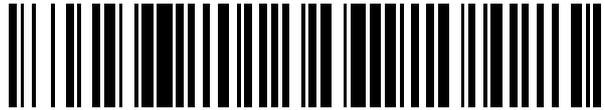


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 428**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2007 E 07837788 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2061810**

54 Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento de neuropatías mediadas por anticuerpos**

30 Prioridad:

05.09.2006 US 842296 P

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

02.03.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HALSTEAD, SUSAN;
WILLISON, HUGH y
ROTHER, RUSSELL, P.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 530 428 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para el tratamiento de neuropatías mediadas por anticuerpos

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 Esta solicitud proporciona composiciones para el tratamiento de neuropatías mediadas por anticuerpos, que activan el complemento para inducir lesión neuronal. En realizaciones específicas, la solicitud se refiere al uso de inhibidores de la cascada del complemento como agentes terapéuticos para tratar neuropatías mediadas por anticuerpos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Neuropatía es un término genérico utilizado para describir enfermedades del sistema nervioso periférico. Hay aproximadamente 200 causas diferentes conocidas de neuropatías periféricas. Si bien la mayoría de las neuropatías afectan a las tres clases principales de fibras nerviosas en grados variables, algunas enfermedades implican solamente una o dos, y por de este modo se dice que son neuropatías pura o predominantemente motoras, sensoriales o autónomas.

15 El síndrome de Guillain-Barré (GBS) es una enfermedad aguda que implica al sistema nervioso periférico, que usualmente ocurre dos a tres semanas después de una enfermedad de tipo gripe u otra infección, incluyendo enteritis por *Campylobacter*. Principalmente es una neuropatía motora, lo que significa que sus síntomas están relacionados en gran medida con la implicación de los nervios motores. A pesar de la naturaleza primordialmente motora de la enfermedad, los síntomas más tempranos pueden ser entumecimiento y hormigueo en las extremidades inferiores, seguido de un corto periodo de debilidad de los músculos distales de las extremidades inferiores. El peligro surge cuando la debilidad implica a los músculos de la respiración. El GBS está asociado en
20 una proporción de casos con autoanticuerpos antigangliósidos (AGA) contra un amplio intervalo de estructuras glicolípidas específicas, y también con anticuerpos contra otros componentes nerviosos, incluyendo proteínas de mielina y glicosaminoglicanos en algunos casos, y en otros casos de GBS se supone que los anticuerpos están presentes pero todavía no han sido identificados formalmente.

25 El síndrome de Miller Fisher (MFS) es una variante del síndrome de Guillain-Barré, que da cuenta del 5-10% de los casos. En una encuesta, la incidencia anual se ha estimado en 0,09 por cada 100.000 personas de la población. El MFS se caracteriza por el comienzo agudo de oftalmoplejía, ataxia y arreflexia. Anticuerpos anti-gangliósidos GQ1b son el sello distintivo serológico de MFS. Los anticuerpos pueden aparecer en algunos casos mediante imitación molecular con lipopolisacáridos de *Campylobacter*. Ahora se acepta ampliamente que más del 90% de los pacientes con MFS tienen anticuerpos IgG anti-GQ1b durante la fase aguda de la enfermedad. Es igualmente significativa la
30 ausencia total de anticuerpos IgG anti-GQ1b de grupos de control normales y de otras enfermedades, indicativo de un alto nivel de especificidad para esta asociación de enfermedad. Los títulos de anticuerpo aumentan hasta un pico en la presentación clínica, decayendo rápidamente con el curso de la recuperación clínica. Los títulos de anticuerpos IgG anti-GQ1b también son elevados en el suero en la fase aguda de algunos pacientes con el síndrome de Guillain-Barré con oftalmoplejía. El marcador del anticuerpo IgG anti-GQ1b también identifica un grupo de síndromes estrechamente relacionados, considerados con frecuencia formas frustradas de MFS, que tienen en común la
35 presencia de oftalmoplejía externa o ataxia de tipo cerebelosa.

40 El tratamiento actual para GBS, incluyendo casos mediados por AGA, es la inmunoglobulina intravenosa (IVIg), cambio de plasma, o una combinación de ambos. Si bien algunas neuropatías como el GBS son usualmente enfermedades auto-limitantes, con frecuencia es necesaria la intervención terapéutica intensa. Algunos individuos quedan con déficits residuales. Otras neuropatías son crónicas y solamente se tratan síntomas tales como el dolor. Hay una gran necesidad de tratamientos adicionales para mejorar los síntomas y disminuir el tiempo de recuperación de las neuropatías mediadas por anticuerpos.

El documento WO 2005/002513 describe agentes que se unen a y/o inhiben el subcomponente del complemento C1 clásico, C1q, y métodos de su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y cáncer.

45 Halstead et al. 2005 (Annals of Neurology (58), 203 - 210) describe que APT070 elimina la lesión terminal neuronal en modelos de roedores de síndrome de Miller Fisher, mediante reducción de C3 convertasa intermedia así como mediante inhibición de C5 convertasa. APT070 es una forma soluble de la proteína del receptor 1 del complemento (sCR1) que se une a C3b y C4b y de ese modo inhibe, entre otros, la opsonización mediante fagocitos del hospedante (por ejemplo, macrófagos) de objetos a los que están unidos C3b y C4b.

50 El documento US 2005/004031 describe inhibidores de pequeñas moléculas de uno o más del receptor de C5a, C1r, C1q, C1s, y MASP-2, y el uso de estos inhibidores de pequeña molécula en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

55 Se presentan composiciones para tratar a pacientes que sufren de neuropatías mediadas por anticuerpos, como se caracteriza en las reivindicaciones anejas.

- En una cantidad de neuropatías se han identificado anticuerpos contra componentes específicos de los nervios. Algunas de estas enfermedades están mediadas por anticuerpos anti-gangliósidos y anti-glicolípidos, tales como la variante de Miller Fisher del síndrome de Guillain-Barré. Los anticuerpos contra un amplio intervalo de glicolípidos, incluyendo GM1, GM1(NeuGc), GM1b, GalNAc-GM1b, GD1a, GalNAc-GD1a, GD1b, 9-O-acetil GD1b, GD3, GT1a, GT1b, GQ1b, GQ1ba, LM1, galactocerebrósido y SGPG se han dado a conocer en documentos sobre neuropatías inflamatorias, como informes de casos y en mayores series.
- También se ha dado a conocer que los anticuerpos contra otros componentes nerviosos, incluyendo proteínas y glicoproteínas, son los causantes de neuropatías. Por ejemplo, la IgM monoclonal contra la glicoproteína asociada a mielina produce neuropatía paraproteinémica IgM anti-MAG (Willison y Yuki, Brain, 2002, 125, 2591-2625). En una proporción de casos de neuropatía, se supone que los anticuerpos están presentes debido a patrones patológicos y respuestas al tratamiento similares a las que se observan en los casos asociados con anticuerpos, pero la especificidad del anticuerpo que se presupone todavía tiene que ser identificada formalmente. También se describe aquí que la neuropatía mediada por anticuerpos puede ser una o más de las siguientes: neuropatía axonal motora aguda, polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, encefalitis del tallo cerebral de Bickerstaff, oftalmoparesia aguda, síndrome de Guillain-Barré atáxico, debilidad faringeo-cervical-braquial, síndromes de neuropatía crónica con anticuerpos anti-glicolípidos, neuropatía paraproteinémica IgM anti-MAG, neuropatía atáxica sensorial crónica con anticuerpos anti-disialosilo, neuropatía paraproteinémica IgM, IgG e IgA, neuropatía motora con anticuerpos anti-GM1 y anti-GM2, neuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), neuropatía motora multifocal (MMN), y neuropatía sensorial y motora desmielinizante multifocal adquirida (MADSAM).
- En algunas neuropatías, la activación del complemento puede ser independiente del anticuerpo, por ejemplo en neuropatía amiloide hereditaria. En esta enfermedad, se han detectado marcadores de activación de la ruta clásica tempranos, C1q y C4, en depósitos de amiloide en ausencia de anticuerpo detectable (Hafer-Macko et al., J Peripher Nerv Syst. 2000 Sep; 5(3): 131-9; incorporado aquí como referencia). Esto sugiere que puede ocurrir la activación de la ruta clásica independiente del anticuerpo y que los inhibidores de la cascada del complemento pueden ser efectivos para tratar neuropatías mediadas por el complemento, independientes del anticuerpo.
- Un anticuerpo de la solicitud inhibe la activación de la ruta clásica, la ruta alternativa o la ruta de lecitina del complemento. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo es un anticuerpo contra cualquier miembro del grupo que comprende los componentes del complemento C5 o C5b. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo es un anticuerpo contra C5. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo es un inhibidor de la escisión de C5.
- También se describe aquí un inhibidor de la cascada del complemento seleccionado de: un polipéptido, un análogo de polipéptido, un peptidomimético, un anticuerpo, un ácido nucleico, un constructo de iARN, un análogo de ácido nucleico, y una molécula pequeña.
- En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la solicitud es un anticuerpo completo o un fragmento de anticuerpo. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo completo o fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo policlonal, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo monoclonal, un diacuerpo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo quimerizado o quimérico, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humano desinmunizado, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo totalmente humano, un anticuerpo monocatenario, un Fv, un Fab, un Fab', o un F(ab')₂.
- En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la solicitud inhibe la activación de la ruta clásica, la ruta alternativa o la ruta de lecitina del complemento. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo es un anticuerpo contra cualquier miembro del grupo que comprende los componentes del complemento C5 o C5b. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo es un anticuerpo contra C5. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo es un inhibidor de la escisión de C5.
- En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la solicitud es eculizumab. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo es pexelizumab. En ciertas realizaciones, dicho tratamiento con eculizumab es crónico. En ciertas realizaciones, dicho tratamiento con pexelizumab comprende tratar un episodio agudo.
- En ciertas realizaciones, un mamífero de la solicitud se trata administrándole dicho anticuerpo por vía intravenosa. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo se administra sistémicamente a dicho mamífero. En ciertas realizaciones, dicho agente se administra localmente a dicho mamífero.
- En ciertas realizaciones, los tratamientos de la solicitud producen disminución de la lesión neuronal en un mamífero de la solicitud.
- En ciertas realizaciones, un mamífero de la solicitud se trata para inhibir o disminuir la cantidad y/o el grado de una condición fisiológica indeseable resultante de exceso de lesión neuronal debido a neuropatía dependiente de anticuerpos. En ciertas realizaciones, dicha condición fisiológica indeseable se selecciona del grupo que consiste en oftalmoplejía, ataxia, arreflexia, coordinación muscular anormal, parálisis de los músculos oculares, dolor muscular constante, ausencia de los reflejos de tendón, entumecimiento y hormigueo en las extremidades inferiores, debilidad de los músculos distales de las extremidades inferiores, pie péndulo, debilidad que implica a todas las extremidades inferiores, debilidad que implica a las extremidades superiores, debilidad en los músculos de la respiración, y muerte.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo para uso según la solicitud da como resultado disminución en la formación del complejo de ataque a membrana (MAC) en los axones motores presinápticos.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo para uso según la solicitud da como resultado la restauración de una frecuencia normal de los potenciales de placa terminal miniatura.

- 5 En ciertas realizaciones, el anticuerpo para uso según la solicitud da como resultado la restauración de la transmisión sináptica en las uniones neuromusculares.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo para uso según la solicitud da como resultado disminución de la pérdida de integridad de los terminales en las uniones neuromusculares.

- 10 En otra realización, un anticuerpo anti-C5 para uso para tratar síndrome de Guillain-Barré en un mamífero se administra al mamífero en una cantidad terapéuticamente efectiva. En otra realización, un anticuerpo anti-C5 para uso para tratar la variante de Miller Fisher del síndrome de Guillain-Barré en un mamífero se administra al mamífero en una cantidad terapéuticamente efectiva.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 15 Las FIGURAS 1A-1F muestran una demostración inmunohistológica del efecto protector de eculizumab contra la acumulación de MAC y axonopatía motora de terminales en NMJs en el modelo de MFS *in vitro*. Se preincubaron preparaciones de hemidiafragma de ratón con mAb anti-gangliósido GQ1b CGM3 (50 $\mu\text{g/ml}$) y posteriormente se trataron con 40% de suero humano normal (NHS) con eculizumab añadido (mAb neutralizante anti-C5 humano; 100 $\mu\text{g/ml}$) o mAb de control coincidente con isotipo no específico (100 $\mu\text{g/ml}$), y se compararon con el tejido no tratado. La FIG. 1A muestra que los tejidos tratados con NHS/eculizumab muestran tinción intensa con C3c en las uniones neuromusculares (NMJs), similar a la de tejidos tratados con NHS/mAb de control ($p = 0,12$). La FIG. 1B muestra que no se observó tinción del complejo de ataque a membrana (MAC) en presencia de eculizumab (intensidad comparable a la línea de base, $p=0,92$), lo que indica la inhibición completa del complemento terminal. La FIG. 1C muestra que la integridad axonal se conservó en presencia de eculizumab, de acuerdo con lo evaluado mediante la presencia de señal de neurofilamento (NF), comparable a la línea de base en los controles no tratados ($p=0,80$). Las FIGs. 4D, 4E y 4F son imágenes inmunofluorescentes ilustrativas de NMJs en músculo de preparación completa que demuestran el efecto protector de eculizumab frente a la deposición de MAC (FIG. 4D), daño en la célula de Schwann perisináptica (pSC) (FIG. 4E) y daño axonal del terminal motor (FIG. 4F), en comparación con el tratamiento con NHS/mAb de control. Se usó tinción con el receptor de acetilcolina nicotínico postsináptico (nAChR; púrpura) para delinear la NMJ. La proteína del complemento intermedia C3c (FIG. 4D) permanece depositada abundantemente en las NMJ. * $p<0,01$, diferente de los no tratados; # $p<0,01$, diferente de los tratados con mAb de control; barra de escala = 20 μm .

- 20 Las FIGURAS 2A-2G muestran que eculizumab protege contra defectos electrofisiológicos y funcionales inducidos en las NMJs en el modelo de MFS *in vitro*. Se preincubaron preparaciones de hemidiafragma de ratón con mAb anti-gangliósido GQ1b CGM3 (50 $\mu\text{g/ml}$) y posteriormente se trataron con 40% de suero humano normal (NHS) con 100 $\mu\text{g/ml}$ de eculizumab (mAb neutralizante anti-C5 humano) añadido o con mAb de control con isotipo coincidente no específico. La FIG. 2A muestra la liberación espontánea de acetilcolina uniuicual, medida como frecuencia de MEPP, en la NMJ. Eculizumab evitó la inducción de una frecuencia alta de MEPP ($p<0,001$, $n=5$ músculos). La FIG. 2B muestra trazos de duración de 1 s representativos obtenidos durante la incubación con NHS, ya sea con eculizumab añadido (trazo superior) o con mAb de control (trazo inferior). La FIG. 2C muestra que las sacudidas asincrónicas de fibras musculares inducidas por NHS fueron evitadas en gran medida por eculizumab ($p<0,01$, $n= 5$ músculos). La FIG. 2D muestra que eculizumab evitó completamente la aparición de NMJs “silenciosas” (es decir, sin señales electrofisiológicas sinápticas detectables). Para las FIGs. 2E, 2F y 2G, se preincubaron preparaciones músculo-nervio de hemi-diafragma con 200 $\mu\text{g/ml}$ de CGM3 y se observó el efecto protector de varias concentraciones de eculizumab (0-100 $\mu\text{g/ml}$, $n=2-5$ músculos por concentración) añadidas al NHS en experimentos con registro de fuerza de contracción muscular. La FIG. 2E muestra ejemplos de los perfiles de contracción observados a 0, 30, 60 y 90 min después del inicio de la incubación de NHS, ya sea sin eculizumab añadido o con 6 o 100 $\mu\text{g/ml}$ de eculizumab añadido. Cada contracción fue producida por estimulación eléctrica supramáxima del nervio frénico durante 3 s a 40 Hz. La FIG. 2F muestra el desarrollo de la pérdida de contracción durante la incubación de NHS con las diversas concentraciones de eculizumab añadido. La FIG. 2G muestra la relación concentración-efecto de eculizumab y la protección contra la pérdida de contracción después de 90 min tras el inicio de la incubación de NHS. Una curva sigmoidal de Boltzmann se ajusta a través de los puntos de datos, produciendo una EC_{50} de 7,1 $\mu\text{g/ml}$. Las barras de error en las FIGs. 2A, 2D, 2F y 2G representan el Error Estándar de la Media (S.E.M.).

- 55 Las FIGURAS 3A-3B muestran la curva de respuesta a la dosis de eculizumab *in vivo*. La FIG. 3A muestra que un aumento en la dosis de eculizumab produce una reducción dependiente de la dosis en la deposición de MAC en la NMJ. La FIG. 3B muestra la señal de neurofilamento y demuestra la conservación de la integridad axonal en todas las dosis de eculizumab investigadas cuando se comparan con control de línea de base tratado con PBS.

Las FIGURAS 4A-4H muestran que la parálisis respiratoria en el modelo de MFS *in vivo* es evitada por eculizumab debido a la inhibición de bloqueo presináptico de transmisión neuromuscular en el diafragma. Se inyectó peritonealmente a ratones (n=6) con 1,5 mg de mAb anti-gangliósido GQ1b CGM3 y, 16 h después, con 0,5 ml de 100% de suero humano normal (NHS) como fuente de complemento. Se inyectó una dosis de 200 µg de eculizumab o de mAb de control en la vena de la cola muy poco antes de la inyección de NHS. La FIG. 4A muestra el análisis de la fuerza de agarre 2 h después de la inyección de NHS. Eculizumab evitó la pérdida de fuerza de tracción observada en el grupo con mAb de control ($p < 0,01$). La FIG. 4B muestra el volumen corriente promedio, y la FIG. 4C muestra la frecuencia respiratoria medida con pletismografía de cuerpo completo antes de la inyección de NHS y durante la 2ª, 4ª y 6ª hora después de la inyección de NHS. El desarrollo de dificultad para respirar fue evitado por eculizumab. La FIG. 4D muestra ejemplos de trazos de 1 s de señales de pletismografía obtenidas en ratones tratados con eculizumab y con mAb de control. La FIG. 4E muestra la fuerza de las sacudidas, y la FIG. 4F presenta la fuerza tetánica producida en el músculo de diafragma disecado mediante estimulación nerviosa sola y eléctrica de 40 Hz, respectivamente. Eculizumab evitó completamente la parálisis severa observada en los músculos de ratones tratados con mAb de control ($p < 0,01$). La FIG. 4G muestra que eculizumab evitó casi completamente la aparición de NMJs "silenciosas" (es decir sin señales electrofisiológicas sinápticas detectables) en estos ratones ($p < 0,001$). La FIG. 4H muestra treinta trazos representativos superpuestos de 1 s de duración obtenidos en las NMJs de músculo de ratones tratados con eculizumab (trazos superiores) o tratados con mAb de control (trazos inferiores). Las barras de error en los gráficos de barras de estas figuras representan el S.E.M.

Las FIGURAS 5A-5F muestran un análisis morfológico de NMJs de tejido de diafragma de ratones con MFS *in vivo*. Los ratones se inmunizaron pasivamente con 1,5 mg de mAb anti-gangliósido GQ1b, CGM3, seguido 16 h después de inyecciones concomitantes de 0,5 ml de 100% de suero humano normal (intraperitoneal) y eculizumab o mAb de control (intravenoso; 200 µg). Las FIGs. 5A y 5B muestran que la deposición de C3c y de complejo de ataque a membrana (MAC) se reduce en las uniones neuromusculares (NMJs) de ratones tratados con eculizumab y con mAb de control ($p < 0,01$). La FIG. 5C muestra que la señal de neurofilamento (NF) fue significativamente mayor en las NMJs de músculos de ratones tratados con eculizumab, en comparación con el control ($p < 0,01$). Las FIGs. 5D y 5E muestran imágenes inmunofluorescentes ilustrativas de NMJs en músculo de preparaciones completas. Se usó tinción con receptores de acetilcolina nicotínicos postsinápticos (nAChR; púrpura) para delinear las NMJs. La FIG. 5D muestra además la deposición de C3c y MAC. La FIG. 5E muestra además la integridad de NF y la deposición de MAC. La FIG. 5F es una microfotografía electrónica de terminales nerviosos protegidos con eculizumab con vesícula sináptica fuertemente empaquetada y mitocondrias con crestas paralelas densas en electrones. En las NMJs de ratones tratados con mAb de control, los terminales nerviosos son transparentes a los electrones, con vesículas sinápticas escasas y mitocondrias hinchadas. # $p < 0,01$, diferente de los tratados con mAb de control. Barras de escala en las FIGs. 5D y 5E = 20 µm; y en la FIG. 5F = 1 µm.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Resumen

Aquí se propone que el tratamiento de un paciente con neuropatía mediada por anticuerpos con un inhibidor del complemento atenuará la lesión neuronal. Por ejemplo, la neuropatía mediada por anticuerpos puede ser una neuropatía mediada por AGA. Los inhibidores de miembros de la cascada del complemento incluyen, por ejemplo, anticuerpos contra componentes tales como C5, C5b, C6, C7, C8, y C9. En realizaciones particulares, esta solicitud contempla el uso del anticuerpo anti-C5 eculizumab (un anticuerpo completo) que se sabe que inhibe la escisión de C5 en C5a y C5b. El tratamiento de pacientes con tales inhibidores disminuye de ese modo la lesión neuronal mediada por el complemento. El eculizumab se ha utilizado en estudios clínicos y se ha encontrado que es bien tolerado, con efectos secundarios mínimos. Véase la patente U.S. 6.355.245 y Hillmen et al., *New Engl. J. Med.* 350:552-559 (2004), cuyos contenidos se incorporan específicamente aquí como referencia.

El sistema del complemento

El sistema del complemento actúa en conjunto con otros sistemas inmunológicos del cuerpo para defenderse contra la intrusión de patógenos celulares y virales. Hay al menos 25 proteínas del complemento, las cuales se encuentran como una colección compleja de proteínas plasmáticas y cofactores de membrana. Las proteínas plasmáticas (que también se encuentran en muchos otros fluidos corporales, tales como linfa, médula ósea, fluido sinovial y fluido cerebroespinal) constituyen alrededor de 10% de las globulinas en el suero de los vertebrados. Los componentes del complemento obtienen sus funciones defensivas inmunitarias interactuando en una serie de intrincados, pero precisos, sucesos 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 avanza por medio de la ruta clásica o la ruta alternativa. Estas rutas comparten muchos componentes y, si bien difieren en sus primeras etapas, ambas convergen y comparten los mismos componentes del complemento terminal responsables de la destrucción de células y virus diana.

La ruta clásica del complemento se inicia típicamente mediante el reconocimiento por el anticuerpo y unión a un sitio antigénico en una célula diana. Este anticuerpo unido a la superficie reacciona posteriormente con el primer componente del complemento, C1. El C1 así unido experimenta un conjunto de reacciones autocatalíticas que dan como resultado, entre otras, la inducción de actividad proteolítica de C1, que actúa sobre los componentes del complemento C2 y C4.

Este C1 activado escinde a C2 y C4 en C2a, C2b, C4a, y C4b. La función de C2b está poco comprendida. C2a y C4b se combinan para formar el complejo C4b,2a, que es una proteasa activa conocida como convertasa C3 clásica. C4b,2a actúa para escindir C3 en C3a y C3b. C3a y C4a son ambas anafilatoxinas relativamente débiles que pueden inducir la desgranulación de mastocitos, dando como resultado la liberación de histamina y otros mediadores de inflamación.

C3b tiene múltiples funciones. Como opsonina, se une a las bacterias, virus y otras células y partículas y las marca para su eliminación de la circulación. C3b también puede formar un complejo con C4b, C2a para producir C4b,2a,3b, o convertasa C5 clásica, la cual escinde C5 en C5a (otra anafilatoxina) y C5b. Una convertasa C5 alternativa es la C3b,Bb,C3b y realiza la misma función. C5b se combina con C6 para producir C5b,6, y este complejo se combina con C7 para formar el complejo ternario C5b,6,7. El complejo C5b,6,7 se une a C8 en la superficie de una membrana celular. Con la unión de C9, se forma el complejo de ataque a membrana (MAC) completo (C5b-9), el cual media la lisis de células, microorganismos, y virus extraños.

Otras discusiones de la ruta clásica del complemento, así como también una descripción detallada de la ruta alternativa de activación del complemento, se pueden encontrar en numerosas publicaciones, incluyendo, por ejemplo, Muller-Eberhard, *Annu Rev Biochem.* 1988;57:321-47.

Inhibidores de la cascada del complemento

También se describe aquí que un inhibidor del complemento puede ser una molécula pequeña (de hasta 6.000 Da de peso molecular), un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico, un peptidomimético, o una macromolécula que no es un ácido nucleico o una proteína. Estos agentes incluyen, sin limitarse a ellos, moléculas orgánicas pequeñas, aptámeros de ARN, aptámeros de L-ARN, Spiegelmeros, compuestos antisentido, ARN bicatenario, ARN interferente pequeño, inhibidores de ácido nucleico bloqueados, e inhibidores de ácido nucleico peptídico.

También se describe aquí que un inhibidor del complemento puede ser una proteína o fragmento de proteína. Se conocen proteínas que inhiben la cascada del complemento, incluyendo CD59, CD55, CD46 y otros inhibidores de C8 y C9 (véase, por ejemplo, la patente U.S. 6.100.443). También se conocen proteínas que se sabe que son receptores del complemento y que se unen al complemento (véase, 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, lesión neuronal mediada por el complemento, y producción de C3a y C5a. Los expertos en la técnica reconocerán los anteriores como algunos, pero no todos, de los métodos conocidos para inhibir el complemento y su activación.

En ciertas realizaciones, un inhibidor del complemento puede ser un anticuerpo capaz de inhibir el complemento, tal como un anticuerpo que puede bloquear la formación de MAC. Por ejemplo, un anticuerpo inhibidor del complemento puede incluir un anticuerpo anti-C5. Tales anticuerpos anti-C5 pueden interactuar directamente con C5 y/o C5b, para inhibir la formación y/o la función fisiológica de C5b.

Los anticuerpos anti-C5 adecuados son conocidos por los expertos en la técnica. Los anticuerpos se pueden obtener contra componentes individuales del complemento activado (véase, por ejemplo, la patente U.S. 6.534.058; la solicitud de patente U.S. publicada US 2003/0129187; y la patente U.S. 5.660.825). La patente U.S. 6.355.245 presenta un anticuerpo que se une a C5 e inhibe la escisión en C5a y C5b, disminuyendo de ese modo no sólo la formación de C5a sino también de los componentes del complemento aguas abajo.

La concentración y/o la actividad fisiológica de C5a y C5b en un fluido corporal se pueden medir usando métodos bien conocidos en la técnica. Para C5a, tales métodos incluyen análisis de quimiotaxia, RIAs, o ELISAs (véanse, por ejemplo, Ward y Zvaifler, *J Clin Invest.* 1971 Mar; 50(3):606-16; Wurzner, et al., *Complement Inflamm.* 8:328-340, 1991). Para C5b, se pueden usar análisis hemolíticos o análisis para C5b-9 soluble, como se discute aquí. También se pueden usar otros análisis conocidos en la técnica. Usando análisis de estos o de otros tipos apropiados, se pueden seleccionar anticuerpos candidatos capaces de inhibir el complemento, tales como anticuerpos anti-C5, conocidos ahora o identificados posteriormente, con el fin de 1) identificar compuestos que son útiles en la práctica de la solicitud y 2) determinar los niveles de dosificación apropiados de estos compuestos.

Un anticuerpo capaz de inhibir el complemento, tal como un anticuerpo anti-C5 que afecte a C5b, se usa preferiblemente en concentraciones que proporcionan reducción sustancial (es decir, reducción de al menos alrededor de 25% en comparación con la lograda en ausencia del anticuerpo anti-C5) en los niveles de C5b presentes en al menos uno de los fluidos obtenidos de la sangre del paciente tras la activación del complemento en el fluido. Tales concentraciones se pueden medir convenientemente midiendo la capacidad de lisar células (por ejemplo, la actividad hemolítica) del complemento presente en el fluido, o los niveles de C5b-9 soluble presente en el

fluido. En consecuencia, una concentración específica para un anticuerpo que afecta a C5b es aquella que da como resultado una reducción sustancial (es decir, una reducción de al menos 25%) en la capacidad de lisar células del complemento presente en al menos uno de los fluidos obtenidos de la sangre del paciente. Las reducciones de la capacidad de lisar células del complemento presente en los fluidos corporales del paciente se pueden medir mediante métodos bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante un análisis hemolítico convencional, tal como el análisis de hemolisis descrito por Kabat y Mayer (eds.), "Experimental Immunology, 2a. Edición", 135-240, Springfield, IL, CC Thomas (1961), páginas 135-139, o una variación convencional de ese ensayo, tal como el método de hemolisis de eritrocitos de pollo descrito más adelante.

Los anticuerpos específicos capaces de inhibir el complemento, tales como un anticuerpo anti-C5, son relativamente específicos y no bloquean las funciones de componentes iniciales del complemento. En particular, tales agentes específicos no alterarán sustancialmente las funciones de opsonización asociadas con el componente del complemento C3b, cuyas funciones proporcionan un medio para el aclaramiento de partículas y sustancias extrañas del cuerpo.

C3b se genera por la escisión de C3, la cual es efectuada por convertasas C3 clásicas y/o alternativas, y da como resultado la generación de C3a y C3b. Por lo tanto, con el fin de no alterar las funciones de opsonización asociadas con C3b, los anticuerpos específicos capaces de inhibir el complemento aguas abajo de C3, tales como un anticuerpo anti-C5, no interfieren sustancialmente con la escisión del componente C3 del complemento en un fluido corporal del paciente (por ejemplo, suero) en C3a y C3b. Tal interferencia con la escisión de C3 puede ser detectada midiendo los niveles en el fluido corporal de C3a y/o C3b, los cuales se producen en relaciones equimolares mediante las acciones de las convertasas C3. Tales mediciones son informativas debido a que los niveles de C3a y C3b serán reducidos (en comparación con una muestra similar sin el anticuerpo capaz de inhibir el complemento, tal como un anticuerpo anti-C5) si la escisión es interferida por un anticuerpo capaz de inhibir el complemento.

En la práctica, la medida cuantitativa de tal escisión generalmente es más exacta cuando se lleva a cabo mediante la medida de los niveles de C3a en el fluido corporal en lugar de los niveles de C3b en el fluido corporal, dado que C3a permanece en fase fluida, mientras que C3b se aclara rápidamente. Los niveles de C3a en un fluido corporal se pueden medir mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo usando un kit EIA C3a disponible comercialmente, por ejemplo el que vende Quidel Corporation, San Diego, California, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Particularmente, los anticuerpos específicos capaces de inhibir el complemento, tales como un anticuerpo anti-C5, no producen esencialmente ninguna reducción en los niveles de C3a en el fluido corporal tras la activación del complemento cuando se someten a ensayo en tales análisis.

Algunos anticuerpos de la descripción evitarán la escisión de C5 para formar C5a y C5b, impidiendo así la generación de la actividad anafilatóxica asociada con C5a y evitando el ensamblaje del complejo de ataque a membrana asociado con C5b. Como se discutió anteriormente, en una realización particular, estos anticuerpos anti-C5 no alterarán la función de opsonización asociada con la acción de C3b.

Un método preferido para inhibir la actividad del complemento es usar un anticuerpo monoclonal que se une al complemento C5 e inhibe la escisión. Esto disminuye la formación tanto de C5a como de C5b mientras que al mismo tiempo permite la formación de C3a y C3b, los cuales son beneficiosos para el receptor. Tales anticuerpos que son específicos para el complemento en seres humanos son conocidos (patente U.S. 6.355.245). Estos anticuerpos descritos en la patente U.S. 6.355.245 incluyen un anticuerpo completo preferido (ahora denominado eculizumab). Un anticuerpo similar contra C5 de ratón se denomina BB5.1 (Frei et al., Mol. Cell. Probes. 1:141-149 (1987)). Los anticuerpos que inhiben la actividad del complemento no tienen que ser anticuerpos monoclonales. Pueden ser, por ejemplo, anticuerpos policlonales. Adicionalmente pueden ser fragmentos de anticuerpo. Un fragmento de anticuerpo incluye, pero sin limitarse a ellos, un Fab, F(ab'), F(ab')₂, anticuerpo monocatenario, y Fv. Además, es bien conocido por los expertos en la técnica que los anticuerpos pueden ser humanizados (Jones et al., Nature 321 :522-5 (1986)), quimerizados o desinmunizados. Los anticuerpos que se van a usar en la presente descripción pueden ser cualquiera de estos. Es preferible usar anticuerpos humanizados.

En realizaciones específicas, un agente terapéutico de la descripción comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Los anticuerpos y sus fragmentos se pueden obtener mediante cualquier método convencional, tales como los métodos descritos aquí. Los anticuerpos se encuentran en muchas formas, por ejemplo IgA, IgG, IgM, etc. Adicionalmente, los anticuerpos pueden ser diseñados de numerosas formas. Se pueden obtener como anticuerpos monocatenarios (incluyendo sustancias inmunofarmacéuticas modulares pequeñas o SMIPs™), fragmentos Fab y F(ab')₂, etc. Los anticuerpos pueden ser humanizados, quimerizados, desinmunizados, o totalmente humanos. Numerosas publicaciones presentan los muchos tipos de anticuerpos y los métodos para diseñar tales anticuerpos. Por ejemplo, véanse las patentes U.S. n^{os} 6.355.245; 6.180.370; 5.693.762; 6.407.213; 6.548.640; 5.565.332; 5.225.539; 6.103.889; y 5.260.203.

Esta invención proporciona fragmentos de anticuerpos anti-C5, que pueden comprender una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión al antígeno o la región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata et al., Protein Eng. 8:1057-1062 (1995)); moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión al antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse rápidamente. El tratamiento de un anticuerpo con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios que se combinan con el antígeno y que todavía es capaz de reticular el antígeno.

5 "Fv" se refiere al fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera, en asociación estrecha, no covalente. Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L . Colectivamente, las seis CDRs le confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, aún un dominio variable solo (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDRs específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer un antígeno y de unirse a él, si bien probablemente con una menor afinidad que todo el sitio de unión completo.

10 El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el término carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación aquí para Fab' en los cuales el resto o restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ fueron producidos originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagras entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

20 Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica simple. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una repaso de scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore, eds. (Springer-Verlag: Nueva York, 1994), p. 269-315.

25 Los SMIPs son una clase de péptido monocatenario diseñados para incluir una región de unión a diana, dominio efector (dominios CH2 y CH3). Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente U.S. nº 20050238646. La región de unión a diana puede obtenerse de la región variable o CDRs de un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo anti-C5 de la solicitud. Alternativamente, la región de unión a diana se obtiene de una proteína que se une a C5.

30 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, dichos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Con el uso de un ligador que sea demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en el documento EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

35 Es bien conocido que la unión a una molécula (o a un patógeno) de anticuerpos con una región Fc ayuda al procesamiento y aclaramiento de la molécula (o patógeno). Las porciones de anticuerpos Fc son reconocidas por receptores especializados expresados por las células efectoras inmunitarias. Las porciones Fc de anticuerpos IgG1 e IgG3 son reconocidas por los receptores de Fc presentes en la superficie de células fagocíticas, tales como macrófagos y neutrófilos, las cuales pueden unirse de esta forma y englobar a las moléculas o patógenos recubiertos con anticuerpos de estos isotipos (C. A. Janeway et al., *Immunobiology* 5a. edición, página 147, Garland Publishing (Nueva York, 2001)).

40 Esta descripción también proporciona anticuerpos monoclonales anti-C5. Un anticuerpo monoclonal se puede obtener a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que constituyen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un solo sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque con frecuencia son sintetizados por el cultivo de hibridoma, no contaminados por otras inmunoglobulinas. Los anticuerpos monoclonales también se pueden producir en células transfectadas, tales como células CHO y células NSO. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no requiere la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente descripción se pueden obtener mediante el método de hibridoma, descrito primero por Kohler et al., *Nature* 256:495-497 (1975), o se pueden obtener mediante métodos de ADN recombinante (véanse, por ejemplo, las patentes U.S. nºs 4.816.567 y 6.331.415). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Una descripción de la preparación de un anticuerpo monoclonal anti-C5 humano de ratón con características de unión específica se presenta en la publicación de solicitud de patente U.S. nº 20050226870. Wurzner et al., *Complement Inflamm.* 8:328-340 (1991), describen la preparación de otros anticuerpos monoclonales anti-C5 humano de ratón denominados N19-8 y N20-9.

5 Otros anticuerpos contemplados específicamente son los anticuerpos "oligoclonales". Como se usa aquí, la expresión "anticuerpos oligoclonales" se refiere a una mezcla predeterminada de distintos anticuerpos monoclonales. Véanse, por ejemplo, la publicación PCT WO 95/20401; las patentes U.S. nºs 5.789.208 y 6.335.163. En una realización, los anticuerpos oligoclonales que consisten en una mezcla predeterminada de anticuerpos contra uno o más epítomos se generan en una sola célula. En otras realizaciones, los anticuerpos oligoclonales comprenden una pluralidad de cadenas pesadas capaces de aparearse con una cadena ligera común para generar anticuerpos con múltiples especificidades (*por ejemplo*, publicación PCT WO 04/009618). Los anticuerpos oligoclonales son particularmente útiles cuando se desea dirigirse hacia múltiples epítomos en una sola molécula diana (por ejemplo, C5). En vista de los ensayos y epítomos descritos aquí, los expertos en la técnica pueden generar o seleccionar anticuerpos o mezclas de anticuerpos que son aplicables para un propósito pretendido y necesidad deseada.

15 En ciertas realizaciones que incluyen un anticuerpo humanizado y/o quimérico, una o más de las CDRs se obtienen de un anticuerpo anti-C5 humano. En una realización específica, todas las CDRs se obtienen de un anticuerpo anti-C5 humano. En otra realización específica, las CDRs de más de un anticuerpo anti-C5 humano se mezclan y se aparean en un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender una CDR1 de la cadena ligera de un primer anticuerpo anti-C5 humano combinada con CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de un segundo anticuerpo anti-C5 humano, y las CDRs de la cadena pesada se pueden obtener de un tercer anticuerpo anti-C5 humano. Además, las regiones del marco se pueden obtener de uno de los mismos anticuerpos anti-C5 humanos, de uno o más anticuerpos diferentes, tales como un anticuerpo humano, o de un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanos o humanizados son específicos para la administración a pacientes humanos.

25 En ciertas realizaciones, los anticuerpos monocatenarios, y los anticuerpos quiméricos, humanizados o primatizados (injertados con CDRs), así como también anticuerpos quiméricos o injertados con CDRs de cadena simple, que comprenden porciones obtenidas de diferentes especies, también están englobados por la presente descripción como fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo. Las diversas porciones de estos anticuerpos se pueden unir químicamente mediante técnicas convencionales, o se pueden preparar como una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, se pueden expresar ácidos nucleicos que codifican una cadena quimérica o humanizada para producir una proteína contigua. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. nºs 4.816.567 y 6.331.415; la patente U.S. nº 4.816.397; la patente europea nº 0.120.694; WO 86/01533; la patente europea nº 0.194.276 B1; la patente U.S. nº 5.225.539; y la patente europea nº 0.239.400 B1. Véase también, Newman et al., *BioTechnology* 10:1455-1460 (1992), con respecto al anticuerpo primatizado. Véanse, por ejemplo, Ladner et al., patente U.S. nº 4.946.778; y Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988), con respecto a los anticuerpos monocatenarios.

35 Además, también se pueden producir fragmentos funcionales de anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos quiméricos, humanizados, privatizados o monocatenarios. Los fragmentos funcionales de los anticuerpos de la presente invención retienen al menos una función de unión y/o de modulación del anticuerpo de longitud completa del cual provienen. Los fragmentos funcionales preferidos retienen una función de unión al antígeno de un anticuerpo de longitud completa correspondiente (tal como, por ejemplo, la capacidad del anticuerpo anti-C5 para unirse a C5).

45 Los métodos generales para la inmunización de animales (en este caso con C5 y/o C5b, etc.), el aislamiento de células productoras de anticuerpos, la fusión de tales células con células inmortales (por ejemplo, células de mieloma) para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, el cribado de sobrenadantes de hibridoma para determinar la reactividad de los anticuerpos monoclonales segregados con un antígeno deseado (en este caso el inmunógeno o una molécula que contiene el inmunógeno), la preparación de cantidades de tales anticuerpos en sobrenadantes de hibridoma o fluidos de ascitis, y para la purificación y almacenamiento de tales anticuerpos monoclonales, se pueden encontrar en numerosas publicaciones. Éstas incluyen: Coligan, et al., eds. *Current Protocols In Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1992; Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988; Liddell y Cryer, *A Practical Guide To Monoclonal Antibodies*, John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, Inglaterra, 1991; Montz et al., *Cellular Immunol.* 127:337-351 (1990); Wurzner et al., *Complement Inflamm.* 8:328-340 (1991); y Mollnes et al., *Scand. J. Immunol.* 28:307-312 (1988).

Formulaciones farmacéuticas y usos

55 Los métodos de administración de moléculas pequeñas, proteínas, y ácidos nucleicos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos de administración de anticuerpos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Para lograr la inhibición deseada, los anticuerpos se pueden administrar en una variedad de formas de dosis unitaria. La dosis variará de acuerdo con el anticuerpo particular. Por ejemplo, diferentes anticuerpos pueden tener diferentes masas y/o afinidades, y de este modo pueden requerir diferentes niveles de dosificación. Los anticuerpos preparados como fragmentos Fab también requerirán dosificaciones diferentes a las de las inmunoglobulinas

intactas equivalentes, dado que son de masa considerablemente más pequeña que las inmunoglobulinas intactas, y de este modo requieren menores dosis para alcanzar los mismos niveles molares en la sangre del paciente. La dosis también variará dependiendo de la forma de administración, los síntomas particulares del paciente que está siendo tratado, la salud general, condición, talla, y edad del paciente, y del criterio del médico que prescribe. Los niveles de dosis de los anticuerpos para sujetos humanos generalmente están entre alrededor de 1 mg por kg y alrededor de 100 mg por kg por paciente por tratamiento, y preferiblemente entre alrededor de 5 mg por kg y alrededor de 50 mg por kg por paciente por tratamiento. En términos de concentraciones en plasma, las concentraciones de anticuerpo preferiblemente están en el intervalo de alrededor de 25 µg/ml a alrededor de 500 µg/ml. Sin embargo, se pueden requerir mayores cantidades para casos extremos, y pueden ser suficientes menores cantidades para casos más leves.

La administración de los anticuerpos anti-C5 generalmente se realizará por una vía intravascular, por ejemplo por infusión intravenosa mediante inyección. Se pueden usar otras vías de administración si se desea, pero una vía intravenosa será la más preferible. Las formulaciones apropiadas para inyección se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17a ed. (1985). Estas formulaciones deben ser estériles y no pirógenas, y generalmente incluirán un vehículo farmacéuticamente efectivo, tal como disolución salina, disolución salina tamponada (por ejemplo, tamponada con fosfato), disolución de Hank, disolución de Ringer, dextrosa/disolución salina, disoluciones de glucosa, y similares. Las formulaciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera, tales como agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, agentes bactericidas, conservadores, estabilizantes, y similares.

La administración de los anticuerpos capaces de inhibir el complemento, tales como un anticuerpo anti-C5, generalmente se realizará por vía parenteral, comúnmente mediante inyección, tal como una inyección intra-articular o intravascular (por ejemplo, infusión intravenosa) o inyección intramuscular. Se pueden usar otras vías de administración, por ejemplo oral (p.o.), si se desea y es práctico para administrar el anticuerpo particular capaz de inhibir el complemento. Los anticuerpos capaces de inhibir el complemento, tales como un anticuerpo anti-C5, también se pueden administrar en una variedad de formas de dosis unitaria, y sus dosificaciones variarán también con el tamaño, potencia y semivida in vivo del anticuerpo particular que está siendo administrado capaz de inhibir el complemento. La dosis de anticuerpos capaces de inhibir el complemento, tales como un anticuerpo anti-C5, también variará dependiendo de la forma de administración, los síntomas particulares del paciente que está siendo tratado, la salud general, condición, talla, y edad del paciente, y del criterio del médico que prescribe.

En ciertas realizaciones, un tratamiento terapéutico típico incluye una serie de dosis, que usualmente se administrarán concurrentemente con el seguimiento de los criterios de valoración clínicos con los niveles de dosificación ajustados según sea necesario para lograr el resultado clínico deseado. En ciertas realizaciones, el tratamiento se administra en múltiples dosis durante al menos una semana. En ciertas realizaciones, el tratamiento se administra en múltiples dosis durante al menos un mes. En ciertas realizaciones, el tratamiento se administra en múltiples dosis durante al menos un año. En ciertas realizaciones, el tratamiento se administra en múltiples dosis durante el resto de la vida del paciente.

La frecuencia de administración también se puede ajustar de acuerdo con diversos parámetros. Estos incluyen la respuesta clínica, la semivida en plasma de la sustancia terapéutica de la descripción, y los niveles del anticuerpo en un fluido corporal, tal como sangre, plasma, suero o fluido sinovial. Para guiar el ajuste de la frecuencia de administración, se pueden monitorizar los niveles de la sustancia terapéutica de la descripción en el fluido corporal en el transcurso del tratamiento.

En ciertas realizaciones, la frecuencia de administración se puede ajustar de acuerdo con un ensayo que mide la capacidad de lisar células del complemento presente en uno o más de los fluidos corporales del paciente. La capacidad de lisar células se puede medir como porcentaje de hemólisis en ensayos hemolíticos de los tipos descritos aquí. Una reducción de 10% o 25% o 50% en la capacidad de lisar células del complemento presente en un fluido corporal después del tratamiento con el anticuerpo capaz de inhibir el complemento utilizado en la práctica de la solicitud, significa que el porcentaje de hemólisis después del tratamiento es 90, 75, o 50 por ciento, respectivamente, del porcentaje de hemólisis antes del tratamiento.

Para el tratamiento de neuropatías mediadas por anticuerpos mediante administración sistémica de un anticuerpo capaz de inhibir el complemento, tal como un anticuerpo anti-C5 (contrariamente a la administración local), la administración de una dosis inicial grande es específica, es decir, una sola dosis inicial suficiente para producir una reducción sustancial, y más preferiblemente una reducción de al menos alrededor de 50%, en la actividad hemolítica del suero del paciente. Tal dosis inicial grande es seguida preferiblemente de la administración repetida regularmente de dosis decrecientes según sea necesario para mantener reducciones sustanciales de título hemolítico en suero. En otra realización, la dosis inicial se administra tanto por vía sistémica como local, seguido de la administración sistémica repetida de dosis decrecientes como se describió anteriormente. Para la administración de un anticuerpo anti-C5 a seres humanos, véase, por ejemplo, Hillmen et al, N. Engl. J. Med. 350:552-559 (2004). Los niveles de anticuerpo administrados en Hillmen et al. se basan en la semivida del anticuerpo y son relevantes para la administración de un anticuerpo anti-C5 para otras indicaciones, tales como el tratamiento de neuropatías.

Las formulaciones particularmente útiles para agentes terapéuticos a base de anticuerpos también se describen en las publicaciones de solicitud de patente U.S. n^{os} 20030202972, 20040091490 y 20050158316. En ciertas realizaciones, las formulaciones líquidas de la solicitud están sustancialmente libres de agente tensoactivo y/o sales inorgánicas. En otra realización específica, las formulaciones líquidas tienen un pH que oscila de alrededor de 5,0 a
 5 alrededor de 7,0. En todavía otra realización específica, las formulaciones líquidas comprenden histidina en una concentración que oscila de alrededor de 1 mM a alrededor de 100 mM. También se contempla que las formulaciones líquidas pueden comprender además uno o más excipientes, tal como un sacárido, un aminoácido (por ejemplo, arginina, lisina, y metionina) y un poliol. Se pueden encontrar otras descripciones y métodos para preparar y analizar formulaciones líquidas, por ejemplo, en las publicaciones PCT WO 03/106644, WO 04/066957, y
 10 WO 04/091658.

También pueden estar presentes agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como lauril sulfato de sodio y estearato de magnesio, así como también agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, saborizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes, en las composiciones farmacéuticas de la solicitud.

En ciertas realizaciones, las formulaciones de los anticuerpos de la presente invención son formulaciones libres de pirógenos que están sustancialmente libres de endotoxinas y/o de sustancias pirógenas relacionadas. Las endotoxinas incluyen toxinas que están confinadas dentro de microorganismos y se liberan cuando los microorganismos se rompen o mueren. Las sustancias pirógenas también incluyen sustancias termoestables (glicoproteínas) inductoras de fiebre procedentes de la membrana exterior de bacterias y otros microorganismos.
 15 Ambas de estas sustancias pueden causar fiebre, hipotensión y choque si se administran a seres humanos. Debido a los efectos dañinos potenciales, es ventajoso eliminar cantidades incluso bajas de endotoxinas de las disoluciones de fármaco administradas por vía intravenosa. La Food & Drug Administration ("FDA") ha establecido un límite superior de 5 unidades de endotoxina (EU) por dosis por kilogramo de peso corporal en un solo periodo de una hora para aplicaciones de fármaco intravenoso (The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000)). Cuando se administran proteínas terapéuticas en cantidades de varios cientos o miles de miligramos por kilogramo de peso corporal, como puede ser el caso con los anticuerpos monoclonales, es ventajoso eliminar cantidades incluso muy pequeñas de endotoxina.
 20
 25

Las formulaciones de los anticuerpos de la presente invención incluyen las que son apropiadas para administración oral, dietética, tópica, parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea), oftalmológica (por ejemplo, tópica o intraocular), inhalación (por ejemplo, inhalación intrabronquial, intranasal u oral, gotas intranasales), administración rectal, y/o intravaginal. Otros métodos de administración apropiados también pueden incluir dispositivos recargables o biodegradables y dispositivos poliméricos de liberación controlada. Las endoprótesis, en particular, pueden estar recubiertas con un polímero de liberación controlada mezclado con un agente de la solicitud. Las composiciones farmacéuticas de esta descripción también se pueden administrar como
 30 parte de una terapia de combinación con otros agentes (ya sea en la misma formulación o en una formulación por separado).
 35

La cantidad de la formulación que será terapéuticamente efectiva se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. Además, opcionalmente se pueden emplear ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno, y se debe decidir de acuerdo con el criterio del médico y con cada una de las circunstancias del paciente. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de curvas de respuesta frente a la dosis obtenidas de sistemas de ensayo *in vitro* o de modelos de animales. La dosificación de las composiciones que se van a administrar puede ser determinada por el técnico entrenado sin experimentación indebida, juntamente con estudios estándar de respuesta frente a la dosis. Las circunstancias relevantes que se deben considerar para realizar esas determinaciones incluyen la afección o afecciones que se van a tratar, la elección de la composición que se va a administrar, la edad, peso y respuesta del paciente individual, y la intensidad de los síntomas del paciente. Por ejemplo, se puede usar el peso corporal real del paciente para calcular la dosis de las formulaciones en mililitros (ml) que se debe administrar. Puede no haber ajuste hacia abajo para el peso "ideal". En tal situación, se puede calcular una dosis apropiada mediante la siguiente fórmula: Dosis (ml) = [peso del paciente (kg) x nivel de
 40 dosis (mg/kg)/ concentración del fármaco (mg/ml)]
 45
 50

Para lograr los resultados del tratamiento deseados, se pueden administrar anticuerpos anti-C5 en una variedad de formas de dosis unitaria. La dosis variará de acuerdo con el anticuerpo particular. Por ejemplo, diferentes anticuerpos pueden tener diferentes masas y/o afinidades, y de este modo pueden requerir diferentes niveles de dosificación. Los anticuerpos preparados como fragmentos Fab' o anticuerpos monocatenarios también requerirán dosis diferentes de aquellas de las inmunoglobulinas naturales equivalentes, dado que son de masa considerablemente más pequeña que las inmunoglobulinas naturales, y de este modo requieren dosis más bajas para alcanzar los mismos niveles molares en la sangre del paciente.
 55

Otros compuestos terapéuticos de la descripción también se pueden administrar en una variedad de formas de dosis unitaria, y sus dosis también variarán con el tamaño, potencia y semivida *in vivo* del compuesto terapéutico particular que está siendo administrado.
 60

Las dosis de los compuestos terapéuticos de la descripción también variarán dependiendo de la forma de administración, los síntomas particulares del paciente que está siendo tratado, la salud general, condición, talla, y edad del paciente, y del criterio del médico que prescribe.

5 Las formulaciones de la solicitud pueden ser distribuidas como artículos de fabricación que comprenden material de envasado y un agente farmacéutico que comprende el anticuerpo capaz de inhibir el complemento y un vehículo aceptable farmacéuticamente según sea apropiado para el modo de administración. El material de envasado puede incluir una etiqueta que indique que la formulación es para uso en el tratamiento de neuropatías mediadas por anticuerpos. Aunque se prefieren los anticuerpos, especialmente anticuerpos anti-C5 que ya han demostrado que son seguros y efectivos para disminuir la acumulación de componentes del complemento aguas abajo en personas, el uso de otros inhibidores del complemento también está contemplado por esta descripción. Las formulaciones farmacéuticas y usos de la descripción se pueden combinar con cualquier inhibidor del complemento conocido o tratamiento de neuropatía mediada por anticuerpos conocida en la técnica (más arriba).

15 Los tratamientos de la solicitud se pueden usar en combinación con otros tratamientos de la solicitud, o con tratamientos conocidos para neuropatías mediadas por anticuerpos. Los tratamientos de la solicitud se pueden coadministrar con otros tratamientos que traten síntomas de neuropatías mediadas por anticuerpos. La administración de los compuestos terapéuticos de la descripción generalmente se llevará a cabo por vía parenteral, típicamente mediante inyección, tal como inyección intra-articular o intravascular (por ejemplo, infusión intravenosa) o inyección intramuscular. Otras vías de administración, por ejemplo oral (p.o.), se pueden usar si se desea y es práctico para el anticuerpo particular capaz de inhibir el complemento que se va a administrar.

20 En caso de conflicto, regirá la presente solicitud, incluyendo cualquier definición en ella.

Los presentes métodos se describen con referencia a los siguientes Ejemplos, los cuales se ofrecen a título de ilustración y no pretenden limitar la descripción en forma alguna. Se utilizan las técnicas estándar bien conocidas en la técnica o las técnicas descritas específicamente más adelante.

EJEMPLOS

25 **EJEMPLO 1. ECULIZUMAB EVITA LESIONES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES MEDIADAS POR EL COMPLEMENTO EN EL MODELO DE MFS IN VITRO**

En el modelo de MFS *in vitro*, el tratamiento de preparaciones de nervio-músculo de diafragma con mAb anti-GQ1b CGM3 y suero humano normal (NHS), en presencia de un mAb con isotipo coincidente irrelevante (100 µg/ml), que sirvió como control negativo para eculizumab, indujo la activación del complemento en las NMJs. Esto se evidenció morfológicamente por la deposición de C3c y de MAC (FIGs. 1A, 1B, 1D, 1E y 1F), así como también por células de Schwann perisinápticas (pSC) y terminales nerviosos motores dañados mostrados por tinción con homodímero 1 de etidio (EthD-1) y pérdida de tinción de neurofilamento (NF), respectivamente (FIGs. 1C, 1E y 1F). Estas características fueron idénticas a las dadas a conocer anteriormente (Goodyear et al. J. Clin. Invest 104:697-708 (1999); Halstead et al. Brain 127:2109-2123 (2004); O'Hanlon et al. Brain 124:893-906 (2001)). La adición de 100 µg/ml de eculizumab al NHS como fuente de complemento evitó completamente la deposición de MAC (FIGs. 1B, 1D, 1E y 1F; $p < 0,001$) y la pérdida de NF axonal de los terminales (FIGs. 1C y 1F; $p < 0,001$), mientras que la deposición del componente del complemento más temprano C3c no fue afectada (FIGs. 1A y 1D; $p = 0,2$). Además, se abolió el daño a las pSCs, ya que solamente 2% de las 1439 NMJs investigadas tuvo uno o más núcleos positivos a EthD-1, en comparación con 33% de 1529 NMJs investigadas en tejido tratado con mAb de control (FIG. 1E; $p < 0,001$).

Estas observaciones inmunohistológicas fueron paralelas a las observaciones electrofisiológicas y funcionales. En las NMJs preincubadas con CGM3, el NHS (40%) en presencia del mAb de control indujo un gran incremento en la frecuencia de los potenciales de placa terminal miniatura (MEPPs, los sucesos postsinápticos ocurridos a partir de la liberación espontánea de cuantos de acetilcolina individuales del terminal nervioso motor presináptico), como se observó previamente (Goodyear et al. J. Clin. Invest 104:697-708 (1999)). Este efecto se evitó casi completamente mediante 100 µg/ml de eculizumab. La frecuencia de MEPP fue alrededor de $0,7 \text{ s}^{-1}$ antes y después de la incubación en 50 µg/ml de CGM3, y se elevó hasta $34,0 \pm 4,6 \text{ s}^{-1}$ en presencia de NHS con 100 µg/ml de mAb de control añadido. Por el contrario, la frecuencia de MEPP sólo fue $3,1 \pm 1,3 \text{ s}^{-1}$ en presencia de NHS con 100 µg/ml de eculizumab añadido (FIGs. 2A y 2B; $n = 5$ músculos; $p < 0,001$).

50 Eculizumab no alteró los tiempos de aumento y disminución del potencial de membrana en reposo de la fibra muscular o amplitud de MEPP (no se muestran datos). Como se describió anteriormente (Goodyear et al. J. Clin. Invest 104:697-708 (1999); Plomp et al. Ann. Neurol. 45:189-199 (1999)), las sacudidas asincrónicas de fibras musculares ocurren durante la incubación de NHS (puntuación visual de la mediana 4; $n = 5$ músculos). Eculizumab evitó tal alto gado de sacudidas observándose sólo una puntuación de la mediana de 1 (FIG. 2C; $n = 5$ músculos, $p < 0,01$, prueba de Mann-Whitney), lo que iguala los niveles basales bajos observados en los periodos de observación antes y después de la incubación de CGM3.

El resultado final de daño presináptico mediado por anti-CGM3/complemento es el bloqueo de la transmisión sináptica en la NMJ debido a la incapacidad para liberar acetilcolina (Goodyear et al. J. Clin. Invest 104:697-708 (1999)). Eculizumab evitó completamente este efecto. No se encontraron NMJs “silenciosas” (es decir, ausencia de MEPPs y potenciales de acción muscular provocados por estimulación nerviosa), mientras que en la condición de mAb de control se observó que $19 \pm 2,6$ % del número total de NMJs muestreadas estaban silenciadas (FIG. 2D; n=5 músculos). Además, se cuantificó el efecto protector de eculizumab sobre la parálisis muscular en el modelo de MFS *in vitro*. Eculizumab inhibió la pérdida de fuerza de contracción inducida por estimulación nerviosa de preparaciones de hemi-diafragma de una manera dependiente de la concentración después del tratamiento con 200 $\mu\text{g/ml}$ de CGM3 y 33% de NHS (FIGs. 2E y 2F). En los experimentos de control sin eculizumab, NHS indujo pérdida de fuerza de contracción casi completa en un periodo de 90 min. La adición de 3 ó 6 $\mu\text{g/ml}$ de eculizumab al NHS ralentizó la tasa de pérdida de fuerza de contracción considerablemente (se observó 50% de pérdida a 39 y 60 min, respectivamente, en comparación con 27 min en la condición de control; FIG. 2F). Mayores concentraciones de eculizumab de 9 y 12 $\mu\text{g/ml}$ fueron casi completamente protectoras (quedó >90% de la concentración inicial después de 90 min), mientras que 25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ evitaron completamente cualquier pérdida de contracción inducida por CGM3/NHS. Una curva sigmoidal de Boltzmann ajustada a través de los puntos de datos de concentración-efecto obtenidos produjo una EC_{50} de 7,1 $\mu\text{g/ml}$ para eculizumab en estas condiciones (FIG. 2G).

Estos análisis inmunohistológicos y funcionales muestran que eculizumab evita eficientemente los efectos patofisiológicos mediados por el complemento en el modelo de MFS *in vitro*.

EJEMPLO 2. CURVA DE RESPUESTA A LA DOSIS DE ECULIZUMAB *IN VIVO*

A continuación se examinaron los beneficios del eculizumab *in vivo* en este modelo murino de síndrome de Guillain-Barré. Los ratones se inmunizaron pasivamente con anticuerpo anti-gangliósido o PBS (como control negativo), seguido de inyecciones concomitantes de NHS (intraperitoneal) y eculizumab (intravenoso) en cantidad de 0, 50, 100, 200, y 400 $\mu\text{g/ratón}$ en PBS. El complemento C3 se depositó abundantemente en la NMJ de todos los ratones que recibieron anticuerpo anti-gangliósido. Una dosis creciente de eculizumab da como resultado una reducción dependiente de la dosis en la deposición de MAC en la NMJ (FIG. 3A). El examen de la señal de neurofilamento demuestra la conservación de la integridad axonal en todas las dosis de eculizumab investigadas cuando se compara con control de línea de base tratado con PBS. (n=3 para cada dosis) (FIG. 3B).

EJEMPLO 3. ECULIZUMAB PROTEGE CONTRA NEUROPATÍA Y PARÁLISIS RESPIRATORIA EN UN MODELO DE MFS *IN VIVO*

Con el fin de determinar la eficacia *in vivo* de eculizumab, se generó un modelo de ratón de MFS *in vivo* mediante inyección intraperitoneal de anticuerpo anti-GQ1b CGM3 y NHS como fuente de complemento. A 16 h después de la inyección de CGM3, se administró sistémicamente una dosis de 200 μg de eculizumab o mAb de control, por la vena de la cola, seguido de la inyección intraperitoneal de 0,5 ml de NHS). Se aplicó el protocolo de diferentes vías de inyección de eculizumab y NHS para evitar la inhibición inmediata de C5 en el NHS por eculizumab dentro del confinamiento de la cavidad peritoneal. Los ratones tratados con CGM3, NHS y mAb de control (n=10) desarrollaron un aspecto general débil, en algunos casos una hiperlordosis, flancos abdominales invaginados y dificultades para respirar (jadeo) en 2 h tras la inyección de NHS. La inyección intravenosa de eculizumab evitó completamente el desarrollo de estos síntomas (n = 11). Se cuantificó la debilidad con la medida de la fuerza de agarre en los ratones tratados previamente con CGM3, antes y 2 h después de la inyección de mAb de control o eculizumab y NHS (FIG. 4A). Los ratones del grupo de control (n=5) tiraron con $56,0 \pm 5,7$ g justo antes de la inyección de mAb de control y NHS, mientras que los ratones del grupo de eculizumab (n=5) tiraron con $54,3 \pm 8,4$ g (p= 0,87) en esta etapa. La fuerza de tracción 2 h después de la inyección de mAb de control/NHS fue 22% menor ($43,7 \pm 4,5$ g; p<0,005). Eculizumab mejoró tal efecto (8% de reducción; p=0,07). La perturbación respiratoria se evaluó continuamente con pletismografía de cuerpo entero después de la inyección de mAb/NHS durante un periodo de 6 h (FIGs. 4B y 4C; n = 5 ratones por grupo). El volumen corriente antes de la inyección de CGM3 fue similar en ambos grupos ($0,21 \pm 0,01$ y $0,22 \pm 0,03$ ml en el grupo de mAb de control y eculizumab, respectivamente). Se observó una reducción de aproximadamente 50% (p<0,001) en el grupo de mAb de control a las 4 y 6 h después de la inyección de NHS. Tal disminución se evitó en gran medida por eculizumab (solamente hubo una reducción de 17% en estos puntos de tiempo, FIG. 4B). De manera similar, la frecuencia respiratoria se hundió en el grupo de mAb de control en aproximadamente 30% (p<0,01) a las 4 y 6 h después de la inyección de NHS. En el grupo de eculizumab, esta reducción fue sólo 7% (FIG. 4C). Ambos grupos de tratamiento mostraron una reducción inicial igual de alrededor de 40% de la frecuencia respiratoria cuando se midieron 2 h después de mAb/NHS, en comparación con la frecuencia antes de la inyección de GCM3, lo que aparentemente se debió al régimen de inyección intraperitoneal. Ejemplos de trazos de las señales respiratorias obtenidas se muestran en la FIG. 4D.

Las preparaciones de nervio frénico-hemidiafragma se disecaron a partir de ratones tratados con CGM3/NHS *in vivo* a las 4 h después de la inyección de NHS, y se llevaron a cabo medidas electrofisiológicas a las NMJs, experimentos de contracción muscular, y análisis inmunohistológicos detallados. La inspección visual indicó que solamente una parte muy pequeña de los músculos de los ratones tratados con mAb de control se contrajo con la estimulación eléctrica supramáxima del nervio frénico, en comparación con una contracción completa de los músculos obtenidos de los ratones tratados con eculizumab. En los experimentos de contracción *in vitro* en tejidos recolectados de

inmunizaciones pasivas, este efecto se cuantificó (FIGs. 4E y 4F). La sacudida y la tensión tetánica (40 Hz) fueron $0,07 \pm 0,06$ y $0,92 \pm 0,61$ g, respectivamente, en el grupo de mAb de control (n=4), mientras que en el grupo de eculizumab (n=4) estos fueron $1,36 \pm 0,29$ y $9,26 \pm 0,65$ g, respectivamente, igualando los valores de músculos de ratones con edad coincidente no tratados con NHS (no se muestran datos). Con el análisis electrofisiológico, analizamos si la parálisis era causada por disfunción de las NMJs. En músculos disecados del grupo de mAb de control, $66 \pm 7\%$ de las NMJs muestreadas habían sido "silenciadas", es decir, no había MEPPs detectables y ningún potencial de acción muscular con estimulaciones nerviosas. En el grupo de eculizumab, solamente $3 \pm 2\%$ habían sido "silenciadas" (FIGs. 4G y 4H; $p < 0,001$). El análisis inmunohistológico mostró que CGM3 se depositó igualmente en las NMJs de los dos grupos de tratamiento (no se muestran datos). Se identificaron depósitos de C3c en las NMJs de ambos grupos, aunque con una intensidad un poco menor en el grupo de eculizumab (FIGs. 5 A y 5D; $p < 0,001$). El MAC se depositó claramente en las NMJs de músculos de ratones tratados con mAb de control, pero estuvo virtualmente ausente en el grupo tratado con eculizumab (FIGs. 5B, 5D y 5E). Eculizumab evitó la pérdida de integridad de los terminales en las NMJs de ratones tratados con mAb de control, como se evidencia por la intensidad de señal de NF y el patrón que se extiende a la región de placa terminal, es decir, la ramificación axonal del terminal claramente permaneció intacta (FIGs. 5C y 5E). Además, la microscopía electrónica mostró la presencia de una ultraestructura presináptica bien conservada en las NMJs de ratones tratados con eculizumab en comparación con la de los ratones tratados con mAb de control, las cuales presentaron hinchazón de los terminales característica, agotamiento de vesícula sináptica y mitocondrias hinchadas (FIG. 5F) (O'Hanlon et al. Brain 124:893-906 (2001)). Estos datos electrofisiológicos, funcionales e inmunohistológicos muestran que la neuropatía motora de los terminales mediada por el complemento ocurre en nuestro modelo de MFS *in vivo*, y que la parálisis del diafragma contribuye a los déficits respiratorios observados. Mucho más importante, el tratamiento con eculizumab *in vivo* evitó efectivamente estos defectos neuropatológicos *in vivo*.

EJEMPLO 4. MÉTODOS

Ratones

Se obtuvieron ratones machos Balb/c (3-6 semanas de edad, 10-25 g) en Harlan (UK o NL). En algunos experimentos de contracción muscular (véase más adelante) se usaron ratones machos y hembras mutantes *nulos* en GM2/GD2 sintasa (Bullens et al. J. Neurosci. 22:6876-6884 (2002)) de 12-22 semanas de edad (19-37 g). Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del Ministerio del Interior del Reino Unido (UK PPL60/3096), las leyes holandesas y de la Universidad de Glasgow y Leiden.

Anticuerpos monoclonales y suero humano normal

El mAb IgM anti-gangliósido GQ1b, CGM3, se obtuvo de ratones inoculados con un lipooligosacárido de *Campylobacter jejuni* portador de GT1a (Goodyear et al. J. Clin. Invest 104:697-708 (1999)). CGM3 reacciona con gangliósidos GQ1b, GD3 y GT1a que comparten todos la estructura de disialilgalactosa terminal. Estudios previos han demostrado que CGM3 tiene especificidad similar por gangliósidos, e indujo efectos patógenos idénticos dependientes del complemento que los sueros con MFS humano (Goodyear et al. J. Clin. Invest 104:697-708 (1999)). La concentración de CGM3 se midió usando ELISA cuantitativa (Bethyl Laboratories, Texas, USA). Se tomó suero humano normal (NHS) de un lote de un solo donante que había sido congelado recientemente y almacenado en múltiples alícuotas a -70°C para conservar la actividad del complemento. Antes del uso experimental, CGM3 y NHS se dializaron durante 24 h a 4°C frente a disolución de Ringer (116 mM de NaCl, 4,5 mM de KCl, 1 mM de MgCl_2 , 2 mM de CaCl_2 , 1 mM de NaH_2PO_4 , 23 mM de NaHCO_3 , 11 mM de glucosa, pH 7,4), pre-gasificado con 95% de O_2 /5% de CO_2 . El mAb anti-C5 humano humanizado eculizumab y un mAb de control con isotipo coincidente no específico ALXN3300 se obtuvieron de Alexion Pharmaceuticals (Cheshire, USA) y se almacenaron a 4°C .

Modelo de MFS *in vitro*

El modelo *in vitro* para MFS usando CGM3 y NHS se ha descrito anteriormente (Goodyear et al. J Clin. Invest 104:697-708 (1999); O'Hanlon et al. Brain 124:893-906 (2001)). De manera resumida, se disecaron hemi-diafragmas de ratón con nervio frénico adjunto (o músculo triangular del esternón en algunos casos para inmunohistología ilustrativa de NMJ) y se montaron en medio de Ringer a temperatura ambiente ($20-22^{\circ}\text{C}$). Se retiraron secciones pequeñas de control no tratadas de cada preparación de músculo antes de cualquier incubación, y se congelaron súbitamente en hielo seco para análisis inmunohistológico de línea de base posterior. Los músculos se incubaron con CGM3 (50 $\mu\text{g/ml}$) durante 2-2,5 h a 32°C , después durante 30 min a 4°C y después se equilibraron durante 10 min a temperatura ambiente, se enjuagaron en medio de Ringer y posteriormente se expusieron a 33 ó 40% de NHS en medio de Ringer durante 1 h a temperatura ambiente. Eculizumab (100 $\mu\text{g/ml}$) o el mAb de control (100 $\mu\text{g/ml}$) se mezcló con NHS 10 min antes de la incubación de la preparación de músculo. Las medidas electrofisiológicas *in vitro* en la NMJ (véase más adelante) y la puntuación de sacudidas de fibras musculares, una característica distintiva de liberación incontrolada de transmisor en las NMJs en este modelo (Jacobs et al. Muscle Nerve 25:549-558 (2002); O'Hanlon et al. Brain 124:893-906 (2001)), se realizaron antes y después de la incubación de CGM3, y durante la incubación de NHS de 1 h. Se congelaron tiras de músculo en hielo seco y se almacenaron a -20°C , tanto antes como después de la incubación con NHS. Las NMJs y los axones de los terminales motores se evaluaron para determinar los niveles de IgM, C3c, MAC, NF y para determinar la viabilidad de pSC (véase más adelante).

Modelo de MFS *in vivo*

Se inyectaron peritonealmente ratones Balb/c (3-4 semanas de edad, 10-15 g) con 1,5 mg de CGM3, seguido 16 h después por una inyección intraperitoneal de 0,5 ml de 100% de NHS. Los ratones se observaron durante otras 4-6 h y se analizaron con pletismografía de cuerpo entero (véase más adelante), y se analizó la fuerza de agarre como se describió anteriormente (Kaja et al. Eur J. Neurosci 25:2009-2020 (2007)). Los ratones se sacrificaron después mediante asfixia con CO₂ y se disecó el tejido muscular del hemi-diafragma y se analizó en experimentos electrofisiológicos y de contracción muscular (véase más adelante), o se procesó adicionalmente para análisis inmunohistológicos (véase más adelante). El efecto de eculizumab sobre los síntomas *in vivo* y las lesiones electrofisiológicas, funcionales e histológicas analizadas posteriormente se sometieron a ensayo en este modelo inyectando 200 µg de eculizumab o mAb de control en la vena de la cola, muy poco antes de la inyección intraperitoneal de NHS. Los experimentos iniciales para hallar el intervalo de dosis (no se muestran datos) indicaron que eculizumab en dosis de >50 µg/ratón protegió contra neuropatía.

Pletismografía

Se empleó pletismografía de cuerpo entero no invasiva (EMMS, Hants, UK) para demostrar los cambios en los parámetros respiratorios en experimentos *in vivo*. Se recogieron datos de la línea de base antes del comienzo del experimento. Se inyectó a los ratones con CGM3, seguido de NHS con eculizumab o mAb de control 16 h más tarde (protocolo como anteriormente), y se vigilaron continuamente durante 6 h. Los parámetros de ritmo respiratorio obtenidos del flujo y el volumen corriente se recogieron de 25 respiraciones aceptadas y se promediaron en periodos de 1 h.

Análisis electrofisiológico *in vitro* de NMJs y puntuación visual de contractilidad muscular

Se disecaron hemi-diafragmas izquierdo y derecho con su nervio frénico adjunto y se clavaron en una cápsula forrada de caucho de silicona en 1,5 ml de medio de Ringer a temperatura ambiente. Se obtuvieron registros intracelulares de potenciales miniatura de placa terminal (MEPPs, los sucesos postsinápticos que surgen a partir de la liberación espontánea de cuantos de acetilcolina individuales del terminal nervioso motor presináptico) en las NMJs a 20-22°C. Las fibras musculares se empalaron cerca de la NMJ con un microelectrodo de vidrio de 10-20 MΩ lleno de KCl 3 M, conectado a un amplificador GeneClamp 500B (Axon Instruments/Molecular Devices, Union City, CA, USA) para amplificar y filtrar (10 KHz paso bajo) la señal. Las señales fueron digitalizadas, almacenadas y analizadas (fuera de línea) usando una interfaz Digidata 1322A, los programas Clampex 9.2 y Clampfit 9.2 (todos de Axon Instruments/Molecular Devices), Mini Analysis 6.0 (Synaptosoft, Fort Lee, USA) y rutinas programadas en Matlab (The Math Works Inc., Natick, MA, USA).

La aparición de sacudidas asincrónicas espontáneas de las fibras que son inducidas por una alta frecuencia de MEPP que resulta de daño presináptico mediado por CGM3/complemento (Plomp et al. Ann. Neurol. 45:189-199 (1999)) se puntuó visualmente cada 5 min (O'Hanlon et al. Brain 124:893-906 (2001)). El tejido se puntuó 0 para ninguna actividad, 1 para la sacudida de <10 fibras, 2 para una cantidad menor de sacudidas a lo largo del tejido, 3 para una cantidad moderada, y 4 para una cantidad amplia. Se calculó la puntuación promedio durante cada periodo de medición. El resultado final del daño presináptico mediado por CGM3/complemento es un silenciamiento de la transmisión sináptica en la NMJ. La cantidad de NMJs "silenciosas" (es decir, sin MEPPs detectables y aparición de potenciales de acción muscular provocados por la estimulación del nervio frénico) se expresó como porcentaje de la cantidad total de NMJs muestreadas (8-41) en un músculo en cada condición experimental.

Experimentos de contracción muscular

Se ensayó la eficacia protectora de eculizumab en la pérdida inducida por CGM3/NHS *in vitro* de la fuerza de contracción provocada por estimulación del nervio de la preparación de hemi-diafragma. Se usó diafragma de ratones mutantes nulos en GM2/GD2-sintasa debido a que estudios previos mostraron una sensibilidad un tanto mayor del músculo de esta cepa a la pérdida de contracción inducida por CGM3/NHS (Bullens et al. J. Neurosci. 22:6876-6884 (2002)). Las preparaciones de hemi-diafragma/nervio frénico izquierdo y derecho que se habían preincubado con 200 µg/ml de CGM3 durante 3 h a 32°C se montaron en una cápsula forrada con caucho de silicona de 2,25 ml de medio de Ringer a temperatura ambiente (20-22°C), burbujeado continuamente con 95% de O₂ / 5% de CO₂. El lado de la caja torácica del músculo se fijó cuidadosamente al fondo de la cápsula mediante múltiples alfileres pequeños, y el tendón central se conectó por medio de un gancho metálico y una cuerda a un transductor de fuerza que se conectó a un equipo amplificador y digitalizador, tal como se describió anteriormente (Kaja et al. Eur J. Neurosci 25:2009-2020 (2007)). Los estímulos supramáximos (usualmente ~10 V) de 100 µs de duración se suministraron cada 5 min durante 3 s a 40 Hz desde un estimulador programable Master-8 (AMPI, Jerusalén, Israel). Se ajustó la tensión básica con un control de vernier para obtener la fuerza máxima de contracción tetánica estimulada (usualmente alrededor de 10 g). Se monitorizó durante 30-50 min la estabilidad de la contracción producida. Posteriormente, el medio se reemplazó por NHS (33%), al cual se le había añadido eculizumab (3, 6, 9, 12, 25, 50 o 100 µg/ml) y se mezcló durante ~10 min antes de la adición y se monitorizó el efecto durante 100-200 min, bajo burbujeo suave continuo con 95% de O₂ / 5% de CO₂. En los experimentos de control sin eculizumab añadido, se añadieron 100 µg/ml del mAb de control al NHS. La amplitud de las contracciones

se midió fuera de línea con el cursor en el programa Clampfit 9.0 (Axon Instruments/Molecular Devices, Union City, USA), a los 2 s después del inicio de cada tren de estimulación nerviosa.

5 También se midieron las fueras de contracción tetánica y de sacudida con la estimulación nerviosa *in vitro* de los músculos del hemi-diafragma izquierdo que se disecaron a partir de ratones que habían sido sometidos al protocolo de MFS *in vivo*.

Análisis inmunohistológicos

10 Se montaron secciones de hemi-diafragma no fijadas en medio de montaje M-1 de Lipshaw (Pittsburgh, PA, USA), y se cortaron secciones criostáticas longitudinales (8-20 μm) en portaobjetos recubiertos con 3-aminopropiltrióxido-silano, se secaron al aire, después se almacenaron a -20°C . Para localizar las NMJs, se usaron TRITC y α -bungarotoxina marcada con Bodipy (α -BTx, diluida 1/750 hasta 1,3 $\mu\text{g/ml}$; Molecular Probes, Eugene, Oregon). El componente del complemento intermedio C3c se detectó mediante incubación con anti-C3c de conejo marcado con FITC (1/300; Dako, Ely, UK) durante 1 h a 4°C . El MAC se detectó usando anti-C5b-9 humano de ratón (1/50; Dako) seguido de IgG anti-ratón de cabra conjugado con FITC (1/300), ambos durante 1 h a 4°C .

15 Para la tinción de NF, secciones de tejido no fijadas se preincubaron durante 1 h a 4°C con α -BTx conjugada con TRITC, se enjuagaron, se sumergieron en etanol a -20°C durante 20 min, después se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con el suero policlonal de conejo 1211 (1/750; reactivo con NF fosforilado; Affiniti Research Products Ltd. Exeter, UK) seguido de IgG anti-ratón de cabra conjugado con FITC (1/300; Southern Biotechnology Associates) durante 3 h a 4°C . Todos los anticuerpos de detección se diluyeron con disolución salina tamponada con fosfato (PBS).

20 La viabilidad de pSC se evaluó usando EthD-1, un colorante no permeable de membrana que marca con fluorescencia roja los ácidos nucleicos de las células con membrana permeabilizada (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). En resumen, las preparaciones nervio-músculo se expusieron a Ringer que contenía 2 μM de EthD-1. El tejido se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 h, se enjuagó en disolución de Ringer y se congeló para inmunohistología. Las NMJs se identificaron en secciones criostáticas de 15 μm tiñéndolas con α -BTx conjugado con Bodipy (1,3 $\mu\text{g/ml}$), y se calculó el porcentaje de NMJs con núcleos positivos a EthD-1 en las NMJs.

25 Para ilustraciones, se incubaron músculos triangulares de esternón montados completos con CGM3 (50 $\mu\text{g/ml}$) y α -BTx conjugada con fluorocromo (TRITC/FITC/CYS) (2 $\mu\text{g/ml}$; 1:500), seguido de NHS mas eculizumab o mAb de control. Las preparaciones se incubaron con α -BTx conjugada fluorescentemente y diversas combinaciones de lo siguiente: anti-C5b-9 de ratón (1:40; Dako), anti-C3c-FITC (1:200; Dako), o EthD-1 (2 μM) en medio de Ringer durante 1 h a temperatura ambiente, se enjuagaron en medio de Ringer, seguido de fijación durante 20 min en 4% de formaldehído en PBS. Los grupos aldehído no reactivos se extinguieron, incubándolos con glicina 0,1 M durante 10 min. Los anticuerpos se volvieron a aplicar entonces en PBS y se agitaron toda la noche a temperatura ambiente. Para la tinción de antígenos intracelulares, el músculo se fijó en 4% de formaldehído durante 20 min, seguido de 30 min en glicina 0,1 M, y después se incubó en una disolución permeabilizante de 0,5% de Triton-X100 en PBS durante 30 min a temperatura ambiente, y anti-S100 de conejo (1:150; Dako) o anti-NF de conejo (1:150; Chemicon, Hampshire, UK) diluido en disolución permeabilizante aplicada toda la noche a temperatura ambiente. El tejido se aclaró en PBS y, cuando fue necesario, se incubó en los siguientes anticuerpos conjugados fluorescentemente diluidos 1:300; IgG anti-conejo-FITC, IgG anti-ratón-FITC o -TRITC, y se agitó durante 7 h a temperatura ambiente en la oscuridad. El tejido se aclaró en PBS y se montó en medio de montaje Citifluor (Citifluor Products, Canterbury, UK).

Captura de imágenes, cuantificación y análisis estadístico

30 Las imágenes digitales se capturaron usando microscopio de barrido por láser confocal Zeiss Pascal y Zeiss Axio Imager Z1 con ApoTome. Las medidas del análisis de imagen se obtuvieron usando el software de análisis de imagen Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA). Para el análisis cuantitativo de IgM, C3c, MAC y NF, se llevaron a cabo 3 experimentos de tinción de cada marcador en tejido procedente de al menos 3 hemi-diafragmas individuales, y se cuantificaron como se describió previamente (O'Hanlon et al. Brain 124:893-906 (2001)). Todos los estudios fueron desconocidos para el observador. Para el análisis inmunohistológico de datos no paramétricos, se realizaron comparaciones estadísticas usando la Prueba de Mann-Whitney empleando un nivel de significancia de 1%. Para la comparación de pSC positivas a EthD-1 en la NMJ, se usó la prueba de chi-cuadrado

45

50 con un nivel de significancia de 1%.

Referencias

1. Fisher, M. 1956. An unusual variant of acute idiopathic polyneuritis (syndrome of ophthalmoplegia, ataxia and areflexia). N. Engl. J. Med. 255:57-65.
2. Hughes, R.A. y Comblath, D.R. 2005. Guillain-Barre syndrome. Lancet 366:1653-1666.

3. Bowes,T., Wagner,E.R., Boffey,J., Nicholl,D., Cochrane,L., Benboubetra,M., Conner,J., Furukawa,K., Furukawa,K., y Willison,H.J. 2002. Tolerance to self gangliosides is the major factor restricting the antibody response to lipopolysaccharide core oligosaccharides in *Campylobacter jejuni* strains associated with Guillain-Barre syndrome. *Infect.Immun.* 70:5008-5018.
- 5 4. Goodyear,C.S., O'Hanlon,G.M., Plomp,J.J., Wagner,E.R., Mornson,I., Veitch,J., Cochrane,L., Bullens,R.W., Molenaar,P.C., Conner,J. et al. 1999. Monoclonal antibodies raised against Guillain-Barre syndrome-associated *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides react with neuronal gangliosides and paralyze muscle-nerve preparations. *J. Clin.Invest* 104:697-708.
- 10 5. Yuki,N. 2001. Infectious origins of, and molecular mimicry in, Guillain-Barre and Fisher syndromes. *Lancet Infect.Dis.* 1:29-37.
6. Willison, H.J. y O'Hanlon, G.M. 1999. The immunopathogenesis of Miller Fisher syndrome. *J.Neuroimmunol.* 100:3-12.
7. Ledeen,R.W. 1985. Gangliosides of the neuron. *Trends in Neurosciences* 8:169-174.
- 15 8. Chiba,A., Kusunoki,S., Obata,H., Machinami,R., y Kanazawa,I. 1993. Serum anti-GQ1b IgG antibody is associated with ophthalmoplegia in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barre syndrome: clinical and immunohistochemical studies. *Neurology* 43:1911-1917.
9. Buchwald,B., Weishaupt,A., Toyka,K.V., y Dudel,J. 1995. Immunoglobulin G from a patient with Miller-Fisher syndrome rapidly and reversibly depresses evoked quantal release at the neuromuscular junction of mice. *Neurosci.Lett.* 201:163-166.
- 20 10. Plomp, J.J., Molenaar,P.C., O'Hanlon,G.M., Jacobs,B.C., Veitch,J., Daha,M.R., Van Doorn,P.A., Van der Meche,F.G.A., Vincent,A., Morgan, B.P. et al. 1999. Miller Fisher anti-GQ1b antibodies: a-latrotoxin-like effects on motor end plates. *Ann.Neurol.* 45:189-199.
11. Roberts,M., Willison,H., Vincent,A., y Newsom-Davis,J. 1994. Serum factor in Miller-Fisher variant of Guillain-Barre syndrome and neurotransmitter release. *Lancet* 343:454-455.
- 25 12. Schwarz,A. y Futerman, A.H. 1996. The localization of gangliosides in neurons of the central nervous system: The use of anti-ganglioside antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes* 1286:247-267.
13. Lange,D.J., Deangelis,T., y Sivak,M.A. 2006. Single-fiber electromyography shows terminal axon dysfunction in Miller Fisher syndrome: a case report. *Muscle Nerve* 34:232-234.
- 30 14. Lo,Y.L., Leoh,T.H., Dan,Y.F., Lim,L.L., Seah,A., Fook-Chong,S., y Ratnagopal,P. 2006. Presynaptic neuromuscular transmission defect in the Miller Fisher syndrome. *Neurology* 66:148-149.
15. Sartucci,F., Cafforio,G., Borghetti,D., Domenici,L., Orlandi,G., y Murri,L. 2005. Electrophysiological evidence by single fibre electromyography of neuromuscular transmission impairment in a case of Miller Fisher syndrome. *Neurol.Sci.* 26:125-128.
- 35 16. Uncini,A. y Lugaesi,A. 1999. Fisher syndrome with tetraparesis and antibody to GQ1b: evidence for motor nerve terminal block. *Muscle Nerve* 22:640-644.
17. Wirguin,I., Ifergane,G., Almog,Y., Lieberman,D., Bersudsky,M., y Herishanu, Y.O. 2002. Presynaptic neuromuscular transmission block in Guillain-Barre syndrome associated with anti-GQ1b antibodies. *Neuromuscul.Disord.* 12:292-293.
- 40 18. Bullens, R.W., O'Hanlon,G.M., Goodyear,C.S., Molenaar,P.C., Conner,J., Willison,H.J., y Plomp,J.J. 2000. Anti-GQ1b antibodies and evoked acetylcholine release at mouse motor endplates. *Muscle Nerve* 23:1035-1043.
19. Halstead,S.K., O'Hanlon,G.M., Humphreys,P.D., Morrison,D.B., Morgan,B.P., Todd,A.J., Plomp, J.J., y Willison,H.J. 2004. Anti-disialoside antibodies kill perisynaptic Schwann cells and damage motor nerve terminals via membrane attack complex in a murine model of neuropathy. *Brain* 127:2109-2123.
- 45 20. Jacobs,B.C., Bullens,R.W., O'Hanlon,G.M., Ang,C.W., Willison,H.J., y Plomp,J.J. 2002. Detection and prevalence of alpha-latrotoxin-like effects of serum from patients with Guillain-Barre syndrome. *Muscle Nerve* 25:549-558.
- 50 21. O'Hanlon,G.M., Plomp, J.J., Chakrabarti,M., Morrison,I., Wagner,E.R., Goodyear,C.S., Yin,X., Trapp,B.D., Conner,J., Molenaar,P.C. et al. 2001. Anti-GQ1b ganglioside antibodies mediate complement-dependent destruction of the motor nerve terminal. *Brain* 124:893-906.

22. Hafer-Macko,C.E., Sheikh,K.A., Li,C.Y., Ho,T.W., Cornblath,D.R., McKhann,G.M., Asbury,A.K., y Griffin,J.W. 1996. Immune attack on the Schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann.Neurol.* 39:625-635.
- 5 23. Hartung,H.P., Schwenke,C., Bitter-Suermann,D., y Toyka,K.V. 1987. Guillain-Barre syndrome: activated complement components C3a and C5a in CSF. *Neurology* 37:1006-1009.
24. Koski,C.L., Sanders,M.E., Swoveland,P.T., Lawley,T.J., Shin,M.L., Frank,M.M., y Joiner,K.A. 1987. Activation of terminal components of complement in patients with Guillain-Barre syndrome and other demyelinating neuropathies. *J.Clin.Invest* 80:1492-1497.
- 10 25. Sanders,M.E., Koski,C.L., Robbins,D., Shin,M.L., Frank,M.M., y Joiner,K.A. 1986. Activated terminal complement in cerebrospinal fluid in Guillain-Barre syndrome and multiple sclerosis. *J.Immunol.* 136:4456-4459.
26. Halstead,S.K., Humphreys,P.D., Goodfellow,J.A., Wagner,E.R., Smith,R.A., y Willison,H.J. 2005. Complement inhibition abrogates nerve terminal injury in Miller Fisher syndrome. *Ann.Neurol.* 58:203-210.
- 15 27. Thomas,T.C., Rollins,S.A., Rother,R.P., Giannoni,M.A., Hartman,S.L., Elliott,E.A., Nye,S.H., Matis,L.A., Squinto,S.P., y Evans,M.J. 1996. Inhibition of complement activity by humanized anti-C5 antibody and single-chain Fv. *Mol.Immunol.* 33:1389-1401.
28. Ramaglia,V., King,R.H., Nourallah,M., Wolterman,R., de Jonge,R., Ramkema,M., Vigar,M.A., van der,W.S., Morgan,B.P., Troost,D. et al. 2007. The membrane attack complex of the complement system is essential for rapid Wallerian degeneration. *Neurosci.* 27:7663-7672.
- 20 29. Hillmen,P., Young,N.S., Schubert,J., Brodsky,R.A., Socie,G., Muus,P., Roth,A., Szer,J., Elebute,M.O., Nakamura,R. et al. 2006. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N.Engl.J.Med.* 355:1233-1243.
30. Morgan,B.P. 1989. Mechanisms of tissue damage by the membrane attack complex of complement. *Complement Inflamm.* 6:104-111.
- 25 31. Susuki,K., Rasband,M.N., Tohyama,K., Koibuchi,K., Okamoto,S., Funakoshi,K., Hirata,K., Baba,H., y Yuki,N. 2007. Anti-GM1 antibodies cause complement-mediated disruption of sodium channel clusters in peripheral motor nerve fibers. *J.Neurosci.* 27:3956-3967.
32. Putzu,G.A., Figarella-Branger,D., Bouvier-Labit,C., Liprandi,A., Bianco,N., y Pellissier,J.F. 2000. Immunohistochemical localization of cytokines, C5b-9 and ICAM-1 in peripheral nerve of Guillain-Barre syndrome. *J.Neurol.Sci.* 174:16-21.
- 30 33. Hill,A., Richards,S.J., y Hillmen,P. 2007. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br.J.Haematol.* 137:181-192.
34. van Koningsveld,R., Steyerberg,E.W., Hughes,R.A., Swan,A.V., Van Doorn,P.A., y Jacobs,B.C. 2007. A clinical prognostic scoring system for Guillain-Barre syndrome. *Lancet Neurol.* 6:589-594.
- 35 35. Morgan,B.P., Chamberlain-Banoub,J., Neal,J.W., Song,W., Mizuno,M., y Harris,C.L. 2006. The membrane attack pathway of complement drives pathology in passively induced experimental autoimmune myasthenia gravis in mice. *Clin.Exp.Immunol.* 146:294-302.
36. Rice,C.E. 1950. The interchangeability of the complement components of different animal species; literature survey. *Can.J.Comp Med. Vet.Sci.* 14:369-379.
- 40 37. Bullens,R.W., O'Hanlon,G.M., Wagner,E., Molenaar,P.C., Furukawa,K., Furukawa,K., Plomp,J.J., y Willison,H.J. 2002. Complex gangliosides at the neuromuscular junction are membrane receptors for autoantibodies and botulinum neurotoxin but redundant for normal synaptic function. *J.Neurosci.* 22:6876-6884.
38. Kaja,S., van de Ven,R.C., van Dijk,J.G., Verschuuren,J.J., Arahata,K., Frants,R.R., Ferrari,M.D., van den Maagdenberg,A.M., y Plomp,J.J. 2007. Severely impaired neuromuscular synaptic transmission causes muscle weakness in the Cacnal a-mutant mouse rolling Nagoya. *Eur J.Neurosci* 25:2009-2020.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo para uso en el tratamiento de síndrome de Guillain-Barré en un mamífero, en el que dicho anticuerpo se une a:
- 5 (i) el componente del complemento C5 e inhibe la escisión de C5 en fragmentos C5a y C5b; o
(ii) C5b,
- en el que dicho anticuerpo inhibe la formación del complejo de ataque a membrana.
2. El anticuerpo para uso según la reivindicación 1, en el que dicho mamífero tiene la variante de Miller Fisher del síndrome de Guillain-Barré.
- 10 3. El anticuerpo para uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo completo o un fragmento de anticuerpo.
- 15 4. El anticuerpo para uso según la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo completo o fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo policlonal, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo monoclonal, un diacuerpo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo quimerizado o quimérico, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humano desinmunizado, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo totalmente humano, un anticuerpo monocatenario, un fragmento de anticuerpo Fv, un fragmento de anticuerpo Fab, un fragmento de anticuerpo Fab', y un fragmento de anticuerpo F(ab')₂.
5. El anticuerpo para uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho anticuerpo es eculizumab.
6. El anticuerpo para uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho anticuerpo es pexelizumab.
- 20 7. El anticuerpo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el mamífero es un ser humano.

Figura 1

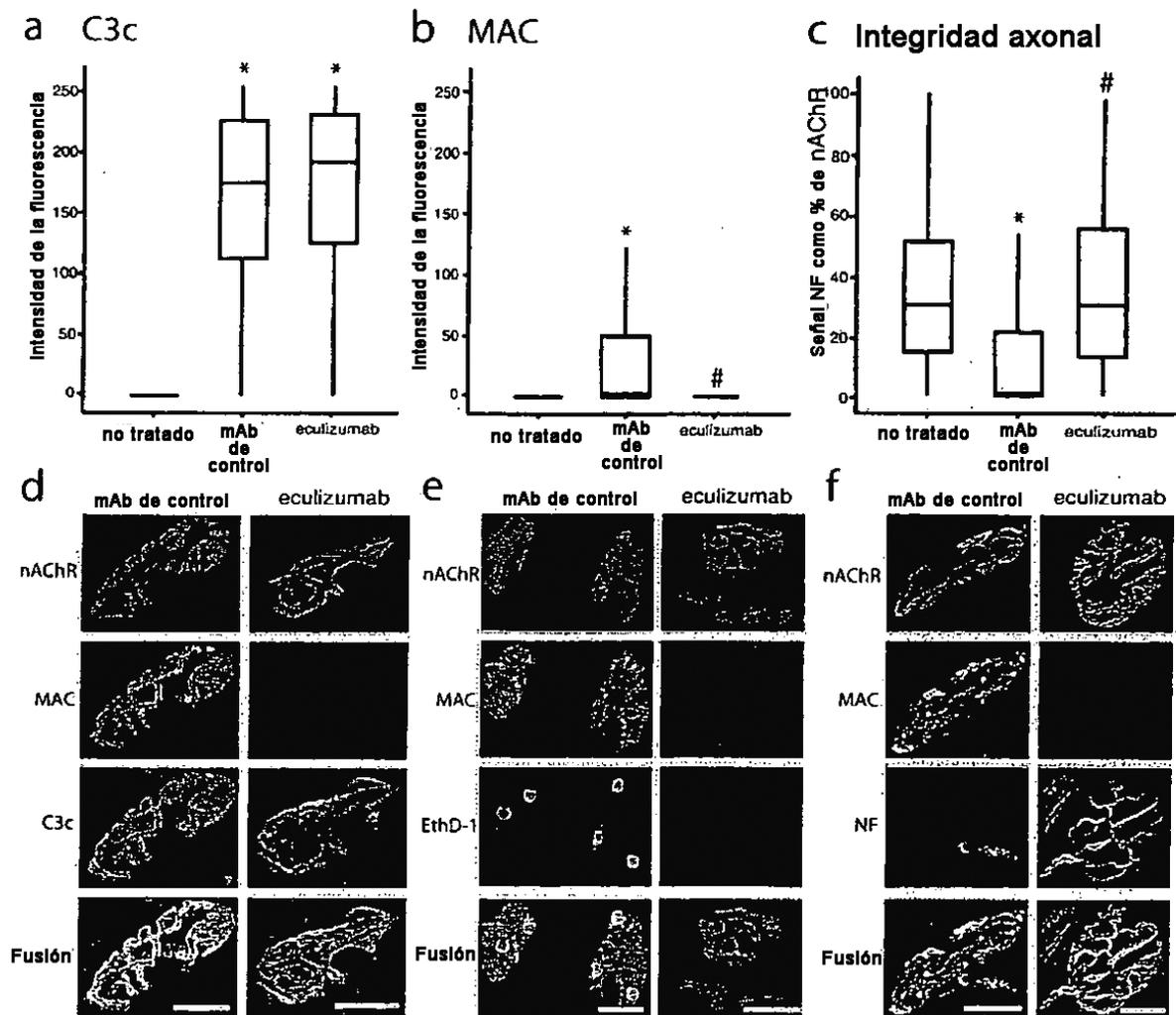


Figura 2

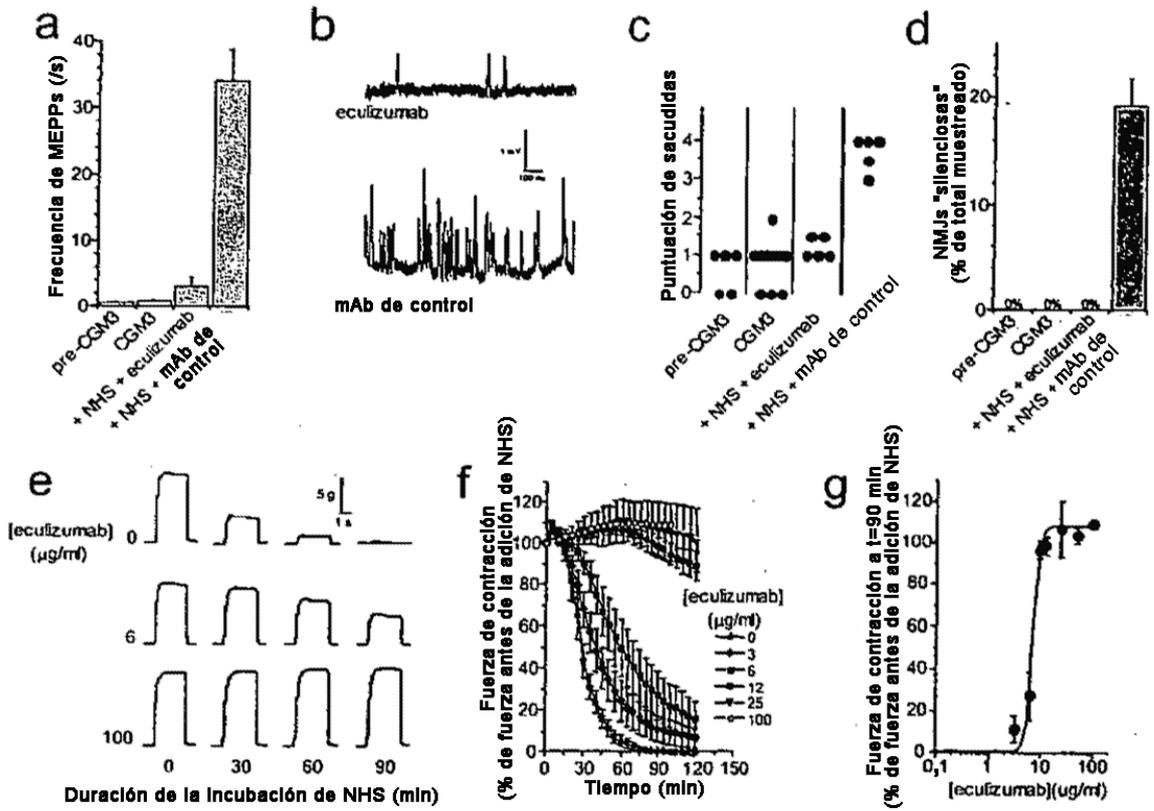


Figura 3A

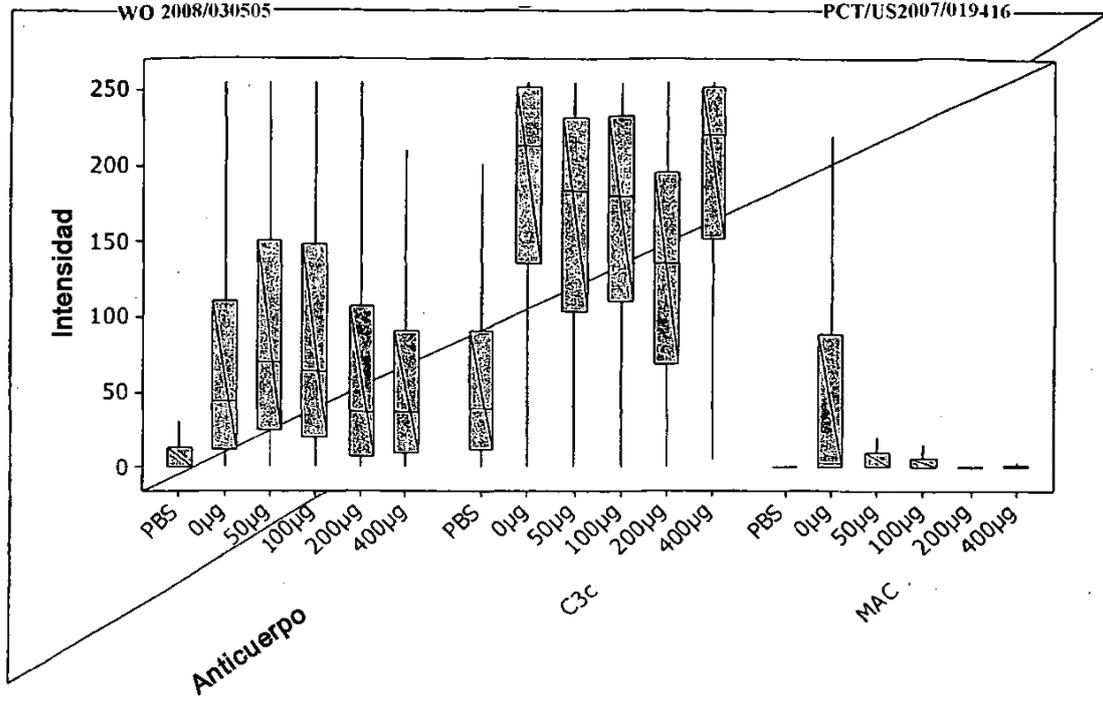


Figura 3B

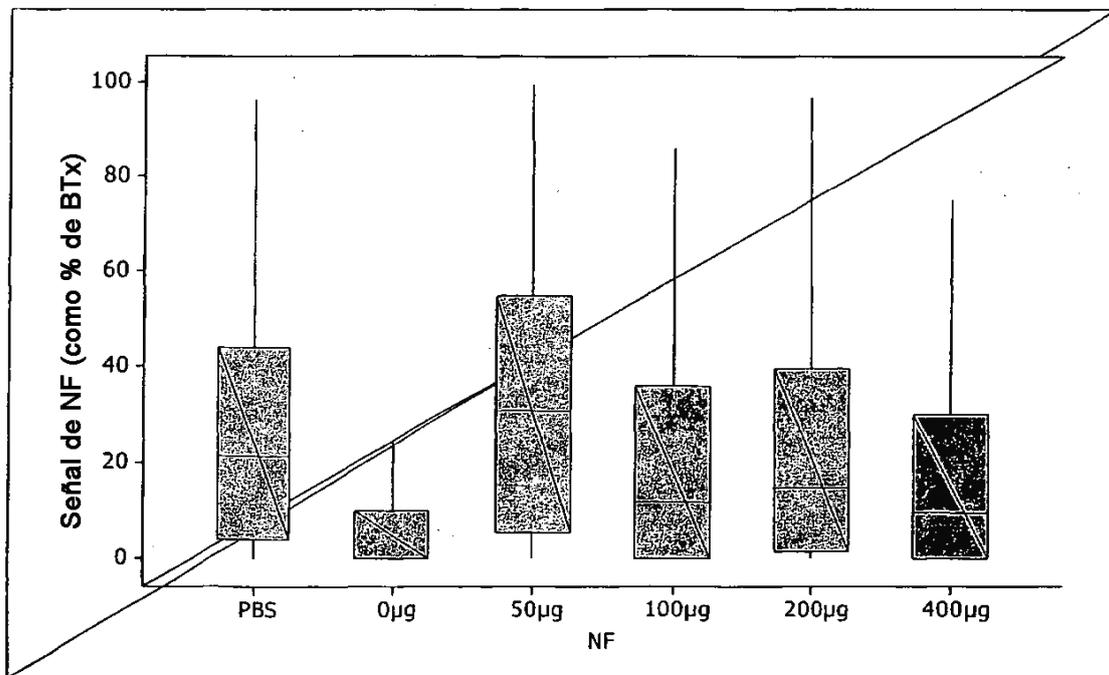


Figura 4

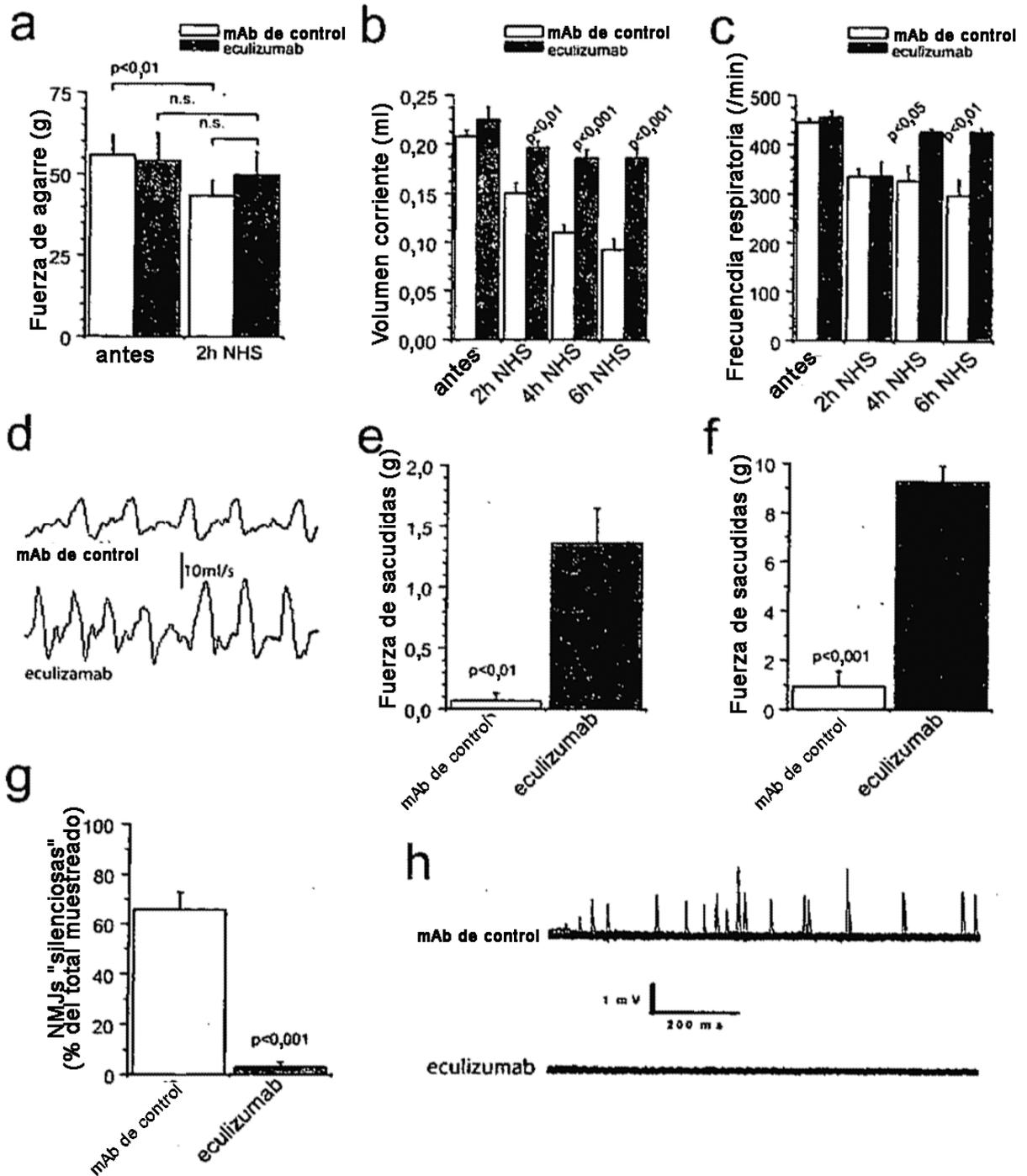


Figura 5

