5.1 vía una ruta intraperitoneal no provocó efectos de enfermedad. También, la administración intravenosa no fue necesariamente la causa de la enfermedad en estos animales. La administración intravenosa de eculizumab (un anticuerpo equivalente humano a BB5.1 por cuanto se une a C5 humano) se ha administrado con éxito de forma intravenosa sin efectos de enfermedad a seres humanos en un estudio de PNH (Hillmen et al., 2004). Los inhibidores del complemento se pueden administrar mediante otras vías, además de la intravenosa e intraperitoneal, siendo todas las citadas vías bien conocidas por los expertos en la técnica.

Ejemplo 4

Rechazo acelerado en un modelo de trasplante de corazón presensibilizado

Se llevó a cabo un segundo conjunto de experimentos similares a aquellos del Ejemplo 3, pero el ratón receptor se presensibilizó al órgano del donante. En estos experimentos, la presensibilización fue provocada por un trasplante previo de un injerto de piel. En general, la presensibilización puede ocurrir no sólo como resultado de haber recibido un aloinjerto previo, sino también puede estar provocada por haber recibido múltiples transfusiones sanguíneas, o en mujeres que han estado embarazadas. Además de tales métodos de presensibilización, los aloinjertos con una histocompatibilidad para ABO serán atacados rápidamente y rechazados debido a anticuerpos preformados contra los antígenos de ABO, excepto que se realicen etapas para prevenir tal ataque.

A algunos ratones en estos estudios se les administró ciclofosfamida además de BB5.1 y/o ciclosporina A. Para estos experimentos, los ratones receptores BALB/c se presensibilizaron con injertos de piel de C3H una semana antes del trasplante de corazón procedente del mismo donante (usando el método de Pruitt y Bollinger, 1991). Este modelo se diseña para imitar el trasplante presensibilizado en seres humanos, especialmente en relación con rechazo humoral acelerado. Los ratones receptores se dividieron en ocho grupos de seis a ocho ratones cada uno.

Los tratamientos fueron como sigue.

Grupo 1" (control) – a los ratones (ratones macho de 8-12 semanas que pesan 25-30 g) se les administró 0,75 ml de disolución salina intraperitonealmente de forma diaria comenzando en el día -1 y continuando hasta el punto final (rechazo del injerto).

5 Grupo 2" (ciclosporina A sola) – a los ratones se les administró ciclosporina A subcutáneamente a una dosis de 15 mg/kg de peso corporal comenzando en el día 0 (día del trasplante) hasta el punto final.

Grupo 3" (BB5.1 solo) – a los ratones se les administró el anticuerpo monoclonal anti-complemento de ratón BB5.1 a una dosis de 40 mg/kg de peso corporal suministrada intraperitonealmente de forma diaria comenzando en el día -1 y continuando hasta el punto final.

10 Grupo 4" (ciclofosfamida sola) – a los ratones se les administró ciclofosfamida intravenosamente a una dosis de 40 mg/kg de peso corporal en cada uno de los días 0 y 1.

15 Grupo 5" (BB5.1 más ciclosporina A) – a los ratones se les administró BB5.1 intraperitonealmente a una dosis de 40 mg/kg de peso corporal de forma diaria comenzando en el día -1 y continuando hasta el punto final. A estos ratones se les administró adicionalmente ciclosporina A de forma subcutánea a una dosis de 15 mg/kg de peso corporal de forma diaria a partir del día 0 hasta el punto final.

Grupo 6" (BB5.1 más ciclofosfamida) – a los ratones se les administró BB5.1 intraperitonealmente a una dosis de 40 mg/kg de peso corporal de forma diaria comenzando en el día -1 y continuando hasta el punto final. A estos ratones se les administró adicionalmente ciclofosfamida de forma intravenosa a una dosis de 40 mg/kg de peso corporal en cada uno de los días 0 y 1.

20 Grupo 7" (ciclosporina A más ciclofosfamida) – a los ratones se les administró ciclosporina A subcutáneamente a una dosis de 15 mg/kg de peso corporal de forma diaria a partir del día 0 hasta el punto final. A estos ratones se les administró adicionalmente ciclofosfamida intravenosamente a una dosis de 40 mg/kg de peso corporal en cada uno de los días 0 y 1.

25 Grupo 8" (BB5.1 más ciclosporina A más ciclofosfamida) – a los ratones se les administró BB5.1 intraperitonealmente a una dosis de 40 mg/kg de peso corporal de forma diaria comenzando en el día -1 y continuando hasta 100 días. A estos ratones también se les administró ciclosporina A subcutáneamente a una dosis de 15 mg/kg de peso corporal de forma diaria desde el día 0 hasta 100 días. A estos ratones se les administró adicionalmente ciclofosfamida de forma intravenosa a una dosis de 40 mg/kg de peso corporal en cada uno de los días 0 y 1. Dos ratones en este grupo se sacrificaron en el día 60 para estudios histológicos (todavía no había ocurrido ningún rechazo), y los cuatro ratones restantes todavía no habían rechazado sus injertos hacia el día 100.

30 Adicionalmente, se ensayó un grupo de control de ratones que no se presensibilizó y solamente recibió el tratamiento de la disolución salina de la misma manera que para el Grupo 1".

Los resultados de estos experimentos se muestran en las Tablas 5 y 6. La Tabla 5 enumera los tiempos de supervivencia para los injertos, y la Tabla 6 resume los resultados histológicos.

35 **Tabla 5**
Supervivencia del aloinjerto

Grupos (Tratamiento)	Supervivencia individual (días)	Tiempo medio de supervivencia (días)
Sin presensibilización	8, 8, 8, 8, 8, 9	8,3 ± 0,5*
1". Una presensibilización con piel	3, 3, 3, 3, 3, 3, 4	3,1 ± 0,4
2". Ciclosporina A	3,3,3,3	3,0 ± 0,0
3". BB5.1	3, 3, 4, 4	3,5 ± 0,6
4". Ciclofosfamida	3,3,3,4	3,3 ± 0,5
5". BB5.1 + Ciclosporina A	10, 10, 11, 11, 12, 12, 14, 15	11,9 ± 1,8**
6". BB5.1 + Ciclofosfamida	3, 3, 3, 3, 3, 4	3,2 ± 0,4
7". Ciclosporina A + Ciclofosfamida	3, 3,3,4,4,4	3,5 ± 0,6
8". BB5.1 + Ciclosporina A + Ciclofosfamida	> 100 días (4 ratones)	> 100***

*P < 0,01 grupo 1" frente a sin presensibilización

**P < 0,01 grupo 5" frente a grupos 1"-4" y 6"-7".

***P<0,01 grupo 8" frente a grupos 1"-7".

40 **Tabla 6**
Puntuaciones de la mediana de cambios histológicos de aloinjertos de corazón en la necropsia

Gupos	Vasc*	Infar	Linf	Trom	Hemo	Fibrin	PMN
Sin presensibilización (punto final)	3,0	3,0	1,0	4,0	3,0	3,0	3,0
1". Una presensibilización con piel (punto final)	0,0	4,0	1,0	4,0	3,0	0,0	0,0

2 ^o . Ciclosporina A (punto final)	0,0	4,0	0,0	3,0	3,0	N/A	N/A
3 ^o . BB5.1 (punto final)	2,0	2,0	2,0	2,0	3,0	N/A	N/A
4 ^o . Ciclofosfamida (punto final)	2,0	4,0	0,0	3,0	2,0	N/A	N/A
5 ^o . BB5.1 + Ciclosporina A (día 3 tras la operación)	0,0	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5 ^o . BB5.1 + Ciclosporina A (punto final)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	0,0	0,0
6 ^o . BB5.1 + Ciclofosfamida (punto final)	1,0	3,0	0,0	3,0	2,0	N/A	N/A
7 ^o . Ciclosporina A + Ciclofosfamida (punto final)	0,0	1,0	1,0	2,0	3,0	N/A	N/A
8 ^o . BB5.1 + Ciclosporina A + Ciclofosfamida (día 3 tras la operación)	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	N/A	N/A
8 ^o . BB5.1 + Ciclosporina A + Ciclofosfamida (día 12 tras la operación)	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	N/A	N/A
8 ^o . BB5.1 + Ciclosporina A + Ciclofosfamida (día 60 tras la operación)	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	N/A	N/A
8 ^o . BB5.1 + Ciclosporina A + Ciclofosfamida (día 100 tras la operación)	N/A						

Puntuaciones de la mediana: 0 - normal; 1- cambio mínimo; 2 – cambio leve; 3 – cambio moderado; 4 – cambio notable. N/A – no disponible.

*Vasc - vasculitis; Infar - infarto; Linf – infiltración linfocítica; Trom - trombosis; Hemo - hemorragia; Fibrin – deposición de fibrina; PMN – infiltrado de células polimorfonucleares

5 Los resultados mostrados en la Tabla 5 indican una diferencia entre el modelo de ratón presensibilizado y el modelo de ratón no presensibilizado como se usa en el Ejemplo 3. Los resultados indican que, en ausencia de presensibilización, los injertos son rechazados en aproximadamente 8 días en ausencia de tratamiento con cualesquiera fármacos. La presensibilización de los animales provoca un rechazo más rápido, ocurriendo el rechazo del injerto en los animales presensibilizados en aproximadamente 3 días en ausencia de cualquier tratamiento farmacéutico. El tratamiento con BB5.1, ciclosporina A o ciclofosfamida no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia del injerto, rechazándose los injertos en aproximadamente 3-4 días en cada uno de estos grupos de animales. La combinación de BB5.1 y ciclosporina A mostró cierto efecto, ocurriendo el rechazo a alrededor del día 12. La combinación de BB5.1 y ciclofosfamida no tuvo ningún efecto protector, ocurriendo el rechazo a alrededor del día 3. De forma similar, la combinación de ciclosporina A y ciclofosfamida no tuvo esencialmente ningún efecto protector, ocurriendo el rechazo a los 3-4 días. De forma muy sorprendente, la combinación de los tres fármacos (administración crónica de BB5.1 y ciclosporina más la administración de ciclofosfamida en el momento del trasplante) mostró un efecto enormemente sinérgico, sobreviviendo todos los ratones durante más de 100 días. Nuevamente, una supervivencia de 100 días en este modelo es considerada como el estándar de oro, y supone una supervivencia indefinida.

20 Estos resultados, así como los resultados histológicos como se muestran en la Tabla 6, indican que la combinación del tratamiento crónico con un inhibidor del complemento y un inmunosupresor, tal como ciclosporina A, en el tratamiento de un ratón presensibilizado da como resultado cierta atenuación del rechazo acelerado. El tratamiento de estos animales adicionalmente con ciclofosfamida en el momento del trasplante y en el primer día después del trasplante da como resultado un tiempo de supervivencia mucho mayor, no habiéndose observado rechazo en al menos el día 100.

Se apreciará que los métodos y composiciones de la actual descripción se pueden incorporar en la forma de una variedad de realizaciones, de las cuales sólo se describen aquí unas pocas. Será manifiesto para el experto que existen otras realizaciones y no se separan del espíritu de la descripción. De este modo, las realizaciones descritas son ilustrativas y no se deben de interpretar como restrictivas.

30 LISTADO DE REFERENCIAS

Las publicaciones y otros materiales usados aquí para iluminar el antecedente de la descripción, y en particular, casos para proporcionar detalles adicionales con respecto a la práctica, son citados por conveniencia por autor y fecha en el texto y se agrupan respectivamente en el siguiente Listado de Referencias.

35 Abbas AK, et al. (2000). Cellular and Molecular Immunology (4^a edición), p. 363-383 (W.B. Saunders Company, Nueva York).
 Arp et al. (1996). J. Virol. 70:7349-7359.
 Baldwin et al. (2001). Immunity 14:369-376.
 Böhmig GA, et al. (2000). Am. J. Kidney Dis. 35:667-673.
 Brauer et al. (1995). Transplantation 59:288-293.
 40 Changelian PS, et al. (2003). Science 302:875-878.
 Collard et al. (1997). Circulation 96:326-333.
 Collins et al. (1999). J. Am. Soc. Nephrol. 10:2208-2214.
 Fearon (1983). En Intensive Review of Internal Medicine, 2^o Ed. Fanta y Minaker, eds. Brigham y Women's y Beth Israel Hospitals.
 45 Forbes et al. (1978). Lab. Invest. 39:463-470.

- Frei Y, et al. (1987). *Mol. Cell. Probes* 1:141-149.
- Gloor (2005). *Contrib. Nephrol.* 146:11-21.
- Glantz et al. (1993). *Transplantation* 56:335-337.
- 5 Glantz D, et al. (2002). *Am. J. Transplant.* 2:758-760.
- Hakim et al. (1990). *Am. J. Kidney Dis.* 16:423-431.
- Halloran PF, et al. (1992). *Transplantation* 53:550-555.
- Halloran (2003). *Am. J. Transplant.* 3:639-640.
- Haviland DL, et al. (1991). *J. Immunol.* 146:362-368.
- Hiesse C, et al. (1992). *Nephrol. Dial. Transplant.* 7:944-951.
- 10 Hillmen P, et al. (2004). *New Engl. J. Med.* 350:552-559.
- Jeannot M, et al. (1970). *New Engl. J. Med.* 282:111-117.
- Jones PT, et al. (1986). *Nature* 321:522-525.
- Jose et al. (1983). *J. Exp. Med.* 158:2177-2182.
- Kirschfink (2001). *Immunol. Rev.* 180:177-189.
- 15 Kobayashi et al. (1999). *J. Biol. Chem.* 274:28660-28668.
- Kriaa et al. (1995). *Nephrol. Dial. Transplant.* 10 Suppl. 6:108-110.
- Kroshus et al. (1995). *Transplantation* 60:1194-1202.
- Kupiec-Weglinski (1996). *Ann. Transplant.* 1:34-40.
- Kupin et al. (1991). *Transplantation* 51:324-329.
- 20 Liszewski (1993). *Fundamental Immunology* p. 917-939.
- Maiyyedi et al. (2002). *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 11:609-618.
- Mehra et al. (2003). *Curr. Opin. Cardiol.* 18:153-158.
- Minta JO y Man DP (1977). *J. Immunol.* 119:1597-1602.
- Montgomery RA, et al. (2000). *Transplantation* 70:887-895.
- 25 Olfert et al. (1993) *Guide to the care and use of experimental animals (Vol.1).* Ottawa: Association of Universities and Colleges of Canada 1.
- Opelz G (1992). *Transplant. Proc.* 24:2342-2355.
- OPTN/SRTR Annual Report (2002). Capítulo 1 del Informe Annual producido por el Scientific Registry of Transplant Recipients (SRTR) en colaboración con la Organ Procurement and Transplantation Network (OPTN). Véase http://www.unos.org/data/ar2002/ar02_chapter_one.htm.
- 30 Palmer et al. (1989). *Lancet* 1:10-12.
- Papadimitriou et al. (1991). *J. Immunol.* 147:212-217.
- Park WD et al. (2003). *Am. J. Transplant* 3:952-960.
- Persson NH et al. (1995). *Transplant. Proc.* 27:3466.
- 35 Platt et al. (1999). *Mol. Immunol.* 36:965-971.
- Pratt et al. (1996). *Am J Pathol* 149:2055-2066.
- Pratt et al. (2000). *Am. J. Pathol.* 157:825-831.
- Pruitt et al. (1991). *J. Surg. Res.* 50:350-355.
- 40 Regele H, et al. (2001). *Nephrol. Dial. Transplant.* 16:2058-2066.
- Rocha et al. (2003). *Transplantation* 75:1490-1495.
- Ross et al. (1993). *Transplantation* 55:785-789.
- Saadi et al. (1995). *J. Exp. Med.* 182:1807-1814.
- Salama et al. (2001). *Am. J. Transplant.* 1:260-269.
- Schweitzer et al. (2000). *Transplantation* 70:1531-1536.
- 45 Sonnenday et al. (2002). *Transplant. Proc.* 34:1614-1616.
- Stepkowski SM (2000). *Exp. Rev. Mol. Med.* 21 Junio, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/00001769h.htm>.
- Taube DH, et al. (1984). *Lancet* 1:824-828.
- Tyan et al. (1994). *Transplantation* 57:553-562.
- 50 Vakeva et al. (1998). *Circulation* 97:2259-2267.
- Vogt W, et al. (1989). *Molec. Immunol.* 26:1133-1142.
- Wang et al. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:8955-8959.
- Wang et al. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:8563-8568.
- Wang et al. (1999). *Transplantation* 68:1643-1651.
- Wang H, et al. (2003). *J. Immunol.* 171:3823-3836.
- 55 Warren et al. (2004). *Am. J. Transplant.* 4:561-568.
- Wetsel RA y Kolb WP (1982). *J. Immunol.* 128:2209-2216.
- Wurzner R, et al. (1991). *Complement Inflamm.* 8:328-340.
- Yamamoto KI y Gewurz G (1978). *J. Immunol.* 120:2008-2015.
- 60 Publicación de Solicitud de Patente PCT WO 92/10205
- Publicación de Solicitud de Patente PCT WO 00/27421
- Publicación de Solicitud de Patente PCT WO 01/37860
- Publicación de Solicitud de Patente US US 2003/0129187
- Publicación de Solicitud de Patente US US 2003/0180301
- Patente US 5.133.916
- 65 Patente US 5.573.940
- Patente US 5.660.825

5

Patente US 6.057.131
Patente US 6.100.443
Patente US 6.192.891
Patente US 6.280.957
Patente US 6.302.855
Patente US 6.355.245
Patente US 6.534.058
Patente US 6.821.515

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo contra C5 que inhibe la actividad del complemento para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor, en el que dicho anticuerpo contra C5 se administra conjuntamente con al menos un fármaco inmunosupresor y crónicamente.
- 5 2. Uso de un anticuerpo contra C5 que inhibe la actividad del complemento para la fabricación de un medicamento o paquete de medicamento, en el que dicho medicamento se administra con al menos un fármaco inmunosupresor para prolongar la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor, en el que dicho medicamento se administra crónicamente.
- 10 3. Un anticuerpo contra C5 que inhibe la actividad del complemento y al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor, en el que dicho anticuerpo contra C5 y dicho al menos un fármaco inmunosupresor se administran crónicamente.
- 15 4. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 1, el uso según la reivindicación 2, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 3, en el que dicho mamífero es un ser humano.
- 20 5. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 1 ó 4, el uso de la reivindicación 2 ó 4, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 3 ó 4, en el que dicho aloinjerto es un aloinjerto histoincompatible para HMC.
- 25 6. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor, el uso o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 5, en el que dicho aloinjerto histoincompatible para MHC es un aloinjerto histoincompatible para HLA.
- 30 7. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor de la reivindicación 1 ó 4, el uso según la reivindicación 2 ó 4, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 3 ó 4, en el que dicho mamífero es histoincompatible para ABO para dicho aloinjerto.
- 35 8. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 1 ó 4, el uso de la reivindicación 2 ó 4, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 3 ó 4, en el que dicho mamífero se presensibiliza frente a dicho aloinjerto, y en el que dicho anticuerpo contra C5 se administra con al menos dos fármacos inmunosupresores, o en el que dicho medicamento se administra con al menos dos fármacos inmunosupresores.
- 40 9. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 u 4 a 8, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 8, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4 a 8, en el que dicho anticuerpo contra C5 que inhibe la actividad del complemento inhibe la formación del complemento terminal o C5a.
- 45 10. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor, el uso o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 9, en el que dicho anticuerpo contra C5 que inhibe la formación de complemento terminal o C5a es un anticuerpo completo o un fragmento de anticuerpo.
- 50 11. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor, el uso, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 10, en el que dicho anticuerpo completo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humano, humanizado, quimerizado o desinmunizado.
- 55 12. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor, el uso, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 10 ó 11, en el que dicho anticuerpo completo o fragmento de anticuerpo inhibe la escisión del complemento C5.
13. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor, el uso, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en

el que dicho fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un Fab, un F(ab')₂, Fv, un anticuerpo de dominio, o un anticuerpo monocatenario.

5 14. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor, el uso, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 10, en el que dicho fragmento de anticuerpo es pexelizumab.

10 15. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor, el uso, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 10, en el que dicho anticuerpo completo es eculizumab.

16. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor, el uso, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 15, en el que dicho eculizumab se administra una vez cada 2 semanas.

15 17. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 16, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 16, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 16, en el que dicho fármaco inmunosupresor inhibe la actividad de linfocitos T o la actividad de linfocitos B.

20 18. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 16, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 16, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 16, en el que dicho fármaco inmunosupresor inhibe la actividad de linfocitos T y la actividad de linfocitos B.

25 19. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 16, el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 16, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 16, en el que dicho fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus, OKT3, un corticosteroide, daclizumab, basiliximab, azatiopreno, micofenolato mofetilo, metotrexato, 6-mercaptopurina, anticuerpos anti-linfocitos T, ciclofosfamida, leflunamida, brequinar, ATG, ALG, 15-desoxiespergualina, y bredinina.

30 20. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 19, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 19, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 19, en el que se administra más de un fármaco inmunosupresor.

35 21. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor de la reivindicación 1 o el uso según de la reivindicación 2, en el que dicho medicamento se administra conjuntamente con ciclosporina A.

22. El anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 3, en el que dicho fármaco inmunosupresor es ciclosporina A.

40 23. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor, el uso, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 20, en el que dicho medicamento se administra conjuntamente con ciclosporina A y ciclofosfamida.

45 24. El anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 3, en el que dicho fármaco inmunosupresor incluye tanto ciclosporina A como ciclofosfamida.

50 25. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor o el uso, según la reivindicación 21, en el que dicho anticuerpo contra C5 es un anticuerpo que inhibe la escisión del complemento C5.

55 26. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 25, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2

- 5 ó 4 a 25, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 25, en el que dicho aloinjerto se selecciona del grupo que consiste en i) corazón, ii) riñón, iii) pulmón, iv) páncreas, v) hígado, vi) tejido vascular, vii) ojo, viii) córnea, ix) lente, x) piel, xi) médula ósea, xii) músculo, xiii) tejido conjuntivo, xiv) tejido gastrointestinal, xv) tejido nervioso, xvi) hueso, xvii) células madre, xviii) islotes, xix) cartílago, xx) hepatocitos, y xxi) células hematopoyéticas.
- 10 27. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 25, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 25, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 25, en el que dicho aloinjerto sobrevive durante un tiempo al menos 20% más que lo que ocurriría si dicho uso se hiciese sin dicho anticuerpo contra C5.
- 15 28. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 26, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 26, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 26, en el que dicho aloinjerto sobrevive durante un tiempo al menos 40% más que lo que ocurriría si dicho uso se hiciese sin dicho anticuerpo contra C5.
- 20 29. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 26, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 26, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 26, en el que dicho aloinjerto sobrevive durante el resto del tiempo de vida de dicho mamífero.
- 25 30. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 26, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 26, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 26, en el que dicho aloinjerto sobrevive durante al menos seis meses.
- 30 31. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 26, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 26, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 26, en el que dicho aloinjerto sobrevive durante al menos un año.
- 35 32. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 26, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 26, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 26, en el que dicho aloinjerto sobrevive durante al menos cinco años.
- 40 33. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor, el uso, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 4, en el que dicho aloinjerto sobrevive durante el resto del tiempo de vida de dicho ser humano.
- 45 34. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 33, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 33, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 33, en el que dicho anticuerpo contra C5 se administra crónicamente durante al menos 14 días.
- 50 35. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 33, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 33, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 33, en el que dicho anticuerpo contra C5 se administra crónicamente durante al menos 28 días.
- 55 36. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 33, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 33, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 33, en el que dicho anticuerpo contra C5 se administra crónicamente durante al menos 3 meses.

- 5 37. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 33, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 33, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 33, en el que dicho anticuerpo contra C5 se administra crónicamente durante al menos 6 meses.
- 10 38. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 33, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 33, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 33, en el que dicho anticuerpo contra C5 se administra crónicamente durante al menos 1 año.
- 15 39. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 33, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 33, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 33, en el que dicho anticuerpo contra C5 se administra crónicamente durante al menos 5 años.
- 20 40. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 33, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 33, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 33, en el que dicho anticuerpo contra C5 se administra crónicamente durante el tiempo de vida restante de dicho mamífero.
- 25 41. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 33, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 33, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 33, en el que al menos un fármaco inmunosupresor se administra crónicamente durante el tiempo de vida restante de dicho mamífero.
- 30 42. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor, el uso, o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 41, en el que al menos la ciclosporina A se administra crónicamente durante el tiempo de vida restante de dicho mamífero.
- 35 43. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo contra C5 y dicho fármaco inmunosupresor están en una formulación adecuada para la administración concurrente a dicho mamífero.
- 40 44. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo contra C5 y dicho fármaco inmunosupresor están en una formulación o formulaciones adecuadas para la administración secuencial a dicho mamífero.
- 45 45. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo contra C5 está en una formulación adecuada para la administración crónica a dicho mamífero.
- 50 46. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que dicho fármaco inmunosupresor está en una formulación adecuada para la administración crónica a dicho mamífero.
- 55 47. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 1, el uso de la reivindicación 2 o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 3, en el que dicho medicamento incluye una formulación liofilizada que comprende el anticuerpo y un lioprotector.
48. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 1, el uso de la reivindicación 2 o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 3, en el que dicho fármaco inmunosupresor está en una formulación liofilizada que comprende el fármaco inmunosupresor y un lioprotector.
49. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 1, el uso de la reivindicación 2 o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo y dicho fármaco inmunosupresor están en la misma formulación

liofilizada que comprende dicho anticuerpo, dicho fármaco inmunosupresor y un lioprotector.

50. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 1, el uso de la reivindicación 2 o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo está en un sistema de inyección que comprende una jeringuilla que comprende un cartucho, en el que dicho cartucho contiene dicho anticuerpo en una formulación adecuada para inyección.
51. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 1, el uso de la reivindicación 2 o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 3, en el que dicho fármaco inmunosupresor está en un sistema de inyección que comprende una jeringuilla que comprende un cartucho, en el que dicho cartucho contiene dicho fármaco inmunosupresor en una formulación adecuada para inyección.
52. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 1, el uso de la reivindicación 2 o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo y dicho fármaco inmunosupresor están en un sistema de inyección que comprende una jeringuilla que comprende un cartucho, en el que dicho cartucho contiene dicho anticuerpo y dicho fármaco inmunosupresor en una formulación adecuada para inyección.
53. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 1, el uso de la reivindicación 2 o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo está presente en una forma de dosificación unitaria.
54. El anticuerpo contra C5 para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 1, el uso de la reivindicación 2 o el anticuerpo contra C5 y el al menos un fármaco inmunosupresor para uso en la prolongación de la supervivencia de un aloinjerto en un mamífero receptor según la reivindicación 3, en el que dicho fármaco inmunosupresor está presente en una forma de dosificación unitaria.

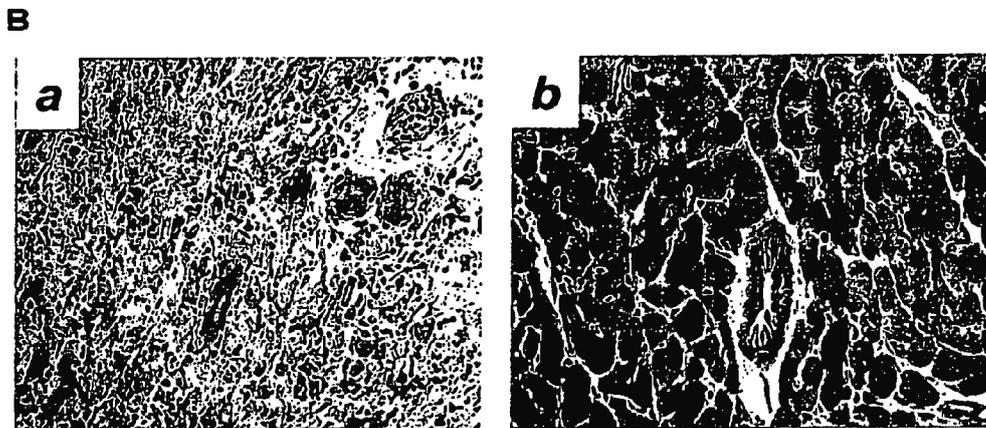
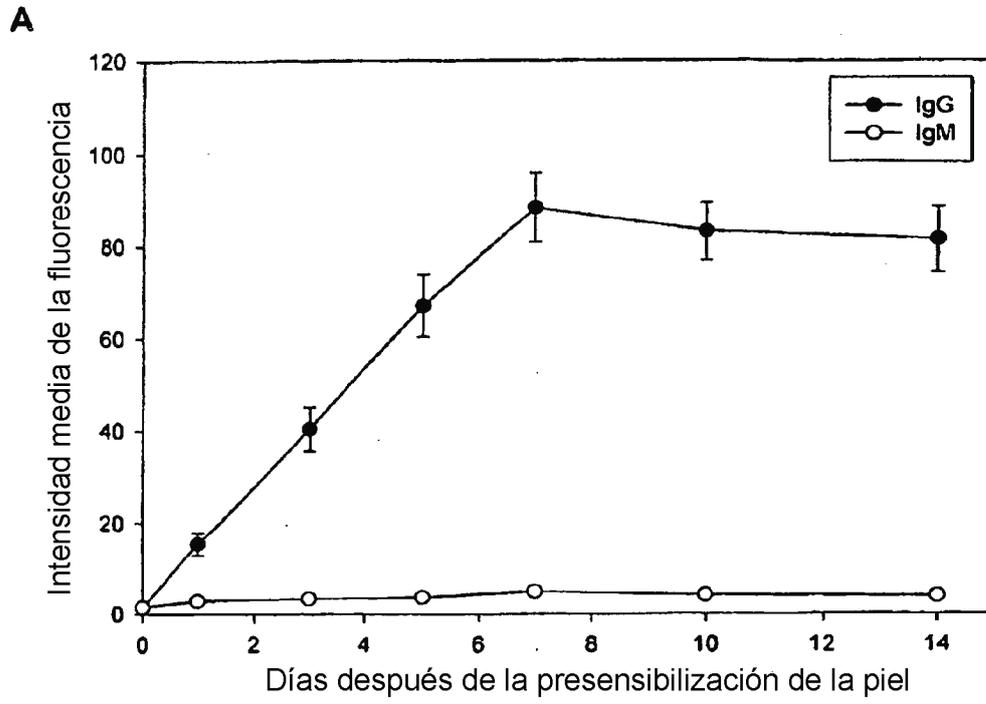


Figura 1A, B

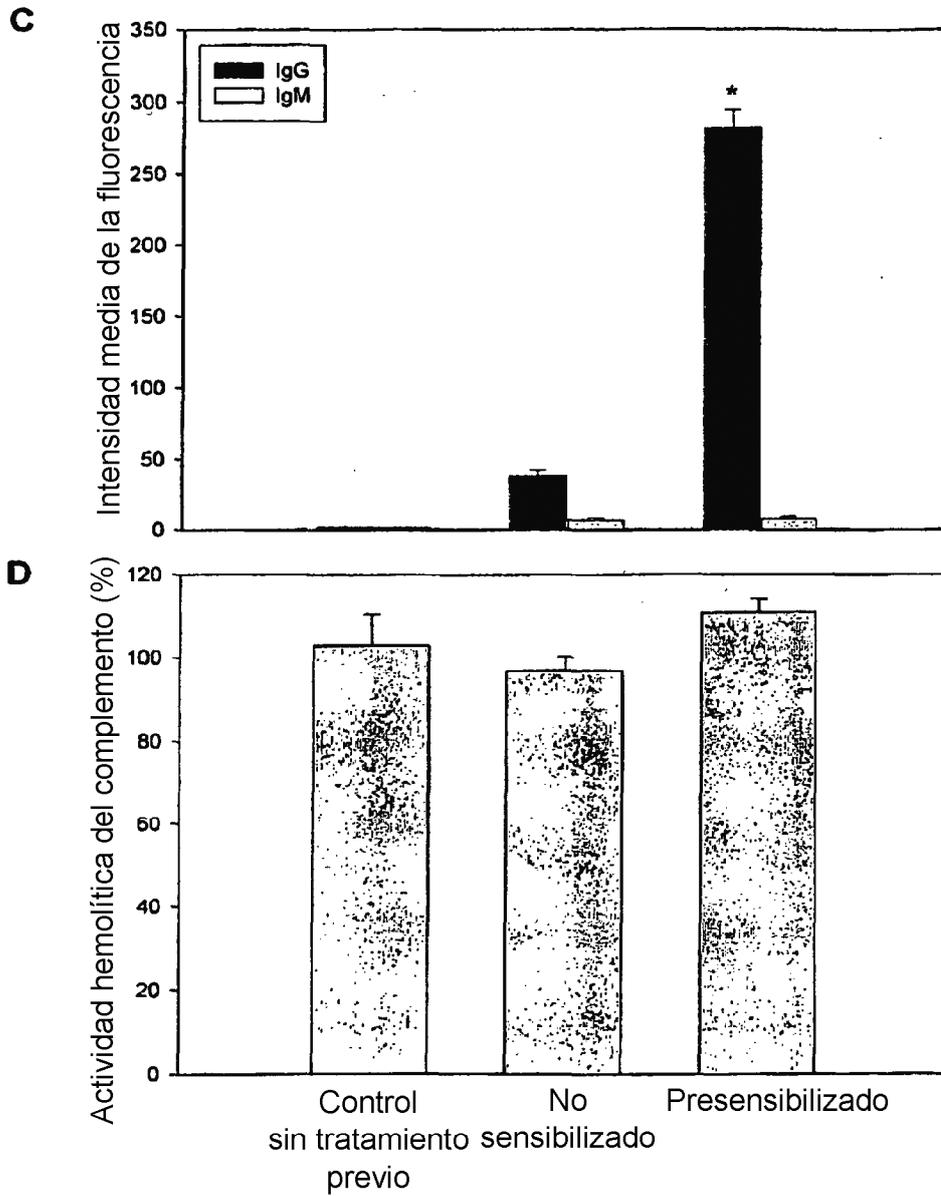


Figura 1C, D

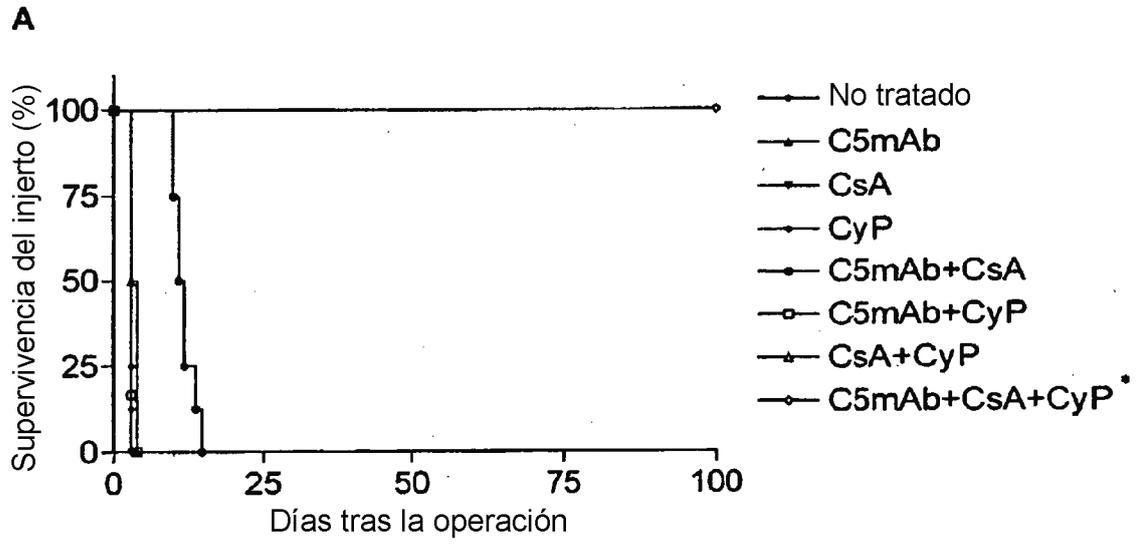


Figura 2A

B

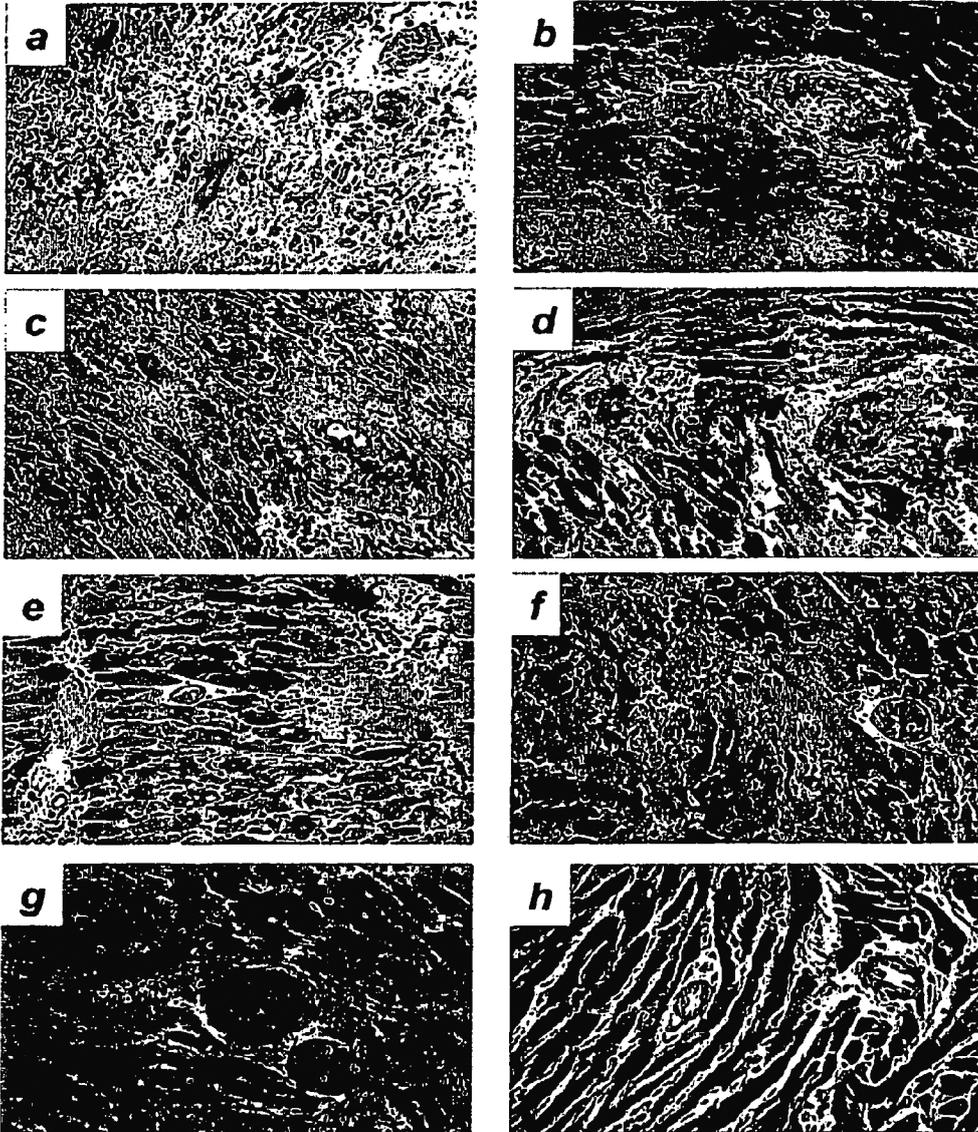


Figura 2B

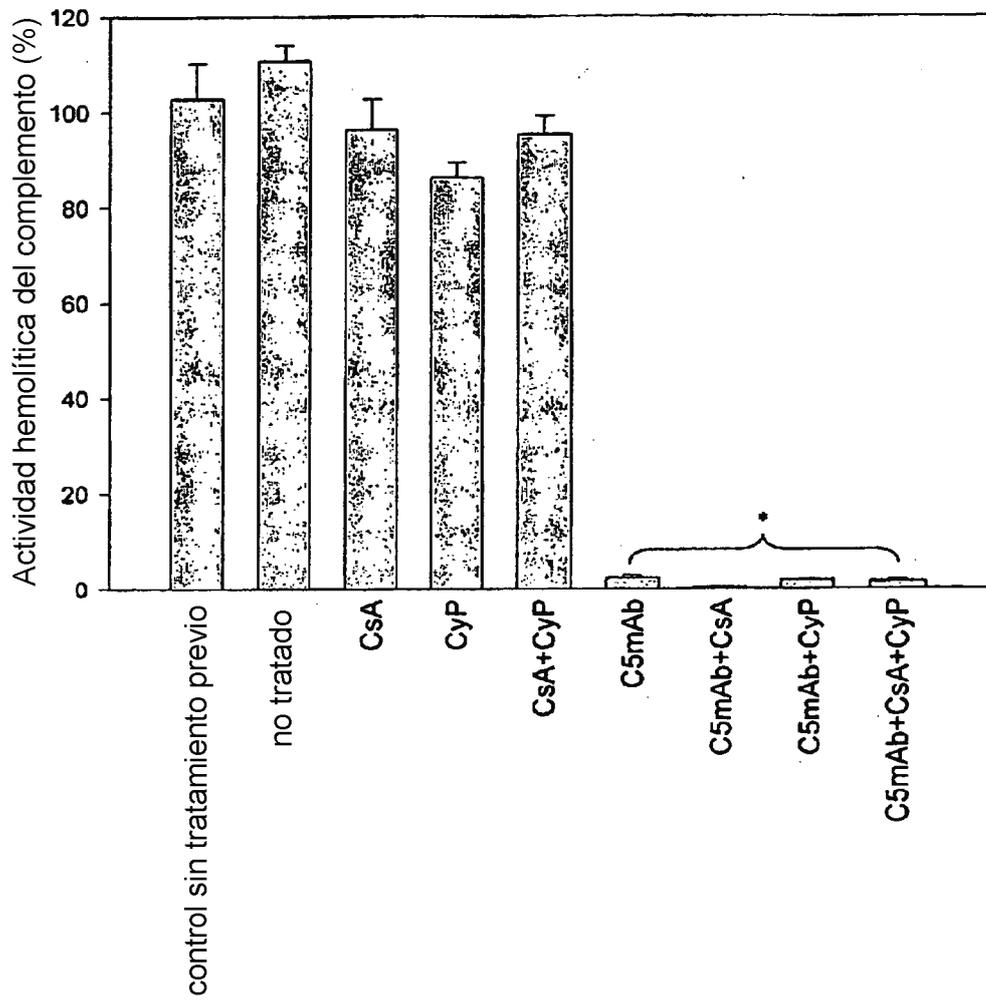


Figura 3

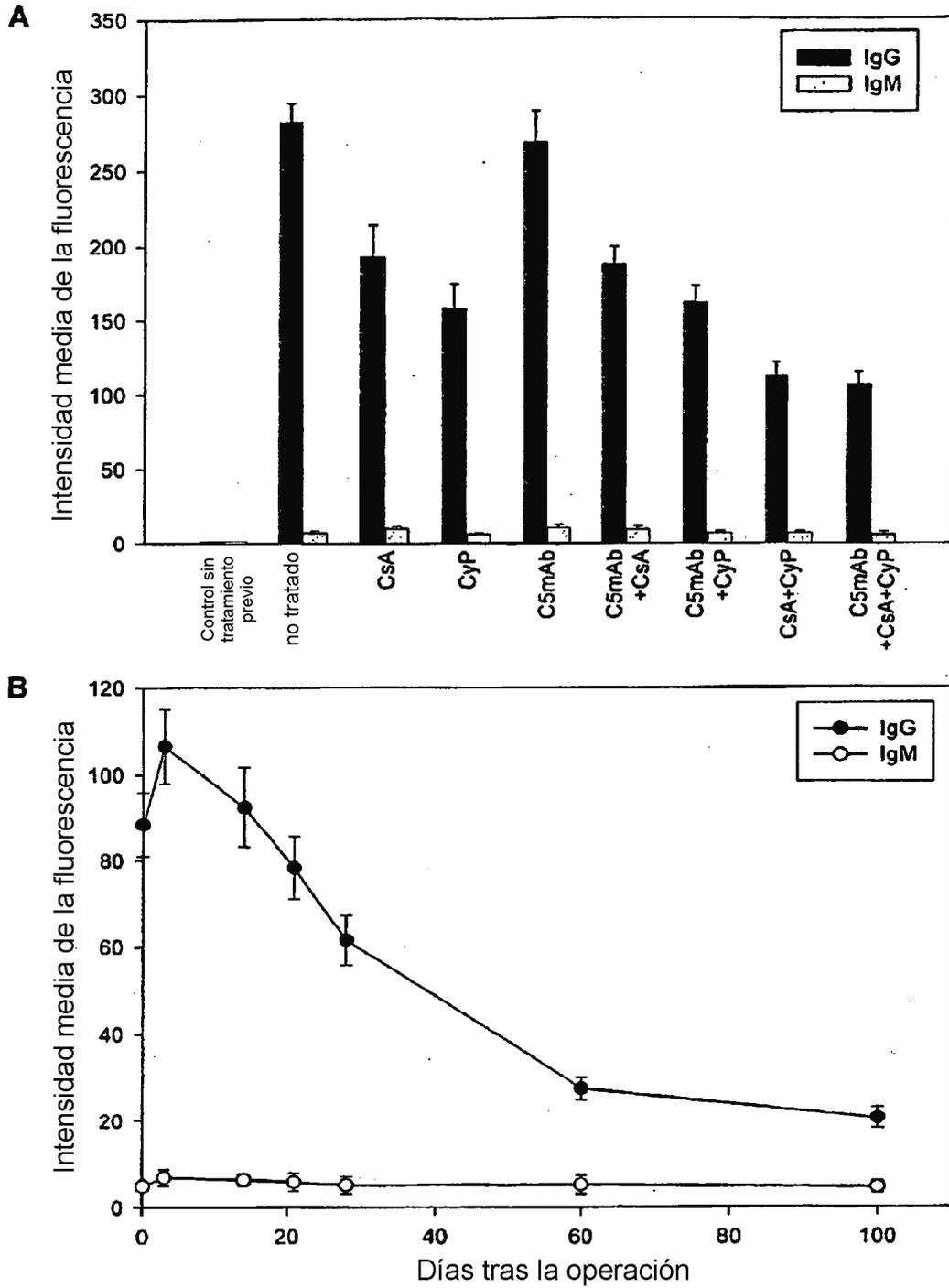


Figura 4A, B

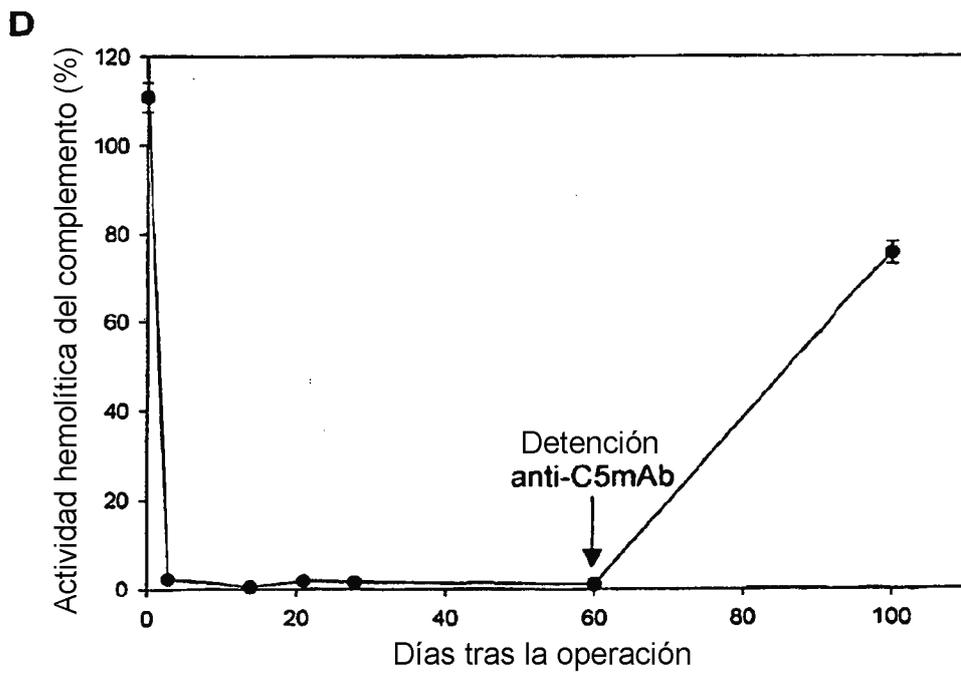
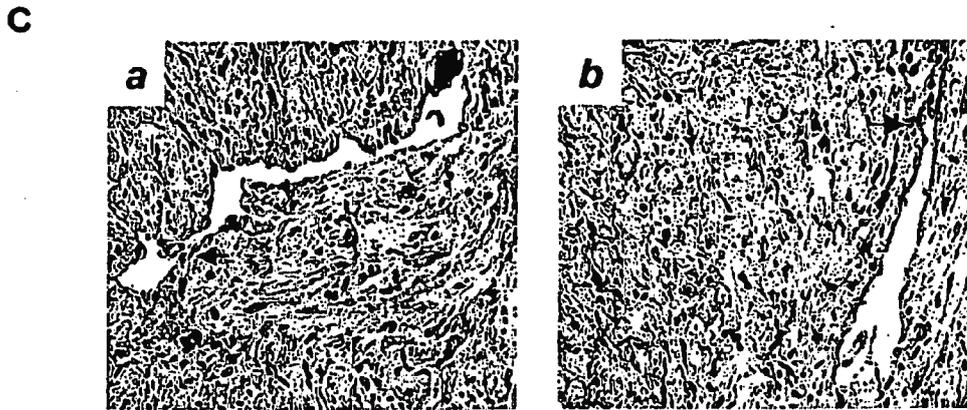


Figura 4C, D

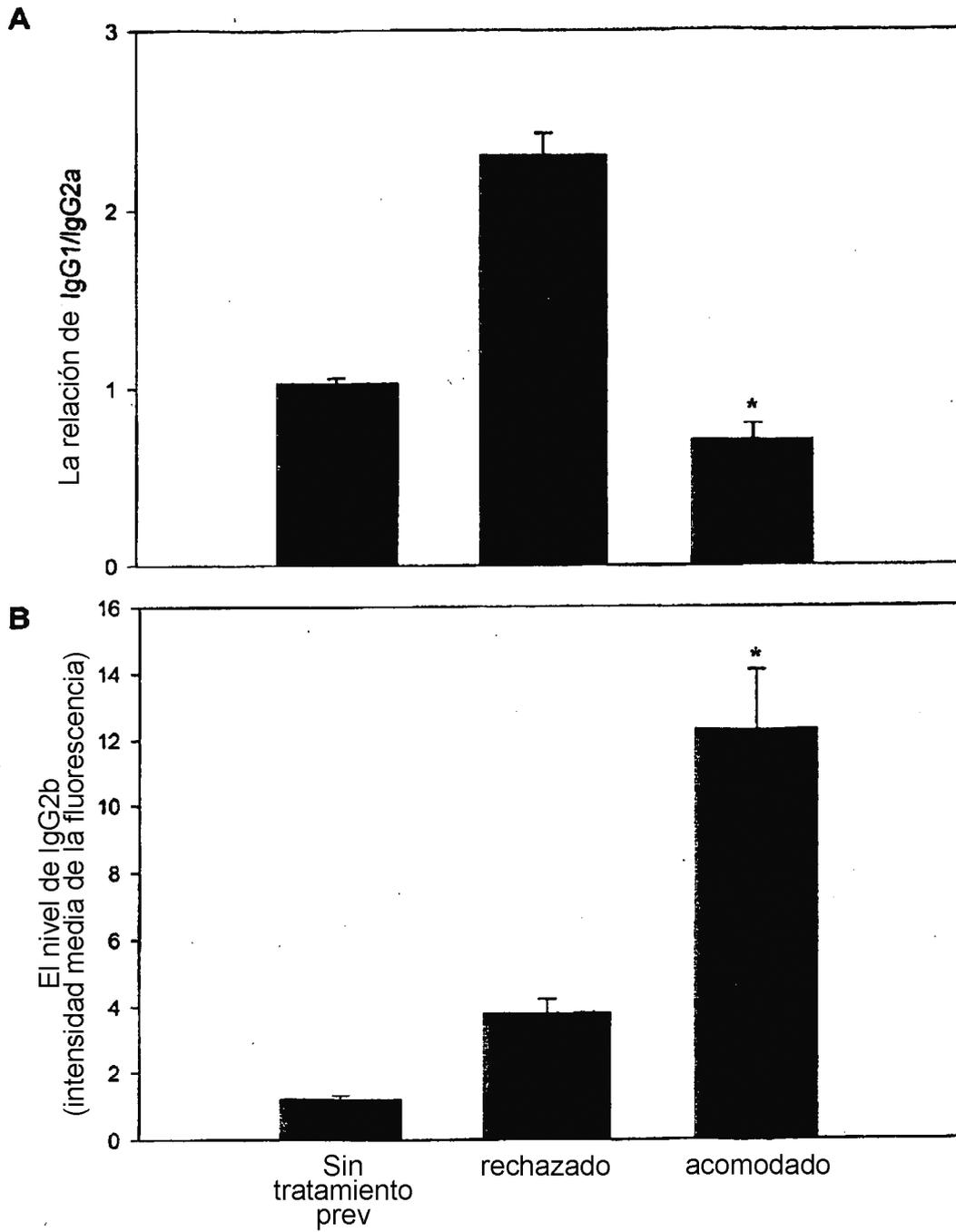


Figura 5A, B

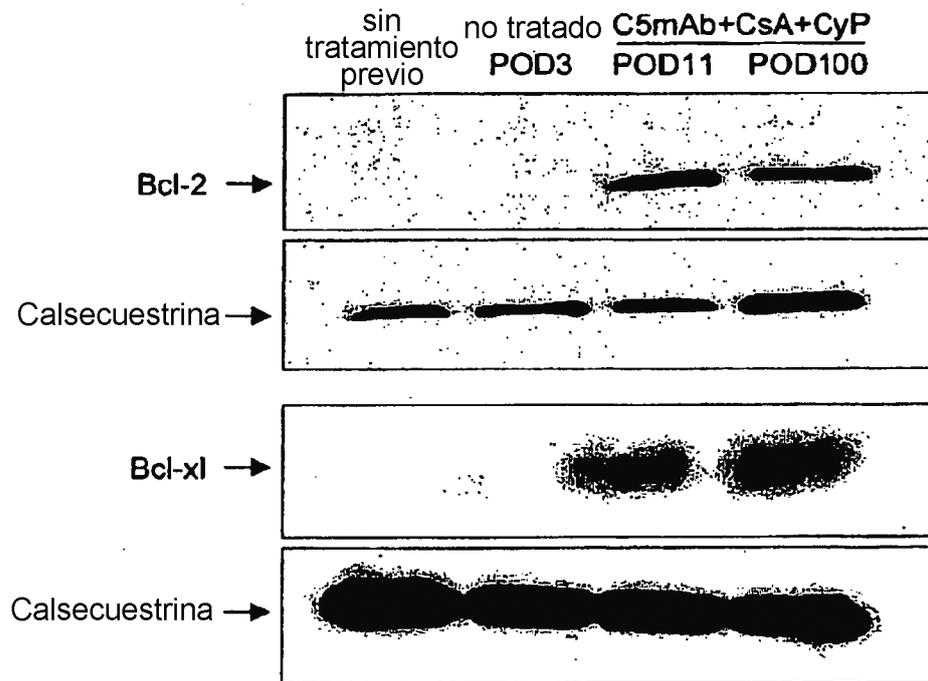


Figura 6

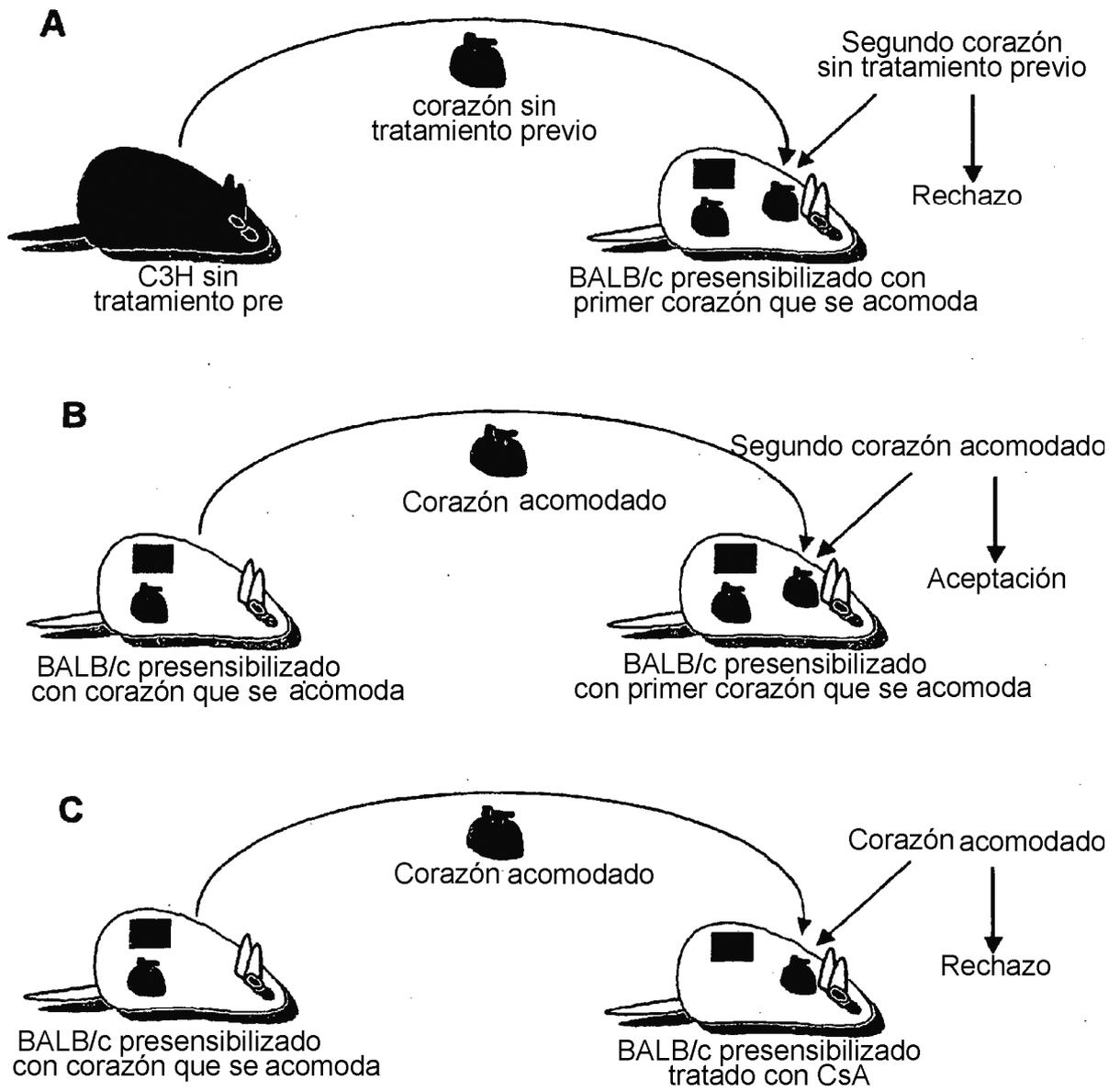


Figura 7

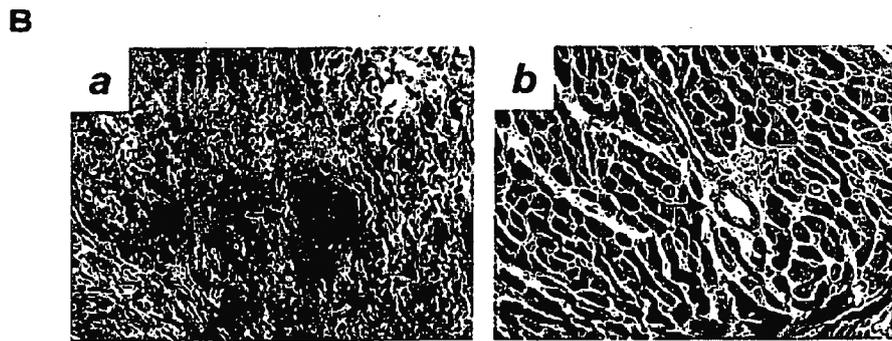
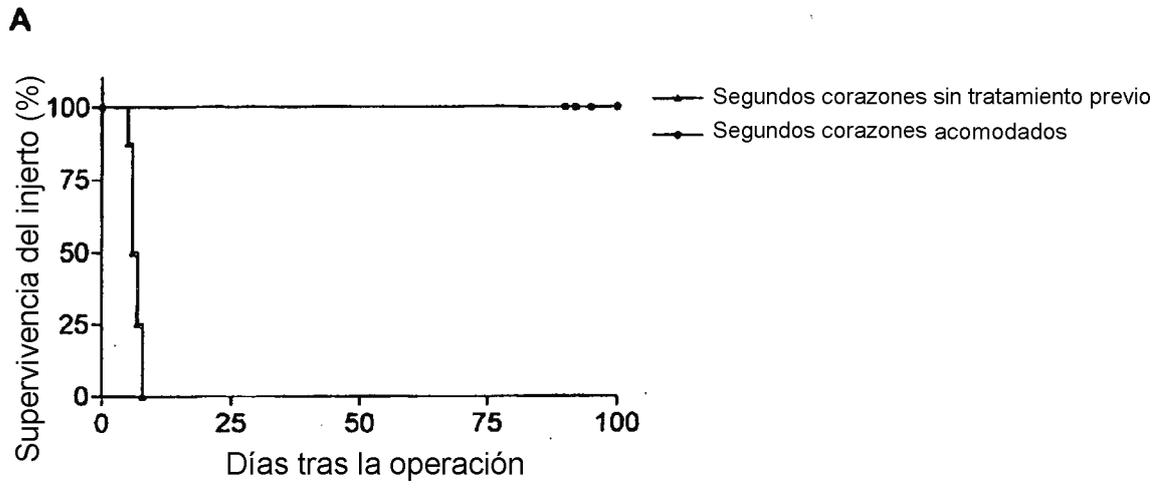


Figura 8

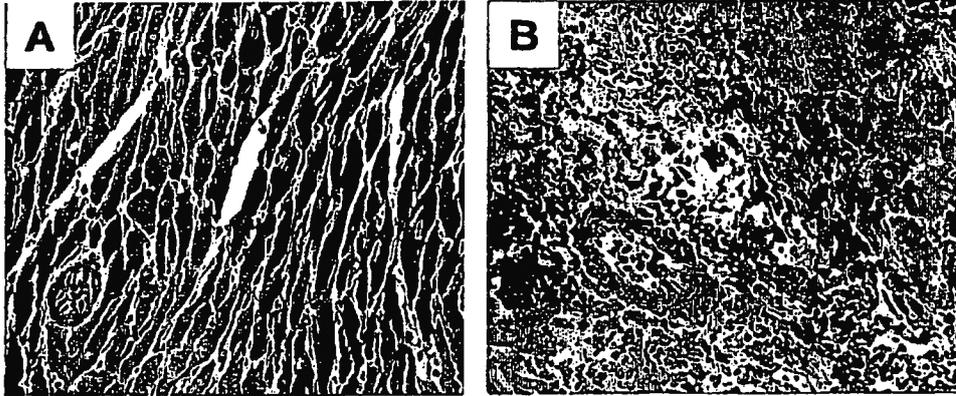


Figura 9