

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 700**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2006** **E 06771303 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015** **EP 1885398**

54 Título: **Inhibición de la vía alternativa del complemento para el tratamiento de lesión cerebral traumática, lesión de médula espinal y afecciones relacionadas**

30 Prioridad:

26.05.2005 US 685289 P

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

20.10.2015

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
COLORADO, A BODY CORPORATE (50.0%)
1800 Grant Street, 8th Floor
Denver, CO 80203, US y
MUSC FOUNDATION FOR RESEARCH
DEVELOPMENT (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HOLERS, VERNON MICHAEL;
THURMAN, JOSHUA M.;
TOMLINSON, STEPHEN y
STAHEL, PHILIP F.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 548 700 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibición de la vía alternativa del complemento para el tratamiento de lesión cerebral traumática, lesión de médula espinal y afecciones relacionadas

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a métodos de tratamiento del daño físico que resulta de lesión cerebral traumática, lesión de médula espinal o afecciones relacionadas, inhibiendo selectivamente la vía alternativa del complemento y, en una realización particular, inhibiendo el factor B.

10

Antecedentes de la invención

La activación del complemento se produce principalmente mediante tres vías: la llamada vía clásica, la vía de la lectina y la vía alternativa. Las proteínas clave implicadas en la activación de la vía alternativa son el factor B (fB) y el factor D (fD). Estas proteínas funcionan en concierto para iniciar y/o para amplificar la activación de C3, que a continuación causa el inicio de una serie de eventos inflamatorios. Una tercera proteína, la properdina, estabiliza el complejo de C3 y el factor B pero no se requiere en absoluto para que la vía alternativa funcione. El factor B también ayuda a solubilizar complejos inmunitarios, se ha descrito que actúa como un factor de crecimiento de células B y puede activar monocitos (Takahashi, 1980; Hall, 1982; Peters, 1988). Se han generado ratones deficientes en factor B (ratones *fB*^{-/-}) y la respuesta del anticuerpo IgG1 a antígenos dependientes de células T y la sensibilidad a choque endotóxico parecen normales en estos ratones (Matsumoto, 1997).

15

20

La vía alternativa del complemento es iniciada habitualmente por bacterias, parásitos, virus u hongos, aunque también se ha descrito que anticuerpos de IgA y ciertas cadenas L de Ig activan esta vía. La activación de la vía alternativa se inicia cuando el factor B circulante se une a C3 activado (C3b o C3H₂O). Este complejo es escindido a continuación por el factor D circulante para dar un fragmento enzimáticamente activo, C3bBb. C3bBb escinde C3 generando C3b, que impulsa la inflamación y también amplifica adicionalmente el proceso de activación, generando un bucle de retroalimentación positiva. Ambos componentes (factor B y factor D) se requieren para permitir la activación de la vía alternativa.

25

30

Recientes estudios han demostrado que la vía alternativa del complemento desempeña un importante papel en la patogenia de varios modelos de enfermedad en animales. Por ejemplo, la activación del complemento en el riñón después de lesión por isquemia-reperfusión (I/R) está mediada casi exclusivamente por la vía alternativa (Thurman et al., 2003, J Immunol 170: 1517-1523), y la vía alternativa desempeña un papel crítico en el desarrollo de artritis inflamatoria. Quizás de la forma más sorprendente, se ha demostrado que los ratones deficientes en la vía alternativa están protegidos de nefritis en el modelo MRL/lpr de nefritis lúpica (Watanabe et al., 2000, J Immunol 164: 786-794) y de pérdida fetal mediada por anti-fosfolípidos (Girardi et al., 2003, J Clin Invest 112: 1644-1654), modelos que tradicionalmente se habría supuesto que estaban mediados por la vía clásica del complemento. Además, Nataf et al., ha demostrado que, en un modelo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), en ratones tanto C3^{-/-} como factor B^{-/-}, había poca infiltración del parénquima por macrófagos y células T y, en comparación con los miembros de su misma camada de tipo silvestre, el sistema nervioso central (SNC) de ratones tanto C3^{-/-} como factor B^{-/-} inducidos para EAE están protegidos de desmielinización (Nataf et al., 2000, J. Immunol. 165: 5867-5873). Estudios posteriores de patología autoinmunitaria en ratones C4^{-/-} en el modelo de EAE demostraron que la delección del gen C4 no cambia significativamente el tiempo de aparición o la gravedad y el ritmo de desarrollo de EAE inducida por oligodendrocitos y mielina en comparación con controles con un sistema del complemento totalmente intacto, indicando que la contribución del complemento murino a la patogenia de enfermedad desmielinizante se realiza mediante la vía alternativa (Boos et al., 2005, Glia 49: 158-160).

35

40

45

La lesión cerebral traumática (también denominada en el presente documento como LCT) es una afección con efectos muy perjudiciales sobre la salud de un individuo que actualmente no tiene ningún tratamiento eficaz. La activación del complemento ha demostrado estar implicada en el desarrollo de daño cerebral después de LCT (Bellander et al., 2001, J. Neurotrauma 18: 1295-1311; Kaczorowski et al., 1995, J. Cereb. Blood Flow Metab. 15: 860-864; Keeling et al., 2000, J. Neuroimmunol. 105: 20-30; Schmidt et al., 2004, Eur. J. Trauma 30: 135-149; Nataf et al., 1999, Trends Neurosci 22: 397-402; Stahel et al., 1998, Brain Res. Rev. 27: 243-256; Stahel et al., 2001, J. Neurotrauma 18: 773-781; Van Beek et al., 2003, Ann NY Acad Sci 992: 56-71; Rancan et al., 2003, J. Cereb. Blood Flow & Metab. 23: 1070-1074). Sin embargo, estos estudios se han centrado en los efectos de la cascada del complemento en un punto donde las tres vías que activan el complemento convergen, tal como en C3 (véase, por ejemplo, Rancan et al., 2003, *ibid.*). Por lo tanto, antes de la presente invención, no ha habido informes que mostraban si una de las vías del complemento es preferente o exclusivamente activada como resultado de LCT, o se requiere para desarrollar LCT.

50

55

60

El objetivo inmediato en la atención de pacientes con lesión en la cabeza es la prevención de daño cerebral secundario mediante la rápida corrección de la hipotensión, hipoxemia, hipercarbia e hipoglucemia. La prioridad principal en la atención temprana de pacientes con traumatismo craneal es el mantenimiento de una presión de perfusión cerebral (PPC) adecuada, que debería estar por encima de 70-80 mmHg. Diferentes estrategias

65

terapéuticas tienen como objetivo rebajar la presión intracraneal (PIC) para mantener una PPC adecuada. Entre las modalidades terapéuticas están: la reducción de lesiones masivas mediante evacuación quirúrgica de hematomas intracraneales, la reducción de la tumefacción cerebral con fármacos osmóticos (por ejemplo, manitol), y el drenaje terapéutico de líquido cefalorraquídeo (LCR) a través de catéteres intraventriculares. Los pacientes con LCT grave son transferidos a la unidad de cuidados intensivos (UCI) a la mayor brevedad y son tratados de acuerdo con protocolos estandarizados. Los objetivos de la terapia en la UCI incluyen: consecución y mantenimiento de intercambio de gases y estabilidad circulatoria adecuados, prevención de hipoxemia e hipercarbia, exploraciones por tomografía computarizada (TC) programadas, repetidas para detección de patología intracraneal secundaria retardada, sedación profunda y analgesia para evitar estrés y dolor, consecución y mantenimiento de PPC óptima (> 70 mmHg) y equilibrio del oxígeno cerebral, evitación de hipertermia (< 38°C), prevención de hiperglucemia e hiponatremia, elevación de la cabeza realizada de forma no rutinaria, prevención de úlceras por estrés y mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal, y profilaxis para factores de complicación (por ejemplo, neumonía o meningitis). En el caso de PIC elevada (> 15 mmHg, > 5 minutos), los pacientes pueden ser tratados (1) profundizando la sedación, analgesia, relajación muscular; (2) drenaje de LCR a través de catéteres ventriculares; (3) hiperventilación moderada (en ciertas circunstancias); (4) osmotherapia; (5) hipotermia moderada (\pm 34°C); y (6) coma inducido por barbitúricos.

La lesión de médula espinal (también denominada en el presente documento como LME) es también una afección del sistema nervioso central con efectos muy perjudiciales sobre la salud de un individuo que actualmente no tiene ningún tratamiento eficaz. La activación del complemento ha demostrado estar implicada en el desarrollo de daño después de LME (Anderson et al., 2004, *J Neurotrauma* 21(12): 1831-46; Reynolds et al., 2004, *Ann N Y Acad Sci* 1035: 165-78; Rebhun et al., 1991, *Ann Allergy* 66(4): 335-8). Sin embargo, como con LCT, estos estudios se han centrado en los efectos de la cascada del complemento en un punto donde las tres vías que activan el complemento convergen, o han sugerido un papel para todas las vías del complemento posterior a LME. Por lo tanto, antes de la presente invención, no ha habido informes que mostraban si una de las vías del complemento es preferente o exclusivamente activada como resultado de LME, o se requiere para desarrollar LME.

La LME se define, en general, como daño a la médula espinal que da como resultado una pérdida de función, tal como movilidad o sensación. Las causas frecuentes del daño son traumatismo (por ejemplo, mediante accidente de automóvil, disparo, caídas, etc.) o enfermedad (polio, espina bífida, Ataxia de Friedreich, etc.). La médula espinal no tiene que ser cortada para que se produzca una pérdida de funcionalidad. De hecho, en la mayoría de los individuos con LME, la médula espinal está intacta, pero el daño a ésta da como resultado la pérdida de función. Además de una pérdida de sensación o de la función motora, los individuos con LME también pueden padecer disfunción del intestino y la vejiga, disfunción sexual y de la fertilidad, incapacidad para regular la presión sanguínea de manera eficaz, control reducido de la temperatura corporal, incapacidad de sudar por debajo del nivel de la lesión, y dolor crónico. Las lesiones muy altas (C-1, C-2) pueden dar como resultado una pérdida de muchas funciones involuntarias incluyendo la capacidad de respirar, necesitando ayudas para respirar tales como respiradores mecánicos o marcapasos diafragmáticos.

Actualmente no existe ninguna cura para LME. El objetivo inmediato en la atención de pacientes de LME se centra en reducir el daño lo más pronto posible después de que se produce la lesión. Los fármacos esteroideos tales como metilprednisolona reducen la tumefacción, que es una causa común de daño secundario en el momento de la lesión. Existen varios tipos de tratamiento a corto plazo para una lesión de médula espinal. En primer lugar, la columna en la zona de la médula espinal lesionada es inmovilizada para prevenir lesiones adicionales a la médula (por ejemplo, usando collarines cráneo-cervicales (halos), escayolas, inmovilizadores y correas). Para reducir la tumefacción en la médula espinal causada por la lesión, habitual se administra medicación esteroidea durante las primeras 24 horas después de la lesión, aunque la estrategia más típica es administrar medicación esteroidea a aquellos pacientes con déficits neurológicos y una ventana temporal de inicio de terapia dentro el plazo de menos de 8 horas después del traumatismo (Bracken, 2001, *Spine* 26(24S): S47-S54). A menudo es necesario otro tratamiento médico, dependiendo de complicaciones que pudieran desarrollarse. Debido a que la lesión traumática a la médula espinal habitualmente implica una lesión de los huesos y ligamentos de la columna, puede realizarse cirugía. El objetivo de algunas cirugías es extirpar hueso (descompresión) que está presionando sobre o dentro de la médula espinal, o estabilizar o realinear la columna en la zona de la lesión de médula espinal cuando las vértebras o los ligamentos han resultado dañados. Pueden fijarse barras o jaulas y tornillos de metal a vértebras normales para impedir el movimiento de vértebras fracturadas y las vértebras pueden "fusionarse" entre sí usando injerto óseo por la misma razón. El estiramiento de la columna usando pesos y poleas (llamado tracción) también puede ayudar con el alineamiento de la columna.

A pesar de los protocolos para el tratamiento de pacientes con LCT, las potenciales complicaciones a partir de terapia de LCT pueden incluir: vasoespasmos cerebrales o descenso de presión cardiovascular, hepatotoxicidad, inmunodepresión e incidencia incrementada de infecciones pulmonares. Además, aunque los tratamientos para LME pueden proporcionar modestas reducciones del daño fisiológico, muchos protocolos son principalmente útiles para ayudar a reducir la probabilidad de daño adicional y para estabilizar al paciente. Ni un solo protocolo ha demostrado ser completamente satisfactorio para inhibir el desarrollo del daño fisiológico que resulta de LCT o LME. Por lo tanto, existe una necesidad actual en la técnica de procesos y reactivos terapéuticos que tengan menos toxicidad y más especificidad por la causa subyacente del daño resultante de LCT y LME.

Sumario de la invención

- La presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso en la reducción o prevención de al menos un síntoma de daño fisiológico que resulta de lesión cerebral traumática (LCT) en un animal o mejorar la recuperación de LCT o LME en el animal, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une selectivamente a e inhibe la actividad del factor B, el factor D o properdina, tal como se reivindica en lo sucesivo en el presente documento. Realizaciones preferidas de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes.
- En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une selectivamente al factor B dentro del tercer dominio de la repetición consenso corta (SCR), en el que el anticuerpo previene la formación de un complejo C3bBb. En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une al factor B y previene o inhibe la escisión del factor B por el factor D. En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se unen al tercer dominio de la repetición consenso corta (SCR) de factor B humano. En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une selectivamente a un epítipo en el tercer dominio de la SCR del factor B seleccionado entre: (a) un epítipo del factor B que incluye al menos una sección del factor B humano (SEC ID N° 2) que comprende de aproximadamente la posición Tyr139 a aproximadamente la posición Ser185, o posiciones equivalentes a éstas en una secuencia de factor B no humano; (b) un epítipo del factor B que incluye al menos una sección del factor B humano (SEC ID N° 2) que comprende de aproximadamente la posición Tyr139 a aproximadamente la posición Ser141, o posiciones equivalentes a éstas en una secuencia de factor B no humano; (c) un epítipo del factor B que incluye al menos una sección del factor B humano (SEC ID N° 2) que comprende de aproximadamente la posición Glu182 a aproximadamente la posición Ser185, o posiciones equivalentes a éstas en una secuencia de factor B no humano; y/o (d) un epítipo del factor B que incluye al menos una sección del factor B humano (SEC ID N° 2) que comprende una o más cualesquiera de las siguientes posiciones o sus posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano: Tyr139, Cys 140, Ser141, Glu182, Gly184 o Ser185. En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une selectivamente a un epítipo en el tercer dominio de la SCR del factor B (SEC ID N° 2) que comprende una o más de las siguientes posiciones de aminoácidos o sus posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano: Ala137, Tyr139, Ser141, Glu182, Ser185, Thr189, Glu190 y Ser192. En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une selectivamente a un epítipo en el tercer dominio de la SCR del factor B (SEC ID N° 2) que comprende o que consta de las siguientes posiciones de aminoácidos o sus posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano: Ala137, Tyr139, Ser141, Glu182, Ser185, Thr189, Glu190 y Ser192. En otro aspecto más, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une selectivamente a un epítipo no lineal dentro de la estructura tridimensional de una sección del tercer dominio de la SCR del factor B, en la que la sección está definida por al menos las posiciones de aminoácidos Ala137-Ser192 de la SEC ID N° 2. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede unirse selectivamente al factor B de múltiples especies de mamífero y previene la formación de un complejo C3bBb. En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une selectivamente a factor B de ser humano y un animal seleccionado entre el grupo constituido por primate no humano, ratón, rata, cerdo, caballo y conejo. Para cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente, el anticuerpo puede incluir, aunque sin limitarse a, un anticuerpo de un isotipo o subclase que no activa al complemento, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico y/o un anticuerpo monovalente. En un aspecto, el fragmento de unión al antígeno es un fragmento Fab. En un aspecto preferido de la invención, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 1379 (producido por el N° de Depósito de la ATCC PTA-6230), o un fragmento de unión al antígeno del mismo.
- En los usos relacionados con LCT, en una realización preferida, el agente es administrado por vía intravenosa o al cerebro del animal. En los usos relacionados con LME, en una realización preferida, el agente es administrado por vía intravenosa o a la médula espinal o al espacio epidural de la médula espinal del animal. El agente es preferentemente administrado al animal en una cantidad eficaz para reducir de forma medible al menos un síntoma de daño fisiológico que resulta de LCT o LME en el animal en comparación con en ausencia de administración del agente. Con respecto a LCT, en un aspecto, el agente es administrado en una cantidad eficaz para mantener una presión de perfusión cerebral (PPC) de por encima de 70-80 mmHg, o en una cantidad eficaz para rebajar la presión intracraneal (PIC). Con respecto a LME, en un aspecto, el agente es administrado en una cantidad eficaz para reducir la tumefacción en la médula espinal. En un aspecto, el agente es administrado en un portador farmacéuticamente aceptable, que incluye, aunque sin limitarse a, un compuesto o composición que es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y/o un excipiente inyectable.
- En un aspecto de cualquiera de los usos descritos anteriormente relacionados con LCT, existe una etapa adicional de administrar al animal otro compuesto para tratar un síntoma de LCT seleccionado entre el grupo constituido por: una deficiencia física, una deficiencia cognitiva y una deficiencia psicosocial-conductual-emocional. Dicho compuesto puede incluir, aunque sin limitarse a, un fármaco osmótico, un sedante, un analgésico, un relajante muscular y/o un barbitúrico.
- En un aspecto de cualquiera de los usos descritos anteriormente relacionados con LME, existe una etapa adicional de administrar un esteroide al animal.

En cualquiera de los usos descritos anteriormente, es animal es preferentemente un mamífero, incluyendo, aunque sin limitarse a, un ser humano.

5 Otra realización de la presente invención se refiere a una composición para uso en la reducción o prevención de un síntoma de lesión cerebral traumática (LCT) o lesión de médula espinal (LME) en un animal o para mejorar la recuperación de LCT o LME en un animal, en la que la composición comprende: (a) un primer agente seleccionado entre el grupo constituido por un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une selectivamente a e inhibe la actividad del factor B, el factor D o properdina; y (b) un segundo agente para uso en el tratamiento de un síntoma de lesión cerebral traumática (LCT) o LME. El segundo agente puede ser un compuesto para tratar un síntoma de LCT seleccionado entre: una deficiencia física, una deficiencia cognitiva y/o una deficiencia psicosocial-conductual-emocional. El segundo agente puede seleccionarse entre el grupo constituido por: un fármaco osmótico, un sedante, un analgésico, un relajante muscular y un barbitúrico.

10 (a) un primer agente seleccionado entre: un anticuerpo aislado, un fragmento de unión al antígeno del mismo, y/o un polipéptido de unión al antígeno, en el que el primer agente inhibe selectivamente la expresión o actividad biológica de una proteína en la vía alternativa del complemento; y (b) el segundo agente puede ser un compuesto para tratar un síntoma de lesión de médula espinal (LME). El segundo agente puede ser un esteroide.

20 Breve descripción de las figuras

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

25 La figura 2A es un gráfico lineal que muestra que el anti-factor B inhibía completamente la vía alternativa del complemento en un ensayo con cimosano cuando se añadieron 3 µg a una reacción que contenía 10 µl de suero.

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

30 La figura 3 es un gráfico lineal que muestra que la administración de anti-factor B a ratones inhibe la vía alternativa del complemento.

35 La figura 4 es un dibujo esquemático que muestra un modelo del mapeo epitópico para mAb1379 en la superficie del factor B humano.

La figura 5 es un dibujo esquemático que muestra un complejo modelizado de mAB1379 (un fragmento Fab) que se une al factor B, con los lados de unión al antígeno del Fab habiendo sido modelizado para cubrir toda la región epitópica mapeada.

40 La figura 6 es un gráfico lineal que muestra que Crry-Ig inhibe la deficiencia neurológica después de LCT.

La figura 7 es un gráfico lineal que muestra que Crry-Ig inhibe la pérdida de peso después de LCT.

45 La figura 8 es un diagrama de barras que muestra que la administración de anti-Factor B (mAb 1379) reduce el daño cerebral asociado con LCT.

La figura 9 es un gráfico lineal que muestra que la administración de anti-factor B (mAb 1379) mejora la recuperación de lesión de médula espinal.

50 La figura 10 es un gráfico que muestra que niveles elevados de C5a en suero de ratones C57BL/6 (fB+/+) con lesión cerebral son atenuados significativamente en ratones deficientes en el gen del factor B (fB-/-) que carecen de una vía alternativa del complemento funcional.

55 La figura 11 es una imagen digital de una transferencia de Western que muestra la regulación positiva del mediador anti-apoptótico Bcl-2 en suero y cerebros de ratones fB-/- después de lesión cerebral traumática (LCT), según lo determinado mediante análisis por transferencia de Western.

60 La figura 12 es una imagen digital que muestra muerte celular neuronal atenuada en el hemisferio lesionado de ratones deficientes en el gen del factor B, 4 horas después de traumatismo craneal cerrado.

La figura 13 es una imagen digital que muestra muerte celular neuronal atenuada en el hemisferio lesionado de ratones deficientes en el gen del factor B, 24 horas después de traumatismo craneal cerrado.

65 La figura 14 es una imagen digital que muestra muerte celular neuronal atenuada en el hemisferio lesionado de ratones deficientes en el gen del factor B, 7 días después de traumatismo craneal cerrado.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere, en general, al descubrimiento de los inventores de que la activación de la cascada del complemento a través de la vía alternativa es necesaria para la inducción de daño fisiológico debido a lesión cerebral traumática (LCT), y que la inhibición de la vía alternativa del complemento es suficiente para reducir el daño (o mejorar la recuperación) resultante de LCT o lesión de médula espinal (LME). Más particularmente, los inventores de la presente invención desvelan en el presente documento el descubrimiento de que la inhibición de la vía alternativa inhibe el daño fisiológico (por ejemplo, daño cerebral) en un modelo experimental de LCT, y también inhibe el daño (medido mediante recuperación mejorada) en un modelo experimental de LME. Por consiguiente, la presente invención se refiere a compuestos, composiciones y el uso de dichos compuestos o composiciones en método para la prevención y/o el tratamiento de LCT, LME u otro daño neuronal o cerebral, a través de la inhibición selectiva de la vía alternativa del complemento.

En primer lugar, los inventores de la presente invención han demostrado por primera vez un papel fundamental de la vía alternativa de activación del complemento en la contribución al alcance global de activación postraumática del complemento y a muerte celular neuronal secundaria después de lesión cerebral. Además, los inventores han demostrado que la inhibición específica de la vía alternativa del complemento por inhibición del factor B, además de la inhibición general de la vía del complemento a través de la inhibición de C3 usando un inhibidor de la convertasa del complemento C3, Crry-Ig, ambas inhiben el daño asociado con LCT. Se cree que ésta es la primera divulgación de la capacidad de inhibir el daño fisiológico y los efectos asociados con LCT inhibiendo de forma específica y selectiva el sistema alternativo del complemento.

En segundo lugar, los inventores de la presente invención han demostrado que la inhibición de la vía alternativa del complemento a través de la inhibición del factor B inhibe el daño asociado con LME. Se cree que ésta es la primera divulgación de la capacidad de inhibir el daño fisiológico y los efectos asociados con LME inhibiendo de forma específica y selectiva el sistema alternativo del complemento.

La identificación del factor B y las otras proteínas en la vía alternativa del complemento (por ejemplo, factor D o properdina) como dianas terapéuticas específicas proporciona una estrategia racional así como conduce a compuestos que pueden usarse para inhibir el daño fisiológico o efectos que resultan de LCT o LME mediante inhibición selectiva de la vía alternativa del complemento.

Ya se han desarrollado varios inhibidores para inhibir el sistema del complemento en diversas fases de activación (Holers, V.M. 2003, Clin Immunol 107: 140-151), aunque inhibidores específicos de la vía alternativa no se han descrito ampliamente. La inhibición específica de la vía alternativa presenta varias ventajas con respecto a los inhibidores existentes de la cascada del complemento. En primer lugar, dado que los inventores de la presente invención han descubierto que el daño fisiológico debido a LCT o LME es mediado principalmente por la vía alternativa de activación del complemento, un inhibidor específico de esta vía será igualmente eficaz como "paninhibidor" del complemento, aunque debe tener menos efectos secundarios inmunodepresores. Además, ratones *C4*^{-/-} (ratones que carecen del componente del complemento C4 que es genérico para las vías clásica, alternativa y de la lectina del complemento), pero no ratones *fB*^{-/-} (deficientes en factor B), parecen más susceptibles a infección bacteriana sistémica experimental, lo que sugieren que dejando la vía clásica intacta, un inhibidor de la vía alternativa plantea menos riesgo de infección grave. Aunque solamente se ha descrito un paciente humano con deficiencia congénita del factor B (Densen et al., 1996, Mol Immunol 33: 68 (Abstract 270)), estudios de ratones deficientes en factor B dirigidos a genes (*fB*^{-/-}) aún no han demostrado un efecto inmunomodulador para este factor (Densen et al., *supra*; Matsumoto et al., 1997, Proc Natl Acad Sci EE. UU. 94: 8720-8725). Los pacientes con deficiencias congénitas de componentes de la vía clásica, en contraste, parecen correr un riesgo de infección incrementado (de la forma más común *Staphylococcus* y *Streptococcus*). La inhibición de componentes de la vía clásica o C3 (común a todas las vías del complemento) también podría estar asociada con autoinmunidad (Figueroa y Densen, 1991, Clin Microbiol Rev 4: 359-395), explicando quizás por qué la deficiencia de B protege a los ratones MRL/lpr de desarrollar glomerulonefritis, pero la deficiencia de C3 no lo hace (Watanabe et al., *supra*). La inhibición selectiva de la vía alternativa previene la generación de ligandos derivados de C3 para el receptor C3a así como para los receptores del complemento 1-4 y C5a. Los efectos del bloqueo de la vía alternativa pueden ser, de hecho, más directos, debido a, hasta ahora, mal caracterizados receptores para los productos de activación Ba o Bb del factor B que se generan durante el proceso de activación. Por lo tanto, se espera que la inhibición de la vía alternativa sea mejor tolerada y más eficaz que la inhibición de la vía clásica del complemento.

Dado el gran beneficio terapéutico potencial de un inhibidor específico para la vía alternativa del complemento para uso en los métodos de la presente invención para el tratamiento de LCT y LME y afecciones relacionadas, los inventores de la presente invención han desarrollado varios anticuerpos monoclonales inhibidores dirigidos contra el factor B y han ensayado uno de ellos en un modelo experimental de LCT y también en un modelo experimental de LME. Estos anticuerpos se describen en detalle en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos N° 2005-0260198-A1, publicada el 24 de noviembre de 2005 y en la publicación PCT N° WO 2005/077417, publicada el 25 de agosto de 2005.

En resumen, para producir los anticuerpos, a ratones deficientes en factor B dirigidos a genes (*fB*^{-/-}) se les inyectó

una proteína de fusión constituida por los segundo y tercer dominios de la repetición consenso corta (SCR) del factor B enlazados a los dominios bisagra, CH2 y CH3 de un isotipo de IgG1 de ratón (véase la figura 1). Estos dominios de SCR se seleccionaron porque son parte del segmento deletado del gen del factor B en los ratones *fB-/-*. Los ratones se criaron para una respuesta inmunitaria al factor B (por ejemplo, usando ELISA), y células esplénicas de uno de los ratones inyectados se fusionaron con células de mieloma. Uno de los hibridomas resultantes, llamado 1379, produce un anticuerpo IgG₁ que inhibe la activación de la vía alternativa del complemento *in vitro* (figuras 2A y 2B) e *in vivo* (figura 3). Específicamente, este anticuerpo se puso a prueba en dos ensayos *in vitro* de actividad de la vía alternativa (figuras 2A y 2B), y mostró que el anticuerpo puede inhibir completamente la lisis de eritrocitos por suero humano, confirmando de este modo la capacidad de este reactivo para bloquear completamente la activación de la vía alternativa del complemento. Cuando los ratones se pusieron a prueba para inhibición de la vía alternativa en diversos momentos después de una única inyección del anticuerpo inhibidor, 1 mg de anticuerpo causó completa inhibición en el plazo de una hora cuando se inyectaba IV y en el plazo de dos horas cuando se inyectaba IP (figura 3). Los ratones que recibieron una inyección de un mg IP conservaban la inhibición completa de la vía alternativa a las 24 horas y los que recibieron una inyección de dos mg conservaban la inhibición completa hasta 48 horas después de la inyección. Los inventores también han inyectado 2 mg del anticuerpo 1379 de forma repetitiva i.p. cada dos días durante 14 días y han demostrado que la completa inhibición de la vía alternativa del complemento se mantuvo durante al menos 48 horas después de la última inyección. Además, fragmentos Fab preparados a partir de este anticuerpo también daban como resultado la completa inhibición de la vía alternativa a niveles aproximadamente equimolares como con el anticuerpo 1379 intacto.

El anticuerpo 1379 inhibe la activación de la vía alternativa en suero de animales incluyendo, ratones, ratas, seres humanos, babuinos, monos rhesus, monos cyno, cerdos, conejos y caballos (Tabla 1).

Tabla 1

| Especies en las que la vía alternativa es completamente inhibida por mAb 1379 | |
|---|------------|
| • | Ratón |
| • | Ser humano |
| • | Rata |
| • | Babuino |
| • | Rhesus |
| • | Cerdo |
| • | Mono Cyno |
| • | Caballo |
| Especies en las que la vía alternativa no es inhibida por el mAb 1379 | |
| • | Perro |
| • | Cobaya |

Un panel de anticuerpos anti-factor B producidos por los inventores se muestra en la Tabla 2. Tal como se ha descrito anteriormente, los inventores han demostrado que el mAb 1379 se une e inhibe a factor B tanto de ratón como humano. En contraste, el mAb designado 624 puede unirse a factor B tanto de ratón como humano, pero no inhibe la vía alternativa humana. Tal como se revela en un ensayo competitivo, los anticuerpos 624, 691 y 1231 no bloquean la unión por 1379. Estos anticuerpos deben unirse, por lo tanto, a la proteína en un sitio diferente, explicando por qué se unen al factor B sin inhibir su función *in vitro*. Sin embargo, los anticuerpos 395, 1322 y 1060 son inhibidores competitivos de 1379.

Tabla 2

| Clon | Isotipo | Se une al fB de ratón | Se une al fB humano | Inhibe vía alternativa de ratón (ensayo con cimosano) | Inhibe la vía alternativa humana (ensayo de lisis de eritrocitos de conejo) | Compite con 1379 por la unión a fB humano |
|-------|------------|-----------------------|---------------------|---|---|---|
| 1379 | IgG1 κ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 395 | IgG1 κ | +++ | ++ | ++ | +++ | +++ |
| 1322 | IgG2b κ | +++ | +++ | + | ++ | +++ |
| 624 | IgG1 κ | +++ | +++ | + | - | - |
| 691 | IgG1 κ | +++ | +++ | + | - | - |
| 1060 | IgG2b κ | +++ | +++ | + | ++ | ++ |
| 1231 | IgG1 | +++ | +++ | + | - | - |
| E1128 | | - | +++ | - | 0 | NA |

Se usó mapeo epitópico para demostrar que este anticuerpo se une al factor B en el tercer dominio de la repetición consenso corta (SCR), y el anticuerpo prevenía la formación del complejo C3bBb. Además, experimentos para mapear el epítipo para el anticuerpo mAb1379 indicaban que el sitio de unión al epítipo o anticuerpo en el factor B no era lineal. Los experimentos demostraron que la introducción de ciertas sustituciones de alanina en las SCR 2 y 3 del factor B humano, pero no SCR1, dio como resultado la pérdida o la pérdida sustancial de unión del anticuerpo 1379 al factor B, que incluía mutantes que sustituían: 139-Tyr-140-Cys-141-Ser por His-Cys-Pro (siendo las posiciones relevantes para el factor B humano maduro representado por la SEC ID N° 2); y 182-Glu-183-Gly-184-Gly-185-Ser por Gly-Asn-Gly-Val.

La superficie de unión conservada predicha o epítipo del factor B humano que es reconocida por mAb1379 se modeló. En resumen, la estructura terciaria del factor B humano estaba construida en base a la estructura tridimensional resuelta de CR2-SCR1-2 (Id 1GHQ del banco de datos de proteínas (PDB)). La figura 4 muestra el modelo de la estructura del factor B con las posiciones de aminoácidos correspondientes al epítipo de mAb1379 (con respecto a la SEC ID N° 2) indicadas. Los residuos que se cree que forman el epítipo conformacional para el anticuerpo mAb1379 son: Ala137, Tyr139, Ser141, Glu182, Ser185, Thr189, Glu190 y Ser192, aunque el epítipo puede contener solamente unos pocos, sustancialmente todos, o más residuos que como se representa en la figura 4. La figura 5 es un dibujo esquemático que muestra un complejo modelizado de mAb1379 (un fragmento Fab) que se une al factor B, con los lados de unión al antígeno del Fab habiendo sido modelizados para cubrir toda la región epitópica mapeada, tal como se ha definido anteriormente en la figura 4.

Los anticuerpos que han sido producidos por los inventores de la presente invención, descritos en más detalle en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos N° 2005-0260198-A1 y en la publicación PCT N° WO 2005/077417, *supra*, reconocen un sitio en el factor B que es compartido entre seres humanos y muchas otras especies animales en las que se realizan experimentos preclínicos de prueba preliminar, permitiendo de este modo que descubrimientos en modelos de enfermedad humana se traduzcan rápidamente en terapias humanas. Se cree que estos anticuerpos son los primeros anticuerpos contra el factor B que muestran la amplia inhibición de especies de la proteína. Por lo tanto, también se ha identificado un único sitio en el factor B contra el que pueden desarrollarse nuevos reactivos inhibidores.

En la presente invención, los inventores han descubierto y describen por primer vez en el presente documento que la inhibición de la vía alternativa inhibe el daño fisiológico en lesión cerebral traumática (LCT), y también inhibe el daño fisiológico en lesión de médula espinal (LME) y esta información puede usarse ahora para diseñar, aislar y/o identificar reactivos terapéuticos novedosos para el tratamiento de LCT y LME. Además, los anticuerpos producidos previamente y descritos por los inventores son excelentes agentes para uso en los métodos de la presente invención.

Una realización de la presente invención se refiere a un método para reducir o prevenir al menos un síntoma o afección (incapacidad, deficiencia, daño fisiológico) que resulta de (asociado con) lesión cerebral traumática (LCT) en un animal o mejorar (incrementar) la recuperación del daño causado por LCT, que comprende inhibir selectivamente la vía alternativa del complemento en un animal que ha padecido LCT. Otra realización de la invención se refiere a un método para reducir o prevenir al menos un síntoma o afección (incapacidad, deficiencia, daño fisiológico) que resulta de (asociado con) lesión de médula espinal (LME) en un animal o mejorar (incrementar) la recuperación del daño causado por LME, que comprende inhibir selectivamente la vía alternativa del complemento en un animal que ha padecido LME. En una realización preferida, el método incluye administrar al animal un agente que inhibe la vía alternativa del complemento, y particularmente, un agente que inhibe el factor B. En una realización particularmente preferida, el agente es un anticuerpo anti-factor B o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

Por consiguiente, los métodos de la presente invención incluyen una etapa de inhibir selectivamente la vía alternativa del complemento en un animal que ha, o corre el riesgo de desarrollar, daño fisiológico debido a LCT o LME, respectivamente. De acuerdo con la presente invención, inhibir la vía alternativa del complemento en un animal se refiere a inhibir la expresión y/o la actividad biológica de al menos una proteína o molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína que es parte de la vía alternativa del complemento. Dichas proteínas incluyen, aunque sin limitarse a, factor B, factor D o properdina. Inhibir "selectivamente" la vía alternativa del complemento significa que el método de la presente invención inhibe preferente o exclusivamente la vía alternativa del complemento, pero no inhibe o al menos no inhibe sustancialmente otras vías para activación del complemento, incluyendo la vía clásica del complemento o la vía de lectina. Por ejemplo, los novedosos anticuerpos para factor B y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la presente invención son un ejemplo de un reactivo que inhibe selectivamente la vía alternativa del complemento. Inhibir "selectivamente" una proteína específica significa que el método de la presente invención inhibe preferente o exclusivamente la expresión y/o una actividad biológica de la proteína específica, pero no inhibe o al menos no inhibe sustancialmente la expresión y/o una actividad biológica de otras proteínas (a menos que dicha actividad biológica sea una que es compartida, tal como un evento cadena abajo, con la proteína específica).

De acuerdo con la presente invención, lesión cerebral traumática (LCT) se define como cualquier lesión, herida o daño causado por cualquier tipo de traumatismo al cráneo, tal como impacto en el cráneo o sacudida. Más específicamente, LCT es una lesión adquirida del cerebro causada por una fuerza física externa, que da como

5 resultado una incapacidad funcional o deficiencia psicosocial total o parcial, o ambas. La expresión se aplica a traumatismos craneales abiertos y cerrados que dan como resultado deficiencias en una o más áreas, tal como capacidad intelectual; lenguaje; memoria; atención; razonamiento; pensamiento abstracto; capacidad de decisión; resolución de problemas; capacidades sensoriales, de percepción y motoras; comportamiento psicosocial; funciones
 10 físicas; procesamiento de información; y habla. La expresión típicamente no se aplica a lesiones cerebrales que son congénitas o degenerativas, o lesiones cerebrales inducidas por traumatismo al nacer, aunque este último tipo de traumatismo también puede tratarse usando el método de la invención. LCT puede dar como resultado diversos síntomas, afecciones y deficiencias fisiológicas y psicológicas, incluyendo deficiencias físicas (por ejemplo, habla, visión, audición y otras deficiencias sensoriales; cefaleas; falta de coordinación motora afinada; espasticidad de
 15 músculo; paresia o parálisis de uno o ambos lados y trastornos convulsivos; deficiencias de equilibrio; y otras deficiencias de la marcha), deficiencias cognitivas (por ejemplo, déficits de memoria a corto y a largo plazo, déficit de concentración, lentitud de pensamiento y alcance de atención limitado, así como deficiencias de percepción, comunicación, habilidades lectoras y escritoras, planificación, pensamiento secuencial y capacidad de decisión), y deficiencias psicosociales-conductuales-emocionales (por ejemplo, fatiga, cambios de humor, negación, egocentrismo, ansiedad, depresión, baja autoestima, disfunción sexual, desasosiego, falta de motivación, incapacidad de autocontrol, dificultad con el control emocional, incapacidad de tolerar, agitación, risas o llanto
 20 excesivos y dificultad para relacionarse con los demás). Una descripción detallada del diagnóstico de LCT se ha presentado anteriormente.

20 Los métodos para diagnosticar LCT están bien establecidos en la técnica. Típicamente, LCT se diagnostica mediante los antecedentes de traumatismo, el estado clínico y estudios de imagenología, tales como rayos x y exploración por tomografía computarizada (TC). Es de particular importancia el uso de la puntuación de la Escala de Coma de Glasgow (GCS) post-reanimación (Teasdale y Jennett, 1974, Lancet 2 (7872): 81-84), dado que este parámetro representa un importante indicador predictivo del resultado. Cuando se evalúa la GCS, la *mejor* respuesta
 25 se usa para calcular la puntuación. Los pacientes con traumatismo craneal *leve* (GCS 14 ó 15) representan aproximadamente el 80% de todos los pacientes con traumatismo craneal admitidos en el departamento de urgencias. El traumatismo craneal moderado corresponde a una puntuación GCS entre 9 y 13 y está asociado con un riesgo incrementado de patología intracraneal en comparación con pacientes con traumatismo craneal *leve*. Una puntuación GCS de 8 puntos o menos corresponde a un paciente comatoso, tal como se define por la incapacidad de abrir los ojos, de obedecer órdenes y de responder verbalmente. Por lo tanto, un traumatismo craneal grave se define como una puntuación GCS de 3 a 8. Cuando se evalúa al paciente, además de la GCS y la evaluación del nivel de consciencia, un examen neurológico típicamente incluye la evaluación del tamaño de la pupila y la reactividad y una breve evaluación de la función motora periférica. El examen clínico incluye además la inspección
 30 del cuero cabelludo en busca de laceraciones, palpación del cráneo en busca de fracturas por impresión y las búsqueda de signos indirectos de fracturas craneales basílares, incluyendo equimosis periorbital (“ojos de mapache”), equimosis retroauricular (“signo de Battle”), rinitis / otorrea debido a fuga de LCR, y parálisis del nervio VII. En ciertas circunstancias, se proporciona una exploración por TC. Otras causas de coma o estado de consciencia alterado pueden ser investigados en el análisis, tales como mediante cribado en busca de: fármacos, disfunción metabólica, fuentes de hemorragia interna o externa, daño cerebral no traumático preexistente (por ejemplo, lesión cerebral isquémica o hemorrágica), epilepsia, trombosis arterial basilar, meningitis bacteriana, absceso o tumor cerebral. La clasificación morfológica del traumatismo craneal cerrado se basa en descubrimientos en la exploración por TC de acuerdo con las directrices de Marshall y colaboradores (Marshall et al., J. Neurosurg. 1991, 75: S14-S20). Las lesiones intracraneales pueden ser focales (hemorragia subdural, epidural, intracerebral; “evacuadas” frente a “no evacuadas”) o difusas (grado I-IV). Descripciones detalladas de parámetros usados para evaluar LCT se describen, por ejemplo, en Vos et al., 2002, Eur. J. Neurol. 9: 207-219 y Gaetz, 2004, Clin. Neurophysiol. 115: 4-18.
 35
 40
 45

De acuerdo con la presente invención, lesión de médula espinal (LME) se define como cualquier lesión, herida o daño a la médula espinal que da como resultado una pérdida de función, tal como movilidad o sensación. Son causas frecuentes de daño traumatismo (por ejemplo, mediante accidente de automóvil, disparo, caídas, etc.) o enfermedad (polio, espina bífida, ataxia de Friedreich, etc.). La médula espinal no tiene que ser cortada para que se produzca una pérdida de funcionalidad. En la mayoría de los individuos con LME, la médula espinal está intacta, pero el daño da como resultado la pérdida de función. Además de una pérdida de sensación o de la función motora, los individuos con LME también pueden padecer disfunción del intestino y la vejiga, disfunción sexual y de la fertilidad, incapacidad para regular la presión sanguínea de manera eficaz, control reducido de la temperatura corporal, incapacidad de sudar por debajo del nivel de la lesión y dolor crónico. Un paciente con LME puede tener cualquier nivel de LME, tal como se define típicamente por el nivel del daño (por ejemplo, en o por debajo de cualquiera de las ocho vértebras cervicales o las doce vértebras torácicas). Las lesiones muy altas (C-1, C-2) pueden dar como resultado una pérdida de muchas funciones involuntarias incluyendo la capacidad de respirar, necesitando ayudas para respirar tales como respiradores mecánicos o marcapasos diafragmáticos.
 50
 55
 60

Los métodos para diagnosticar lesión de médula espinal están bien establecidos en la técnica. En el servicio de urgencias, un médico puede ser capaz de descartar lesión de médula espinal inspeccionado cuidadosamente a una persona lesionada, realizando pruebas para la función sensorial y el movimiento y realizando preguntas sobre un accidente. Si la persona lesionada se queja de dolor de cuello, no está completamente despierta, o presenta signos obvios de debilidad o lesión neurológica, pueden ser necesarias pruebas diagnósticas de urgencias. Dichas pruebas
 65

pueden incluir, rayos X, exploración por tomografía computarizada (TC), imaginología por resonancia magnética (IRM), o mielografía. También pueden realizarse diversos exámenes neurológicos. Los efectos de LME dependen del tipo de lesión y el nivel de la lesión. La LME puede dividirse generalmente en dos tipos de lesión - completa e incompleta. Una lesión completa significa que no existe ninguna función por debajo del nivel de la lesión (es decir, ninguna sensación y ningún movimiento voluntario). Ambos lados del cuerpo están igualmente afectados. Una lesión incompleta significa que existe cierta funcionalidad por debajo del nivel primario de la lesión. Una persona con una lesión incompleta puede ser capaz de mover un miembro más que otro, puede ser capaz de sentir partes del cuerpo que no se pueden mover, o puede tener más funcionalidad en un lado del cuerpo que en el otro. Con los avances en el tratamiento agudo de LME, las lesiones incompletas se están volviendo más comunes.

El nivel de lesión es muy útil para predecir qué partes del cuerpo podrían estar afectadas por parálisis y pérdida de función en LME. Las lesiones cervicales (del cuello) habitualmente dan como resultado tetraplejía. Las lesiones por encima del nivel de la C-4 pueden requerir un respirador para que la persona respire. Las lesiones en la C-5 a menudo dan como resultado control del hombro y el bíceps, pero no control en la muñeca o la mano. Las lesiones en la C-6 generalmente producen control de la muñeca, pero no función de la mano. Los individuos con lesiones en la C-7 y la T-1 pueden enderezar sus brazos pero seguir teniendo problemas de destreza con las manos y los dedos. Las lesiones a nivel torácico y por debajo dan como resultado paraplejía, con las manos no afectadas. En T-1 a T-8 generalmente existe control de las manos, pero mal control del tronco como resultado de la falta de control de los músculos abdominales. Las lesiones en las T inferiores (T-9 a T-12) permiten buen control del tronco y buen control de los músculos abdominales. El equilibrio sentado es muy bueno. Las lesiones lumbar y sacra producen control disminuido de los flexores de la cadera y las piernas. Las personas con tetraplejía tienen lesiones prolongadas de uno de los ocho segmentos cervicales de la médula espinal; aquellas con paraplejía tienen lesiones en las regiones torácica, lumbar o sacra de la médula espinal.

La presente invención se refiere a inhibir el daño fisiológico y los síntomas o afecciones (incapacidades, deficiencias) asociadas con dicho daño, que resultan de LCT o LME tal como se ha descrito en detalle anteriormente. Por lo tanto, no se requiere que el daño fisiológico o todos los efectos de la afección sean completamente prevenidos o invertidos, aunque los efectos del presente método probablemente ser extienden a un beneficio terapéutico significativo para el paciente. Por lo tanto, un beneficio terapéutico no es necesariamente una completa prevención o cura para una afección o daño fisiológico particular que resulta de LCT o LME, sino que en su lugar, puede abarcar un resultado que incluye reducir o prevenir los síntomas o el daño fisiológico que resultan de LCT o LME, reducir o prevenir la aparición de dichos síntomas o daño (cuantitativa o cualitativamente), reduciendo la gravedad de dichos síntomas o efectos fisiológicos, y/o mejorando la recuperación del paciente después de padecer LCT o LME. Específicamente, una composición de la presente invención, cuando se administra a un paciente, preferentemente previene el daño asociado con la lesión cerebral o lesión de médula espinal y/o reduce o alivia síntomas de o afecciones asociadas con (que resultan de) el daño, signos del daño o incluso las causas del daño, así como mejora la recuperación del daño. Por lo tanto, proteger a un paciente de los efectos o síntomas fisiológicos que resultan de LCT o LME (o afecciones relacionadas) incluye prevenir o reducir la aparición y/o gravedad de los efectos del daño y tratar a un paciente en el que los efectos del daño ya se están produciendo o comenzando a producirse. Un efecto beneficioso puede ser evaluado fácilmente por un experto en la materia y/o por un facultativo formado que esté tratando al paciente. Por ejemplo, muchos de los métodos descritos anteriormente para el diagnóstico de LCT o LME pueden usarse para evaluar al paciente antes y después del tratamiento usando un método de la presente invención para evaluar el éxito del tratamiento. Preferentemente, existe una diferencia positiva o beneficiosa en la gravedad o aparición de al menos una puntuación, valor o medida clínica o biológica usada para evaluar a dichos pacientes en aquellos que han sido tratados de acuerdo con la presente invención en comparación con aquellos que no lo han sido.

La inhibición de la vía alternativa del complemento de acuerdo con la presente invención para los fines de inhibir el daño fisiológico, y los síntomas o afecciones (incapacidades, deficiencias) asociadas con dicho daño, que resultan de LCT o LME, puede conseguirse afectando directamente a la expresión (transcripción o traducción) o actividad biológica de una proteína en la vía alternativa del complemento, o afectando directamente a la capacidad de una proteína para unirse a una proteína en la vía alternativa del complemento o para contribuir de otro modo a la activación del complemento mediante la vía alternativa. Por ejemplo, la expresión de una proteína se refiere a la transcripción de la proteína o la traducción de la proteína. Por lo tanto, el método de la presente invención puede inhibir la transcripción y/o la traducción de una proteína en el animal que expresa de forma natural la proteína (por ejemplo, administrando un agente que inhibe la expresión de la proteína y modificando genéticamente un animal para que tenga expresión de proteínas reducidas). En otro ejemplo, la inhibición de la vía alternativa del complemento se define en el presente documento como cualquier reducción (es decir, disminución, regulación negativa, inhibición) medible (detectable) de la actividad de la vía, tal como mediante cualquier reducción medible en la expresión y/o actividad biológica de una proteína dentro de la vía alternativa del complemento, y puede incluir bloquear o inhibir la capacidad de una proteína o molécula para actuar en la vía alternativa del complemento.

Los métodos para inhibir la expresión de una proteína incluyen, aunque sin limitarse a, administrar un agente que inhibe la expresión de la proteína (directa o indirectamente), y modificar genéticamente un animal para que tenga expresión de proteínas reducida (por ejemplo, nótese los ratones $\beta B^{-/-}$ usados en el presente documento). Preferentemente, la expresión de proteínas es inhibida mediante administración de un agente (reactivo, compuesto,

fármaco) al animal, que inhibe directamente la expresión de proteínas. Dichos agentes incluyen, aunque sin limitarse a: una ribozima o iARN que es específica para ARN que codifica la proteína; una proteína de unión a ADN o un fármaco que se une a un gen o ARN que codifica la proteína e inhibe la expresión de la proteína; un aptámero que se une a la proteína; una proteína o fármaco que se une a la proteína de forma intracelular y previene la secreción de la proteína por la célula que la expresa; y una molécula de ácido nucleico aislada que reduce la expresión de la proteína mediante hibridación en condiciones de alta rigurosidad a un gen que codifica la proteína en una célula del animal (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico antisentido). Dichos compuestos que inhiben selectivamente la expresión de una proteína pueden producirse usando técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Por consiguiente, el método descrito en el presente documento incluye el uso de diversos agentes (es decir, compuestos reguladores) que, actuando directamente sobre una proteína en la vía alternativa del complemento, inhiben selectivamente la expresión y/o actividad biológica de una o más proteínas en la vía alternativa del complemento de modo que el daño fisiológico asociado con LCT o LME se reduzca en un animal. Los agentes útiles en la presente invención incluyen, por ejemplo, proteínas, moléculas de ácido nucleico, anticuerpos y compuestos que son productos del diseño racional de fármacos (es decir, "drugs"). Dichos agentes se denominan generalmente en el presente documento como inhibidores.

De acuerdo con la presente invención, un inhibidor es cualquier agente que inhibe, por inhibición directa o inhibición competitiva, la expresión y/o actividad biológica de una proteína (por ejemplo, una proteína en la vía alternativa del complemento), e incluye agentes que actúan sobre el factor B, el factor D o properdina. En una realización de la presente invención, la inhibición de la vía alternativa del complemento o una proteína de la vía alternativa del complemento se define en el presente documento como cualquier reducción (es decir, disminución, regulación negativa, inhibición) medible (detectable) de la actividad biológica de una proteína en la vía alternativa del complemento. La actividad biológica o acción biológica de una proteína se refiere a cualquier función o funciones mostradas o realizadas por una forma de origen natural de la procedimiento según lo medido u observado *in vivo* (es decir, en el entorno fisiológico natural de la proteína) o *in vitro* (es decir, en condiciones de laboratorio). Por ejemplo, una actividad biológica del factor B puede incluir, aunque sin limitarse a, unión a C3 activada, solubilización de complejos inmunitarios, actividad de factor de crecimiento de células B, y activación de monocitos. Una actividad biológica del factor D puede incluir, aunque sin limitarse a, catálisis de la escisión del factor B cuando está en complejo con C3, catálisis de la formación de Ba y Bb. Una actividad biológica de properdina puede incluir, aunque sin limitarse a, unión a un C3bBb unido a célula estabilizante o complejo inmunitario y estabilización de la convertasa C3/C5.

La actividad biológica de una proteína descrita en el presente documento puede inhibirse previniendo o inhibiendo (reduciendo, disminuyendo) directamente la capacidad de la proteína para unirse a y/o activar otra proteína (por ejemplo, C3), inhibiendo de este modo eventos cadena abajo que resultan de dicha unión. Preferentemente, la actividad biológica de la vía alternativa del complemento se inhibe administrando un agente que inhibe al menos una proteína en la vía, incluyendo dicho agente, aunque sin limitarse a, un agente que se une a una proteína en la vía o compete con la proteína en la vía de una manera que la capacidad de la proteína de unirse a y/o activar otra proteína es inhibida o prevenida.

Los agentes que inhiben una proteína en la vía alternativa del complemento pueden incluir, aunque sin limitarse a, compuestos que son productos del diseño racional de fármacos, productos naturales, y compuestos que tienen propiedades reguladoras parcialmente definidas. Un agente regulador, que incluye un antagonista de una proteína dada, puede ser un compuesto a base de proteínas, un compuesto basado en carbohidratos, un compuesto basado en lípidos, un compuesto basado en ácidos nucleicos, un compuesto orgánico natural, un compuesto o fármaco obtenido de forma sintética, un anticuerpo (incluyendo fragmentos de unión al antígeno del mismo), o fragmentos del mismo. Un tipo particular de agente útil en la presente invención es un antagonista de la vía alternativa del complemento, que incluye un antagonista de una proteína dentro de esta vía. De acuerdo con la presente invención, un "antagonista" se refiere a cualquier compuesto que inhibe (por ejemplo, antagoniza, reduce, disminuye, bloquea, invierte o altera) el efecto de una proteína dada. Más particularmente, un antagonista es capaz de actuar de una manera con respecto a la actividad de la proteína dada, de modo que la actividad biológica de la proteína dada disminuye o se bloquea de una manera que es antagónica (por ejemplo, contra, una inversión de, contraria a) a la acción natural de la proteína dada. Los antagonistas pueden incluir, aunque sin limitarse a, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, una proteína, péptido, ácido nucleico (incluyendo ribozimas y antisentido), o un proteína del diseño o selección de un fármaco/compuesto/péptido que proporciona el efecto antagonista. Por ejemplo, la presente invención incluye cualesquiera antagonistas de las proteínas naturales, factor B, factor D o properdina, incluyendo antagonistas de anticuerpo, antagonistas de proteína/péptido, antagonistas de ácido nucleico o antagonistas de molécula pequeña (por ejemplo, un inhibidor de molécula pequeña).

Los agentes reguladores descritos en el presente documento incluyen fármacos, incluyendo péptidos, oligonucleótidos, carbohidratos y/o moléculas orgánicas sintéticas que regulan la producción y/o función de una o más proteínas en la vía alternativa del complemento. Dicho agente puede obtenerse, por ejemplo, a partir de estrategias de diversidad molecular (una combinación de estrategias relacionadas que permiten la rápida construcción de grandes bibliotecas de moléculas químicas diversas), bibliotecas de compuestos naturales o sintéticos, en particular a partir de bibliotecas químicas o combinatorias (es decir, bibliotecas de compuestos que

difieren en secuencia o tamaño pero que tienen las mismas unidades estructurales) o mediante diseño racional de fármacos. Véase por ejemplo, Maulik et al., 1997, *Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies*, Wiley-Liss, Inc.,

5 En una estrategia de diversidad molecular, se sintetizan grandes bibliotecas de compuestos, por ejemplo, a partir de péptidos, oligonucleótidos, carbohidratos y/o moléculas orgánicas sintéticas, usando enfoques biológicos, enzimáticos y/o químicos. Los parámetros críticos en el desarrollo de una estrategia de diversidad molecular incluyen diversidad de subunidades, tamaño molecular y diversidad de la biblioteca. El objetivo general de cribar
10 dichas bibliotecas es utilizar aplicación secuencial de selección combinatoria para obtener ligandos de alta afinidad contra una diana deseada, y a continuación optimizar las moléculas de partida mediante estrategias de diseño aleatorio o dirigido. Los métodos de diversidad molecular se describen en detalle en Maulik, et al., *supra*.

En un procedimiento de diseño racional de fármacos, la estructura tridimensional de un compuesto regulador puede analizarse mediante, por ejemplo, resonancia magnética nuclear (RMN) o cristalografía de rayos X. Esta estructura
15 tridimensional puede usarse a continuación para predecir estructuras de compuestos potenciales, tales como agentes reguladores potenciales mediante, por ejemplo, modelización por ordenador. La estructura del compuesto predicha puede usarse para optimizar compuestos de partida obtenidos, por ejemplo, mediante métodos de diversidad molecular. Además, la estructura del compuesto predicha puede producirse mediante, por ejemplo, síntesis química, tecnología de ADN recombinante, o aislando un mimetópo a partir de una fuente natural (por
20 ejemplo, plantas, animales, bacterias y hongos).

Diversos otros métodos de diseño de fármacos basado en la estructura se desvelan en Maulik et al., 1997, *supra*. Maulik et al., desvelan, por ejemplo, métodos de diseño dirigido, en los que el usuario dirige el proceso de crear moléculas novedosas a partir de una biblioteca de fragmentos de segmentos seleccionados apropiadamente; diseño
25 aleatorio, en el que el usuario usa un algoritmo genético u otro para mutar aleatoriamente fragmentos y sus combinaciones mientras que aplica simultánea un criterio de selección para evaluar la idoneidad de ligandos candidatos; y un enfoque basado en cuadrículas en el que el usuario calcula la energía de interacción entre estructuras receptoras tridimensionales y sondas de fragmentos pequeños, seguido por enlazado entre sí de sitios de la sonda favorables.
30

Una molécula de ácido nucleico aislada que es útil como agente para inhibir una proteína (o su expresión) en la vía alternativa del complemento es una molécula de ácido nucleico antisentido, una ribozima, ARN_i, o un aptámero. Tal como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico interferente se define como una molécula
35 de ácido nucleico aislada que reduce la expresión de una proteína por hibridación en condiciones de alta rigurosidad con un gen que codifica la proteína. Dicha molécula de ácido nucleico es suficientemente similar al gen que codifica la proteína que la molécula es capaz de hibridar en condiciones de alta rigurosidad con la cadena codificante o complementaria del gen o ARN que codifica la proteína natural. La interferencia de ARN (iARN) es un proceso mediante el cual ARN bicatenario, y en sistemas de mamífero, ARN interferente corto (ARN_i), se usa para inhibir o silenciar la expresión de genes complementarios. En la célula diana, ARN_i se desenrollan y se asocian con un
40 complejo silenciador inducido por ARN (RISC), que es guiado a continuación a las secuencias de ARNm que son complementarias al ARN_i, con lo que el RISC escinde el ARNm. Una ribozima es un fragmento de ARN que funciona uniéndose a la fracción de ARN diana y la inactiva escindiendo la cadena principal fosfodiéster en un sitio de corte específico. Los aptámeros son cadenas cortas de ácidos nucleicos sintéticos (habitualmente ARN pero también ADN) seleccionadas entre bibliotecas de ácido nucleico combinatorias aleatorizadas en virtud de su
45 capacidad para unirse a una molécula diana específica predeterminada con alta afinidad y especificidad. Los aptámeros asumen una estructura tridimensional definida y son capaces de discriminar entre compuestos con muy pequeñas diferencias en la estructura.

Un gen incluye regiones reguladoras que controlan la producción de la proteína codificada por ese gen (tales como, aunque sin limitarse a, regiones de control de la transcripción, traducción o postraducción) así como la propia región
50 codificante. Los genes que codifican diversas proteínas de la vía alternativa del complemento, incluyendo factor B, factor D o properdina, han sido identificados y son conocidos en la técnica. Una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico que ha sido extraída de su medio natural (es decir, que ha sido sometida a manipulación humana) y puede incluir ADN, ARN, o derivados de ADN o ARN. Por lo tanto, "aislada" no refleja la medida en la que la molécula de ácido nucleico ha sido purificada. Una molécula de ácido nucleico aislada de la
55 presente invención puede aislarse de su fuente natural o producirse usando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación) o síntesis química.

Tal como se usa en el presente documento, la referencia a las condiciones de hibridación se refiere a condiciones de
60 hibridación convencionales en las que se usan moléculas de ácido nucleico para identificar moléculas de ácido nucleico similares. Dichas condiciones convencionales se desvelan, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989. Sambrook et al., *ibid.*, (véase específicamente, páginas 9.31-9.62). Además, fórmulas para calcular las condiciones de hibridación y de lavado apropiadas para conseguir hibridación permitiendo diversos grados de discordancia de nucleótidos se desvelan, por ejemplo, en
65 Meinkoth et al., 1984, *Anal. Biochem.* 138, 267-284; Meinkoth et al., *ibid.*, se incorpora como referencia en el presente documento en su totalidad.

En una realización preferida de la presente invención, el agente usado para inhibir una proteína de la vía alternativa del complemento con el fin de inhibir el daño fisiológico que resulta de LCT o LME (y los síntomas o afecciones (incapacidades, deficiencias) asociadas con dicho daño), es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Análogamente, un polipéptido de unión al antígeno es también particularmente preferido para uso en la presente invención. En un aspecto, el anticuerpo se une selectivamente a la proteína de la vía alternativa del complemento de una manera tal que se inhibe o se previene que la proteína se una a otra proteína con la que normalmente (en condiciones naturales o fisiológicas) interactúa. En otro aspecto, el anticuerpo se une selectivamente a la proteína de una manera tal que se inhibe o previene que la proteína active a otra proteína con la que normalmente interactúa, incluso aunque la proteína pueda unirse al menos parcialmente a la otra proteína.

10 Anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos particularmente preferidos para uso en la inhibición selectiva de la vía alternativa del complemento con el fin de inhibir el daño fisiológico que resulta de LCT o LME se describen en detalle a continuación (por ejemplo, los anticuerpos para factor B descritos en el presente documento, y particularmente, el anticuerpo mAb1379 descrito en detalle en el presente documento).

15 Preferentemente, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo útil en la presente invención se une a una proteína seleccionada entre factor B, factor D o properdina. De la forma más preferente, la invención incluye un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une al factor B, y su uso con el fin de inhibir el daño fisiológico que resulta de LCT o LME. Los anticuerpos (y fragmentos de unión al antígeno de los mismos) que se unen selectivamente al factor B e inhiben la vía alternativa del complemento de acuerdo con la invención se describen y se ejemplifican en detalle en el presente documento. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a una superficie de unión conservada o epítipo de dicha proteína (por ejemplo, factor B) que está conservado entre especies animales, y particularmente especies de mamífero (es decir, el anticuerpo es reactivo de forma cruzada con la proteína de dos o más especies de mamífero diferentes). En particular, la presente invención incluye un anticuerpo que se une al factor B de al menos dos, y preferentemente, varias especies de mamífero diferentes, incluyendo, aunque sin limitarse a, ser humano, primate no humano, ratón, rata, cerdo, caballo y conejo. Preferentemente, la presente invención incluye un anticuerpo que se une al factor B de ser humano y al menos una especie animal adicional, y preferentemente, al menos una especie de mamífero adicional, incluyendo, aunque sin limitarse a, primate no humano, ratón, rata, cerdo, caballo y conejo. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a la tercera repetición consenso corta (SCR) del factor B. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a una región del factor B que previene la escisión del factor B por el factor D. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo es el anticuerpo denominado en el presente documento como 1379 (es decir, el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma del mismo número, que también tiene la designación de depósito de la ATCC PTA-6230), o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

35 El hibridoma descrito en el presente documento como 1379 (o mAb1379) fue depositado el 21 de septiembre de 2004, en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, ubicada en 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110-2209), según los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Fines de Procedimiento de Patente, y ha recibido la designación de depósito de la ATCC PTA-6230.

45 Tal como se describe en el presente documento, el tamaño mínimo de una proteína, sección de una proteína (por ejemplo un fragmento, sección, dominio, etc.), o región o epítipo de una proteína, es un tamaño suficiente para servir como un epítipo o superficie de unión conservada para la generación de un anticuerpo o como diana en un ensayo *in vitro*. La proteína puede tener al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos de longitud (por ejemplo, adecuada para un epítipo de anticuerpo o como un péptido detectable en un ensayo), o al menos aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, y así sucesivamente, en cualquier longitud entre 4 aminoácidos y hasta la longitud completa de una proteína o sección de la misma o más larga, en números enteros (por ejemplo, 8, 9, 10,...25, 26,...500, 501,...).

55 La secuencia de nucleótidos para el gen y la región codificante que codifica factor B humano y otras proteínas del complemento, así como la secuencia de aminoácidos de dichas proteínas, se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, el gen que codifica factor B humano y otras proteínas del complemento se encuentra en el N° de entrada de la base de datos NCBI NG_000013. La secuencia codificante para el factor B se encuentra en el N° de entrada de la base de datos NCBI NM_001710 y la secuencia de aminoácidos para la preproteína del factor B se encuentra en el N° de entrada de la base de datos NCBI NP_001701 o P00751. La secuencia de aminoácidos para el N° de entrada de la base de datos NCBI P00751, que es una secuencia de preproteína de factor B humano, se representa en el presente documento mediante la SEC ID N° 1. Secuencias de otras especies animales también son conocidas en la técnica. A modo de comparación, en la secuencia del factor B de ratón (por ejemplo, véase el N° de entrada de la base de datos NCBI P04186, representada en el presente documento mediante la SEC ID N° 6), el tercer dominio de la SCR está ubicado en las posiciones 160-217 de esta preproteína de 761 aminoácidos, y la proteína de factor B murino madura abarca las posiciones 23-761 de la SEC ID N° 6. La secuencia codificante para el factor D humano se encuentra en el N° de entrada de la base de datos NCBI NM_001928.2 y la secuencia de aminoácidos para la preproteína del factor D humano se encuentra en el N° de entrada de la base de datos NCBI NP_001919 (representado en el presente documento como la SEC ID N° 7). La secuencia codificante para properdina humana

se encuentra en el N° de entrada de la base de datos NCBI NM_002621.1 y la secuencia de aminoácidos para properdina humana se encuentra en el N° de entrada de la base de datos NCBI NP_002612 (representada en el presente documento mediante la SEC ID N° 8).

5 La preproteína del factor B humano representada mediante la SEC ID N° 1 es una proteína de 764 aminoácidos con un péptido señal que abarca desde las posiciones de aminoácidos 1-25. La cadena madura del factor B corresponde a las posiciones 26-764 de la SEC ID N° 1 y está representada en el presente documento mediante la SEC ID N° 2. Las tres regiones SCR del factor B humano están representadas en el presente documento mediante la SEC ID N° 3 (SCR1, también conocida como Sushi 1, que abarca desde aproximadamente la posición 35 a aproximadamente la posición 100 de la SEC ID N° 1 o desde aproximadamente la posición 5 a aproximadamente la posición 75 de la SEC ID N° 2), la SEC ID N° 4 (SCR2, también conocida como Sushi 2, que abarca desde aproximadamente la posición 101 a aproximadamente la posición 160 de la SEC ID N° 1 o desde aproximadamente la posición 76 a aproximadamente la posición 135 de la SEC ID N° 2) y la SEC ID N° 5 (SCR3, también conocida como Sushi 3, que abarca desde aproximadamente la posición 163 a aproximadamente la posición 220 de la SEC ID N°1 o desde aproximadamente la posición 138 a aproximadamente la posición 195 de la SEC ID N° 2).

En base al mapeo epitópico del factor B usando los fragmentos descritos por Hourcade, 1995, J. Biol Chem., en una realización preferida, un anticuerpo anti-factor B útil en la presente invención preferentemente se une a un epítipo o superficie de unión conservada dentro de, o que contiene, una parte del tercer dominio de la SCR, y más preferentemente, a un epítipo del factor B humano que incluye al menos una sección de la secuencia que comprende de aproximadamente la posición Tyr139 a aproximadamente la posición Ser185 con respecto a la proteína del factor B madura (SEC ID N° 2), a un epítipo del factor B humano que incluye al menos una sección de la secuencia que comprende de aproximadamente la posición Tyr139 a aproximadamente la posición Ser141 con respecto a la proteína del B madura (SEC ID N° 2), a un epítipo del factor B humano que incluye al menos una sección de la secuencia que comprende de aproximadamente la posición Glu182 a aproximadamente la posición Ser185 con respecto a la proteína del B madura (SEC ID N° 2), a un epítipo del factor B que incluye al menos una sección del factor B humano (SEC ID N° 2) que comprende una o más cualesquiera de las siguientes posiciones o sus posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano: Tyr139, Cys 140, Ser141, Glu182, Gly184 o Ser185, o a un epítipo del factor B que incluye al menos una sección de las posiciones equivalentes con respecto a especies animales no humanas. Un experto en la materia puede alinear fácilmente la secuencia del factor B humano con la secuencia del factor B de otra especie animal y determinar las posiciones de las regiones SCR y las secciones específicas de las terceras regiones SCR correspondientes a las posiciones de aminoácidos anteriores. Por ejemplo, dos secuencias específicas pueden alinearse entre sí usando la secuencia BLAST 2 tal como se describe en el documento Tatusova y Madden, (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174: 247-250.

En base a modelización y mapeo epitópico adicional de un anticuerpo ejemplar útil en la invención, en otra realización preferida, un anticuerpo anti-factor B útil en la presente invención se une preferentemente a un epítipo (superficie de unión conservada) dentro de, o que contiene, una parte o sección del tercer dominio de la SCR del factor B que incluye al menos una o más de las siguientes posiciones de aminoácidos, con respecto a la SEC ID N° 2, o sus posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano: A137, Y139, S141, E182, S185, T189, E190 y S192. En un aspecto de la invención, el epítipo está dentro de o contiene una parte o sección del tercer dominio de la SCR del factor B que incluye todas o sustancialmente todas de (al menos cinco, seis o siete de las siguientes posiciones de aminoácidos de la SEC ID N° 2, o sus posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano: Ala137, Tyr139, Ser141, Glu182, Ser185, Thr189, Glu190 y Ser192. En otro aspecto más, el epítipo reconocido por un anticuerpo anti-factor B útil en la presente invención está dentro de, o contiene, una parte o sección del tercer dominio de la SCR del factor B que consta de las siguientes posiciones de aminoácidos de la SEC ID N° 2, o sus posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano: Ala137, Tyr139, Ser141, Glu182, Ser185, Thr189, Glu190 y Ser192.

En una realización, el epítipo reconocido por un anticuerpo para factor B útil en la invención también puede definirse más particularmente como siendo un epítipo no lineal ubicado dentro de la estructura tridimensional de una sección del tercer dominio de la SCR del factor B. La sección que contiene el epítipo es la estructura tridimensional del factor B que está definida por sustancialmente todas de (por ejemplo, al menos aproximadamente el 90% de) las posiciones de aminoácidos Ala137-Ser192 de la SEC ID N° 2, o posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano, cuando dicha secuencia está dispuesta conformacionalmente como ocurre en la secuencia del factor B de longitud completa natural. Un modelo de la estructura tridimensional del factor B, que ilustra un epítipo para mAb1379, se ilustra en la figura 4 y la figura 5, por ejemplo. Tal como se usa en el presente documento, la "estructura tridimensional" o "estructura terciaria" de una proteína se refiere a la disposición de los componentes de la proteína en tres dimensiones. Dicha expresión es bien conocida por los expertos en la materia. Tal como se usa en el presente documento, el término "modelo" se refiere a una representación en un medio tangible de la estructura tridimensional de una proteína, polipéptido o péptido. Por ejemplo, un modelo puede ser una representación de la estructura tridimensional en un archivo electrónico, en la pantalla de un ordenador, en un trozo de papel (es decir, en un medio bidimensional) y/o como una figura de bolas y varillas.

Tal como se describe en el presente documento, un "epítipo" de una proteína o péptido u otra molécula dada se

define en general, con respecto a anticuerpos, como parte de o sitio en una molécula más grande al que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se unirá, y contra el que se producirá un anticuerpo. El término epítipo puede usarse de forma intercambiable con el término “determinante antigénico”, “sitio de unión al anticuerpo” o “superficie de unión conservada” de una proteína o antígeno dado. Más específicamente, un epítipo puede estar definido tanto por los residuos de aminoácidos implicados en la unión al anticuerpo como también por su conformación en el espacio tridimensional (por ejemplo, un epítipo conformacional o la superficie de unión conservada). Un epítipo puede estar incluido en péptidos de tan solo aproximadamente 4-6 residuos de aminoácidos, o puede estar incluido en segmentos más grandes de una proteína, y no es necesario que esté constituido por residuos de aminoácidos contiguos cuando se trata de una estructura tridimensional de un epítipo, particularmente con respecto a un epítipo de unión al anticuerpo. Los epítipos de unión al anticuerpo son frecuentemente epítipos conformacionales en lugar de un epítipo secuencial (es decir, epítipo lineal), o en otras palabras, un epítipo definido por residuos de aminoácidos dispuestos en tres dimensiones sobre la superficie de una proteína o polipéptido al que se une un anticuerpo. Tal como se ha mencionado anteriormente, el epítipo conformacional no está constituido por una secuencia contigua de residuos de aminoácido, sino que en su lugar, los residuos están quizás separados ampliamente en la secuencia primaria de la proteína, y se juntan entre sí para formar una superficie de unión por el modo en que la proteína se pliega en su conformación nativa en tres dimensiones. El epítipo reconocido por el mAb1379 es un epítipo conformacional que no es un epítipo lineal.

Un experto en la materia puede identificar y/o ensamblar epítipos conformacionales y/o epítipos secuenciales usando técnicas conocidas, incluyendo análisis mutacional (por ejemplo, mutagénesis dirigida); protección de la degradación proteolítica (huellas de proteínas); análisis de mimótopo usando, por ejemplo, péptidos sintéticos y pepscan, BIACORE o ELISA; mapeo por competición de anticuerpos; cribado de biblioteca de péptidos combinatorios; espectrometría de masas de tiempo de vuelo y desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF); o modelización tridimensional (por ejemplo, usando cualquier programa informático adecuado, incluyendo, aunque sin limitarse a, MOLSCRIPT 2.0 (Avatar Software AB, Heleneborgsgatan 21C, SE-11731 Estocolmo, Suecia), el programa de visualización gráfica O (Jones et. al., Acta Crystallography, vol. A47, p. 110, 1991), el programa de visualización gráfica GRASP, o el programa de visualización gráfica INSIGHT). Por ejemplo, se puede usar sustitución molecular u otras técnicas y la estructura tridimensional conocida de una proteína relacionada para modelizar la estructura tridimensional del factor B y predecir el epítipo conformacional de anticuerpo que se une a esta estructura. De hecho, se puede usar una o cualquier combinación de dichas técnicas para definir el epítipo de unión al anticuerpo. Las figuras 4 y 5 ilustran el uso de modelización tridimensional, combinado con información de análisis de mimótopo y análisis mutacional, para identificar el epítipo de un anticuerpo para factor B útil en la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “se une selectivamente a” se refiere a la unión específica de una proteína a otra (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento del mismo, o socio de unión a un antígeno), en el que el nivel de unión, según lo medido mediante cualquier ensayo convencional (por ejemplo, un inmunoensayo), es de forma estadística significativamente mayor que el control de fondo para el ensayo. Por ejemplo, cuando se realiza un inmunoensayo, los controles típicamente incluyen una reacción pocillo/tubo que contienen anticuerpo o fragmento de unión al antígeno en solitario (es decir, en ausencia de antígeno), en el que una cantidad de reactividad (por ejemplo, unión no específica al pocillo) por el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo en ausencia del antígeno se considera que es fondo. La unión puede medirse usando diversos métodos convencionales en la técnica, incluyendo, aunque sin limitarse a: transferencia de Western, inmunotransferencia, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, resonancia del plasmón superficial, quimioluminiscencia, polarización fluorescente, fosforescencia, análisis inmunohistoquímico, espectrometría de masas de tiempo de vuelo y desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF), microcitometría, micromatriz, microscopía, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y citometría de flujo.

Una realización de la presente invención incluye el uso de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que es un inhibidor competitivo de la unión del factor B al anticuerpo anti-factor B (por ejemplo, anticuerpo monoclonal 1379) para inhibir el daño fisiológico y los efectos asociados con LCT o LME. De acuerdo con la presente invención, un inhibidor competitivo de la unión del factor B a un anticuerpo anti-factor B de la presente invención es un inhibidor (por ejemplo, otro anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o polipéptido) que se une al factor B en el mismo o un epítipo similar que el anticuerpo anti-factor B conocido de la presente invención (por ejemplo, mAb 1379) de modo que la unión del anticuerpo anti-factor B conocido al factor B es inhibida. Un inhibidor competitivo puede unirse a la diana (por ejemplo, el factor B) con una mayor afinidad por la diana que el anticuerpo anti-factor B. Un inhibidor competitivo puede usarse de una manera similar a la descrita en el presente documento para el anticuerpo anti-factor B 1379 (por ejemplo, para inhibir la vía alternativa del complemento, para inhibir el daño fisiológico o los efectos causados por LCT o LME). Por ejemplo, una realización de la invención se refiere al uso de un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al factor B, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo inhibe de forma competitiva mAb1379 para unión específica al factor B, y en el que, cuando el anticuerpo o fragmento del mismo se une al factor B, la vía alternativa del complemento es inhibida o como alternativa, la capacidad de mAb1379 para inhibir la vía alternativa del complemento es inhibida. Otra realización se refiere al uso de un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une específicamente al factor B, en el que el anticuerpo aislado o fragmento del mismo se une de forma competitiva a un segundo

anticuerpo o fragmento del mismo para unión específica al factor B, y en el que el segundo anticuerpo o fragmento del mismo se une al tercer dominio de la SCR del factor B.

5 Pueden realizarse ensayos competitivos usando técnicas convencionales en la técnica (por ejemplo, ELISA competitivo u otros ensayos de unión). Por ejemplo, inhibidores competitivos pueden detectarse y cuantificarse por su capacidad para inhibir la unión del factor B a un anticuerpo anti-factor B marcado conocido (por ejemplo, el mAb 1379). Ensayos competitivos anticuerpo-anticuerpo en presencia de factor B humano se describen en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos N° 2005-0260198-A1 y en la publicación PCT N° WO 2005/077417, *supra*. Los inhibidores competitivos de la unión del factor B a anti-factor B 1379 también se describen en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos N° 2005-0260198-A1 y en la publicación PCT N° WO 10 2005/077417, *supra*.

15 Los anticuerpos descritos en el presente documento se caracterizan porque comprenden dominios de inmunoglobulina y, por lo tanto, son miembros de la superfamilia de proteína de la inmunoglobulina. En términos generales, una molécula de anticuerpo comprende dos tipos de cadenas. Un tipo de cadena se denomina como la cadena pesada o H y el otro se denomina como la cadena ligera o L. Las dos cadenas están presentes en una proporción equimolar, con cada molécula de anticuerpo teniendo típicamente dos cadenas H y dos cadenas L. Las dos cadenas H están enlazadas entre sí por puentes disulfuro y cada cadena H está enlazada a una cadena L por un puente disulfuro. Solamente hay dos tipos de cadenas L denominadas como cadenas lambda (λ) y kappa (κ). En 20 contraste, existen cinco clases fundamentales de cadena H denominadas como isotipos. Las cinco clases incluyen inmunoglobulina M (IgM o μ), inmunoglobulina D (IgD o δ), inmunoglobulina G (IgG o γ), inmunoglobulina A (IgA o α) e inmunoglobulina E (IgE o ϵ). Las características distintivas entre dichos isotipos están definidas por el dominio constante de la inmunoglobulina y se describen en detalle a continuación. Las moléculas de inmunoglobulina humana comprenden nueve isotipos, IgM, IgD, IgE, cuatro subclases de IgG incluyendo IgG1 (γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 25 (γ 3) e IgG4 (γ 4), y dos subclases de IgA incluyendo IgA1 (α 1) e IgA2 (α 2). En seres humanos, la subclase 3 de IgG e IgM son los activadores del complemento más potentes (sistema clásico del complemento), mientras que la subclase 1 y, en una medida aún menor, 2 de IgG, son activadores moderados a bajos del sistema clásico del complemento. La subclase IgG4 no activa el sistema del complemento (clásico o alternativo). El único isotipo de inmunoglobulina humana que se conoce que activa el sistema alternativo del complemento es IgA. En ratones, las subclases de IgG 30 son IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. IgG1 murina no activa el complemento, mientras que IgG2a, IgG2b e IgG3 son activadores del complemento.

35 Cada cadena H o L de una molécula de inmunoglobulina comprende dos regiones denominadas como dominios variables de cadena L (dominios V_L) y dominios constantes de cadena L (dominios C_L), y dominios variables de cadena H (dominios V_H) y dominios constantes de cadena H (dominios C_H). Un dominio C_H completo comprende tres subdominios (CH1, CH2, CH3) y una región bisagra. Juntas, una cadena H y una cadena L pueden formar un brazo de una molécula de inmunoglobulina que tiene una región variable de inmunoglobulina. Una molécula de inmunoglobulina completa comprende dos brazos asociados (por ejemplo, enlazados por disulfuro). Por lo tanto, cada brazo de una inmunoglobulina entera comprende una región V_{H+L} y una región C_{H+L} . Tal como se usa en el presente documento, la expresión "región variable" o "región V" se refiere a una región V_{H+L} (también conocida como un fragmento Fv), una región V_L o una región V_H . Además, tal como se usa en el presente documento, la expresión 40 "región constante" o "región C" se refiere a una región C_{H+L} , una región C_L o una región C_H .

45 La digestión limitada de una inmunoglobulina con una proteasa puede producir dos fragmentos. Un fragmento de unión al antígeno se denomina como un fragmento Fab, Fab' o $F(ab')_2$. Un fragmento que carece de la capacidad de unirse al antígeno se denomina como un fragmento Fc. Un fragmento Fab comprende un brazo de una molécula de inmunoglobulina que contiene una cadena L (dominios $V_L + C_L$) emparejada con la región V_H y una sección de la región C_H (dominio CH1). Un fragmento Fab' corresponde a un fragmento Fab con parte de la región bisagra fijada al dominio CH1. Un fragmento $F(ab')_2$ corresponde a dos fragmentos Fab' que normalmente están enlazados 50 covalentemente entre sí a través de un puente disulfuro, típicamente en las regiones bisagra.

El dominio C_H define el isotipo de una inmunoglobulina y otorga diferentes características funcionales dependiendo del isotipo. Por ejemplo, las regiones constantes μ permiten la formación de agregados pentaméricos de moléculas de IgM y las regiones constantes α permiten la formación de dímeros. 55

La especificidad antigénica de una molécula de inmunoglobulina es otorgada por la secuencia de aminoácidos de una región variable, o V. Por lo tanto, las regiones V de diferentes moléculas de inmunoglobulina pueden variar significativamente dependiendo de su especificidad antigénica. Ciertas secciones de una región V están más conservadas que otras y se denominan como regiones marco (regiones FW). En contraste, ciertas secciones de una 60 región V son altamente variables y se designan como regiones hipervariables. Cuando los dominios V_L y V_H se emparejan en una molécula de inmunoglobulina, las regiones hipervariables de cada dominio se asocian y crean bucles hipervariables que forman los sitios de unión al antígeno. Por lo tanto, los bucles hipervariables determinan la especificidad de una inmunoglobulina y se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDR) debido a que sus superficies son complementarias a antígenos. 65

La variabilidad adicional de las regiones V es otorgada por variabilidad combinatoria de segmentos génicos que codifican una región V de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina comprenden múltiples segmentos génicos de línea germinal que se reordenan de forma somática para formar un gen de inmunoglobulina reordenado que codifica una molécula de inmunoglobulina. Las regiones V_L son codificadas por un segmento génico V de cadena L y un segmento génico J (segmento de unión). Las regiones V_H son codificadas por un segmento génico V de cadena H, segmento génico D (segmento de diversidad) y segmento génico J (segmento de unión).

Un segmento génico V tanto de cadena L como de cadena H contienen tres regiones de variabilidad de secuencia de aminoácidos sustancial. Dichas regiones se denominan como CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena L, y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena H, respectivamente. La longitud de una CDR1 de cadena L puede variar sustancialmente entre diferentes regiones V_L. Por ejemplo, la longitud de CDR1 puede variar entre aproximadamente 7 aminoácidos y aproximadamente 17 aminoácidos. En contraste, las longitudes de la CDR2 y la CDR3 de cadena L típicamente no varían entre diferentes regiones V_L. La longitud de una CDR3 de cadena H puede variar sustancialmente entre diferentes regiones V_H. Por ejemplo, la longitud de CDR3 puede variar entre aproximadamente 1 aminoácido y aproximadamente 20 aminoácidos. Cada región CDR de cadena H y L está flanqueada por regiones FW.

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

El anticuerpo puede ser un anticuerpo bi- o multiespecífico. Un anticuerpo biespecífico (o multiespecífico) es capaz de unirse a dos (o más) antígenos, como con un anticuerpo divalente (o multivalente), pero en este caso, los antígenos son antígenos diferentes (es decir, el anticuerpo muestra especificidad doble o mayor). Por ejemplo, un anticuerpo que se une selectivamente a una proteína en la vía alternativa del complemento de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, un anticuerpo anti-factor B tal como se describe en el presente documento) puede construirse como un anticuerpo biespecífico, mientras que la especificidad de unión al segundo antígeno es para una diana deseada. Por lo tanto, un anticuerpo biespecífico abarcado por la presente invención incluye un anticuerpo que tiene: (a) una primera sección (por ejemplo, una primera sección de unión al antígeno) que se une a una proteína en la vía alternativa del complemento (por ejemplo, factor B); y (b) una segunda sección que se une a una molécula de la superficie celular expresada por una célula. En esta realización, la segunda sección puede unirse a cualquier molécula de la superficie celular. Una molécula de la superficie celular preferida es un receptor o ligando, de modo que el anticuerpo está dirigido a un tipo de célula o tejido particular y/o a un sitio particular en un animal al que el anticuerpo es administrado. En una realización, la especificidad de unión al segundo antígeno es para un receptor del complemento. Un receptor del complemento particularmente preferido incluye, aunque sin limitarse a, el receptor del complemento de tipo 2 (CR2). Los anticuerpos que se unen selectivamente a CR2 y podrían, por lo tanto, ser usados en esta realización de la invención se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 6.820.011.

En un ejemplo, los anticuerpos pueden incluir anticuerpos humanizados. Los anticuerpos humanizados son moléculas que tienen un sitio de unión al antígeno derivado de una inmunoglobulina de una especie no humana, estando las partes de la molécula derivadas de inmunoglobulina restantes derivadas de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión al antígeno puede comprender regiones variables completas fusionadas en dominios constantes humanos o solamente las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) injertadas sobre regiones marco humanas apropiadas en los dominios variables. Los anticuerpos humanizados pueden producirse, por ejemplo, modelizando los dominios variables del anticuerpo, y produciendo los anticuerpos usando técnicas de ingeniería genética, tales como injerto de CDR (descrito a continuación). Una descripción de diversas técnicas para la producción de anticuerpos humanizados se encuentra, por ejemplo, en los documentos Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 81: 6851-55; Whittle et al. (1987) Prot. Eng. 1: 499-505; Co et al. (1990) J. Immunol. 148: 1149-1154; Co et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 88: 2869-2873; Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 4285-4289; Routledge et al. (1991) Eur. J. Immunol. 21: 2717-2725 y las publicaciones de patente PCT N° WO 91/09967; WO 91/09968 y WO 92/113831.

Los anticuerpos aislados descritos en el presente documento pueden incluir suero que contiene dichos anticuerpos, o anticuerpos que han sido purificados en grados variables. Los anticuerpos enteros de la presente invención pueden ser policlonales o monoclonales. Como alternativa, equivalentes funcionales de anticuerpos enteros, tales

como fragmentos de unión al antígeno en los que uno o más dominios de anticuerpo están truncados o ausentes (por ejemplo, fragmentos Fv, Fab, Fab' o F(ab)2), así como anticuerpos manipulados genéticamente o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, incluyendo anticuerpos monocatenarios, anticuerpos humanizados (descritos anteriormente), anticuerpos que pueden unirse a más de un epítipo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), o anticuerpos que pueden unirse a uno o más antígenos diferentes (por ejemplo, anticuerpos bi- o multispecíficos), también pueden emplearse en la invención.

Los anticuerpos manipulados genéticamente descritos en el presente documento incluyen aquellos producidos mediante técnicas de ADN recombinante convencionales que implican la manipulación y reexpresión de ADN que codifica regiones variables y/o constantes de anticuerpos. Ejemplos particulares incluyen, anticuerpos quiméricos, donde los dominios V_H y/o V_L del anticuerpo proceden de una fuente diferente en comparación con el resto del anticuerpo, y anticuerpos injertados con CDR (y fragmentos de unión al antígeno de los mismos), en los que al menos una secuencia CDR y opcionalmente al menos un aminoácido de la región marco variable se deriva o derivan de una fuente y las secciones restantes de las regiones variable y constante (según sea apropiado) se derivan de una fuente diferente. La construcción de anticuerpos quiméricos e injertados con CDR se describen, por ejemplo, en las solicitudes de patente europea: EP-A 0194276, EP-A 0239400, EP-A 0451216 y EP-A 0460617.

En un ejemplo, se producen anticuerpos quiméricos que comprenden dominios variables de anticuerpo que se unen a una proteína en la vía alternativa del complemento (por ejemplo, el factor B) y fusionada a estos dominios, una proteína que sirve como segunda fracción de dirección. Por ejemplo, la fracción de dirección puede incluir una proteína que está asociada con la célula o tejido que será la diana o con un sistema particular en el animal. Por ejemplo, la fracción de dirección puede ser una selectina o una sección de un receptor del complemento. Un receptor del complemento preferido a usar en este aspecto de la invención incluye el receptor del complemento de tipo 2 (CR2). El uso de CR2 y secciones del mismo en una proteína de fusión o quimérica (por ejemplo, como un sistema de administración) se describe en detalle en la Patente de Estados Unidos N° 6.820.011.

Generalmente, en la producción de un anticuerpo, un animal experimental adecuado, tal como, por ejemplo, aunque sin limitarse a, un conejo, una oveja, un hámster, una cobaya, un ratón, una rata o un pollo, es expuesto a un antígeno contra el que se desea un anticuerpo. Típicamente, un animal es inmunizado con una cantidad eficaz de antígeno que es inyectada en el animal. Una cantidad eficaz de antígeno se refiere a una cantidad necesaria para inducir la producción de anticuerpos por el animal. Al sistema inmunitario del animal se le permite a continuación responder durante un periodo de tiempo predeterminado. El proceso de inmunización puede repetirse hasta que se descubre que el sistema inmunitario produce anticuerpos para el antígeno. Para obtener anticuerpos policlonales específicos para el antígeno, se recoge suero del animal que contiene los anticuerpos deseados (o en el caso de un pollo, el anticuerpo puede recogerse de los huevos). Dicho suero es útil como reactivo. Los anticuerpos policlonales pueden purificarse adicionalmente del suero (o los huevos) tratando, por ejemplo, el suero con sulfato de amonio.

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

Un método preferido para producir anticuerpos de la presente invención incluye (a) administrar a un animal una cantidad eficaz de una proteína o péptido (por ejemplo, una proteína o péptido de factor B que incluye dominios del mismo) para producir los anticuerpos y (b) recuperar los anticuerpos. En otro método, los anticuerpos de la presente invención se producen de forma recombinante. Por ejemplo, una vez que se ha obtenido una línea celular, por ejemplo un hibridoma, que expresa un anticuerpo de acuerdo con la invención, es posible clonar a partir de ella el ADNc e identificar los genes de la región variable que codifican el anticuerpo deseado, incluyendo las secuencias que codifican las CDR. A partir de aquí, pueden obtenerse anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con la invención preparando uno o más vectores de expresión replicables que contienen al menos la secuencia de ADN que codifica el dominio variable de la cadena pesada o ligera del anticuerpo y opcionalmente otras secuencias de ADN que codifican secciones restantes de las cadenas pesada y/o ligera según se desee, y transformando/transfectando una célula huésped apropiada, en la que tendrá lugar la producción del anticuerpo. Los huéspedes de expresión adecuados incluyen bacterias, (por ejemplo, una cepa de *E. coli*), hongos, (en particular levaduras, por ejemplo miembros de los géneros *Pichia*, *Saccharomyces* o *Kluyveromyces*), y líneas celulares de mamífero, por ejemplo una línea celular que no produce mieloma, tal como una línea NSO de ratón o células CHO. Para obtener transcripción y traducción eficiente, la secuencia de ADN en cada vector debe incluir secuencias reguladoras apropiadas, particularmente una secuencia promotora y una líder unidas de forma operativa a la secuencia del dominio variable. Métodos particulares para producir anticuerpos de esta manera son generalmente bien conocidos y usados de forma rutinaria. Por ejemplo, procedimientos básicos de biología molecular son descritos por Maniatis et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989); la secuencia de ADN puede realizarse tal como se describe en el documento Sanger et al. (PNAS 74, 5463, (1977)) y el manual de secuenciación de Amersham International plc; y la mutagénesis dirigida puede llevarse a cabo de acuerdo con el método de Kramer et al. (Nucl. Acids Res. 12, 9441, (1984)) y el manual de Anglian Biotechnology Ltd.

Adicionalmente, existen numerosas publicaciones, incluyendo memorias descriptivas de patentes, que detallan técnicas adecuadas para la preparación de anticuerpos mediante manipulación de ADN, creación de vectores de expresión y transformación de células apropiadas, por ejemplo según lo revisado por Mountain A y Adair, J R en *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* (ed. Tombs, M P, 10), Capítulo 1, 1992, Intercept, Andover, RU) y en las solicitudes de patente europea mencionadas anteriormente.

Métodos alternativos, que emplean, por ejemplo, tecnología de presentación en fagos (véase por ejemplo los documentos US 5969108, US 5565332, US 5871907, US 5858657) o el método de anticuerpo linfocito seleccionado del documento US 5627052 también puede usarse para la producción de anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo de la invención, tal como será fácilmente evidente para el experto en la materia.

También se describe el uso de polipéptidos no anticuerpos, algunas veces denominados como socios de unión al antígeno o polipéptidos de unión al antígeno, que han sido diseñados para unirse selectivamente a y causar la neutralización o inhibición de una proteína de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos del diseño de dichos polipéptidos, que posee una especificidad por ligando prescrita se dan en el documento Beste et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 1898-1903, 1999).

La presente invención también incluye una formulación o composición para reducir el daño fisiológico asociado con LCT o LME. La formulación comprende: (a) uno o más inhibidores cualesquiera de la vía alternativa del complemento, tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo anti-factor B descrito en el presente documento); y (b) al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

La formulación o composición puede incluir uno o más agentes adicionales, tales como otro agente que es adecuado para tratar al menos un síntoma de, o el daño fisiológico asociado con, LCT (por ejemplo, fármacos osmóticos, sedantes, analgésicos, relajantes musculares, barbitúricos, etc.). Además, la formulación puede administrarse a un paciente junto con otra terapia o protocolo que se usa para tratar o mejorar el daño asociado con LCT. Dichas terapias o protocolos incluyen, aunque sin limitarse a: reducción de lesiones masivas mediante evacuación quirúrgica de hematomas intracraneales; la reducción de la tumefacción cerebral con fármacos osmóticos (por ejemplo, manitol); el drenaje terapéutico de líquido cefalorraquídeo (LCR) a través de catéteres intraventriculares; consecución y mantenimiento de intercambio de gases adecuado y estabilidad circulatoria; prevención de hipoxemia e hipercarbia; exploraciones por TC repetidas para la detección de patología intracraneal secundaria retardada; sedación profunda y analgesia para evitar el estrés y el dolor; consecución y mantenimiento de PPC óptima (> 70 mmHg) y equilibrio del oxígeno cerebral; evitación de hipertermia (< 38°C); prevención de hiperglucemia e hiponatremia; prevención de elevación de la cabeza realizada de forma rutinaria; prevención de úlceras por estrés y mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal; profilaxis para factores de complicación (por ejemplo neumonía o meningitis); terapia dirigida a la presión intracraneal (PIC) (por ejemplo, profundización de la sedación, analgesia, relajación muscular; drenaje de LCR a través de catéteres ventriculares; hiperventilación moderada en ciertas circunstancias; osmoterapia; hipotermia moderada (\pm 34°C); y/o coma inducido por barbitúricos); y/o atenuación de la neuroinflamación permitida por gases (CO). Diversos tratamientos para LCT son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en los documentos Royo et al., 2003, *Current Opin. Pharmacol.* 3: 27-32; Dutton y McCunn, 2003, *Current Opin. Crit. Care* 9: 503-509; Elf et al., 2003, *Eur. J. Trauma* 29: 74-80; Ghajar et al., 2000, *Lancet* 356: 923-929.

La formulación o composición puede incluir uno o más agentes adicionales, tales como otro agente que es adecuado para tratar al menos un síntoma de, o daño fisiológico asociado con, LME (por ejemplo, esteroides, tales como metilprednisolona). Además, la formulación puede administrarse a un paciente junto con otra terapia o protocolo que se usa para tratar o mejorar el daño asociado con LME. Dichas terapias o protocolos incluyen, aunque sin limitarse a: inmovilización de la columna; descompresión quirúrgica; cirugía para estabilizar las vértebras; cirugía para realinear las vértebras; tracción. Diversos tratamientos para LME son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento Ramer et al., 2005, *Spinal Cord* 43(3): 134-61.

De acuerdo con la presente invención, un "portador farmacéuticamente aceptable" incluye excipientes farmacéuticamente aceptables y/o vehículos de administración farmacéuticamente aceptables, que son adecuados para uso en la administración de una formulación o composición a un sitio *in vivo* adecuado. Un sitio *in vivo* adecuado es, preferentemente, cualquier sitio en el que la vía alternativa del complemento puede inhibirse, pero en una realización preferida, es en el tejido cerebral de un paciente que presenta o que corre el riesgo de desarrollar, daño fisiológico asociado con LCT o LME. Los portadores farmacéuticamente aceptables preferidos son capaces de mantener a un agente usado en una formulación de la invención en una forma que, en el momento de la llegada del agente al sitio diana en un paciente, el agente es capaz de actuar sobre su diana (por ejemplo, una proteína que es un componente de la vía alternativa del complemento), dando como resultado preferentemente un beneficio terapéutico para el paciente.

Excipientes adecuados de la presente invención incluyen excipientes o especialidades farmacéuticas que transportan o ayudan a transportar, pero no dirigen específicamente una composición a una célula o tejido (también denominada en el presente documento como portadores no directores). Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque sin limitarse a agua, solución salina tamponada con fosfato,

- solución de Ringer, solución de dextrosa, soluciones que contienen suero, solución de Hank, otras soluciones acuosas fisiológicamente equilibradas, aceites, ésteres y glicoles. Los portadores acuosos pueden contener sustancias auxiliares adecuadas que se requiere que se aproximen a las condiciones fisiológicas del receptor, por ejemplo, incrementando la estabilidad química y la isotonicidad. Las sustancias auxiliares adecuadas incluyen, por ejemplo, acetato sódico, cloruro sódico, lactato sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico y otras sustancias usadas para producir tampón fosfato, tampón Tris, y tampón bicarbonato. Las sustancias auxiliares también pueden incluir conservantes, tales como timerosal, m- u o-cresol, formalina y alcohol bencílico. Las formulaciones de la presente invención pueden esterilizarse mediante métodos convencionales y/o liofilizarse.
- Un tipo de portador farmacéuticamente aceptable incluye una formulación de liberación controlada que es capaz de liberar lentamente una composición de la presente invención en un animal. Tal como se usa en el presente documento, una formulación de liberación controlada comprende un agente de la presente invención en un vehículo de liberación controlada. Los vehículos de liberación controlada adecuados, aunque sin limitarse a, polímeros biocompatibles, otras matrices poliméricas, cápsulas, microcápsulas, micropartículas, preparaciones en embolada, bombas osmóticas, dispositivos de difusión, liposomas, lipoesferas, y sistemas de administración transdérmica. Otros portadores adecuados incluyen cualquier portador que puede unirse a o incorporarse con el agente que prolonga la semivida del agente a administrar. Dicho portador puede incluir cualquier portador de proteínas adecuado o incluso un segmento de fusión que prolonga la semivida de una proteína cuando se administra *in vivo*. Los vehículos de administración adecuados se han descrito anteriormente en el presente documento, e incluyen, aunque sin limitarse a liposomas, vectores virales u otros vehículos de administración, incluyendo ribozimas. Los vehículos de administración que contienen lípidos naturales incluyen células y membranas celulares. Los vehículos de administración que contienen lípidos artificiales incluyen liposomas y micelas. Un vehículo de administración tal como se describe en el presente documento puede modificarse para dirigirse a un sitio particular en un paciente, dirigiendo y haciendo uso de este modo de un agente inhibidor en ese sitio. Las modificaciones adecuadas incluyen manipular la fórmula química de la sección lipídica del vehículo de administración y/o introducir en el vehículo un agente de dirección capaz de dirigir específicamente un vehículo de administración a un sitio preferido, por ejemplo, un tipo celular preferido. Otros vehículos de administración adecuados incluyen partículas de oro, conjugados moleculares de poli-L-lisina/ADN, y cromosomas artificiales.
- Un portador farmacéuticamente aceptable que es capaz de dirigir se denomina como un “vehículo de administración de dirección”. Los vehículos de administración de dirección de la presente invención son capaces de administrar una formulación, que incluye un agente inhibidor, a un sitio diana en un paciente. Un “sitio diana” se refiere a un sitio en un paciente al que se desea administrar una formulación terapéutica. Por ejemplo, un sitio diana puede ser cualquier célula o tejido que es una diana mediante inyección directa o administración usando liposomas, vectores virales u otros vehículos de administración, incluyendo ribozimas. Un vehículo de administración tal como se describe en el presente documento puede modificarse para dirigirse a un sitio particular en un animal, dirigiendo y haciendo uso de este modo de una molécula de ácido nucleico en ese sitio. Las modificaciones adecuadas incluyen manipular la fórmula química de la sección lipídica del vehículo de administración y/o introducir en el vehículo un compuesto capaz de dirigir específicamente un vehículo de administración a un sitio preferido, por ejemplo, una célula o tipo de tejido preferido (por ejemplo, al cerebro o al sistema nervioso central). Específicamente, dirigir se refiere a hacer que un vehículo de administración se una a una célula particular mediante la interacción del compuesto en el vehículo con una molécula en la superficie de la célula. Los compuestos de dirección apropiados incluyen ligandos capaces de unirse selectivamente (es decir, específicamente) a otra molécula en un sitio particular. Los ejemplos de dichos ligandos incluyen anticuerpos, antígenos, receptores y ligandos del receptor. Ejemplos particularmente útiles incluyen cualesquiera ligandos que están asociados con la vía del complemento (por ejemplo, CR2, C3, C3d, C3dg, iC3b, C3b) o cualesquiera ligandos (por ejemplo, selectinas) que están asociados con el tipo de célula, tipo de tejido, o sitio en el animal a tratar.
- Manipular la fórmula química de la sección lipídica del vehículo de administración puede modular la dirección extracelular o intracelular del vehículo de administración. Por ejemplo, puede añadirse un producto químico a la fórmula lipídica de un liposoma que altera la carga de la bicapa lipídica del liposoma, de modo que el liposoma se fusione con células particulares que tienen características de carga particulares. En un ejemplo, un vehículo de administración de dirección puede ser una formulación que permite que un compuesto atraviese la barrera hematoencefálica.
- Un vehículo de administración útil para diversas vías y agentes de administración es un liposoma. Un liposoma es capaz de seguir siendo estable en un animal durante una cantidad de tiempo suficiente para administrar una molécula de ácido nucleico descrita en la presente invención a un sitio preferido en el animal. Un liposoma, de acuerdo con la presente invención, comprende una composición lipídica que es capaz de administrar una molécula de ácido nucleico u otro compuesto a un sitio particular, o seleccionado, en un animal. Un liposoma de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento comprende una composición lipídica que es capaz de fusionarse con la membrana plasmática de la célula diana para administrar una molécula de ácido nucleico al interior de una célula. Los liposomas adecuados para uso con la presente invención incluyen cualquier liposoma. Los liposomas de la presente invención preferidos incluyen aquellos liposomas usados típicamente en, por ejemplo, métodos de administración de genes conocidos por los expertos en la materia. Los liposomas más preferidos comprenden liposomas que tienen una composición lipídica policatiónica y/o liposomas que tienen una estructura principal de

colesterol conjugada a polietilenglicol. Complejar un liposoma con una molécula de ácido nucleico o agente inhibidor de la presente invención puede conseguirse usando métodos convencionales en la técnica.

5 Otro vehículo de administración comprende un vector viral. Un vector viral incluye una molécula de ácido nucleico aislada útil en el método de la presente invención, en el que las moléculas de ácido nucleico están empaquetadas en un revestimiento viral que permite la entrada de ADN al interior de una célula. Pueden usarse una serie de vectores virales, incluyendo, aunque sin limitarse a, los basados en alfavirus, poxvirus, adenovirus, herpesvirus, lentivirus, virus adenoasociados y retrovirus.

10 Los agentes y formulaciones, tal como se describen en el presente documento, pueden administrarse a cualquier animal o paciente, y preferentemente a seres humanos. De acuerdo con la presente invención, la administración de un agente o formulación es útil para inhibir cualquier síntoma de daño fisiológico asociado con LCT, LME o afecciones similares o relacionadas. Los pacientes que son candidatos adecuados para el método de la presente invención incluyen, aunque sin limitarse a, pacientes que presentan, o que corren el riesgo de desarrollar (por
15 ejemplo, es probable o se ha predicho que desarrollarán), daño fisiológico al cerebro o la médula espinal y afecciones relacionadas con este daño, como resultado de lesión (incluyendo lesión traumática) o enfermedad.

De acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, la determinación de protocolos aceptables para administrar un agente o una composición que incluye el agente, incluyendo la vía de administración y la cantidad eficaz de un agente a administrar a un animal, puede ser conseguida por los expertos en la materia. Un agente o composición tal como se describe en el presente documento puede administrarse *in vivo* o *ex vivo*. Las vías de administración *in vivo* adecuadas pueden incluir, aunque sin limitarse a, vías oral, nasal, por inhalación, tópica, intratraqueal, transdérmica, rectal, cerebral (por ejemplo, intracraneal), medular (por ejemplo, intramedular o al espacio epidural de la médula espinal) y parenteral. Las vías parenterales preferidas pueden incluir, aunque sin
25 limitarse a, vías subcutánea, intradérmica, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal. Las vías tópicas preferidas incluyen inhalación por aerosol (es decir, pulverización) o administración superficial tópica a la piel de un animal. Preferentemente, un agente se administra mediante vías sistémicas (por ejemplo, intraperitoneal, intravenosa), con administración intravenosa siendo particularmente preferida, o mediante administración al cerebro, la médula espinal o el espacio epidural de la médula espinal. Para lesión cerebral traumática, se prefiere administración mediante administración intravenosa o al cerebro. Para lesión de médula espinal, se prefiere administración por administración intravenosa, administración a la médula espinal o administración al espacio epidural de la médula espinal. *Ex vivo* se refiere a realizar parte de la etapa de administración fuera del paciente.

Las técnicas para la administración de agentes y composiciones al cerebro y al sistema nervioso central incluyen, aunque sin limitarse a, administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración intraarterial con alteración de la barrera hematoencefálica, infusión continua de fármacos a través del cerebro usando métodos de administración mejorada por convección, implantación, infusión intratecal, administración intraventricular, administración intersticial y administración intramedular. Las administraciones intravenosa, intraperitoneal, intramuscular e intramedular pueden realizarse usando métodos convencionales en la técnica. La administración mediante aerosol (inhalación) puede realizarse usando métodos convencionales en la técnica (véase, por ejemplo, el documento Stribling et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 189: 11277-11281, 1992. Los portadores adecuados para administración mediante aerosol se han descrito anteriormente. Los dispositivos para administración de formulaciones en aerosol incluyen, aunque sin limitarse a, inhaladores dosificadores presurizados (MDI), inhaladores de polvo seco (DPI), y dispositivos dosificadores de solución (MSI), e incluyen dispositivos que son nebulizadores e inhaladores. La administración oral puede realizarse complejando una composición terapéutica de la presente invención con un portador capaz de resistir la degradación por enzimas digestivas en el intestino de un animal. Los ejemplos de dichos portadores, incluyen cápsulas de plástico o comprimidos, tales como los conocidos en la técnica. Técnicas de inyección directa son particularmente útiles para administrar una molécula de ácido nucleico recombinante a una célula o tejido que es accesible por cirugía, y particularmente, en o cerca de la superficie del cuerpo. La administración de una composición localmente dentro del área de una célula diana se refiere a inyectar la composición a centímetros y preferentemente, a milímetros de la célula o tejido diana.

Diversos métodos de administración y vehículos de administración desvelados en el presente documento han demostrado ser eficaces para la administración de una molécula de ácido nucleico a una célula o tejido diana, con lo
55 que la molécula de ácido nucleico transfectaba la célula y era expresada. En muchos estudios, la administración y expresión con éxito de un gen heterólogo se consiguió en tipos celulares preferidos y/o usando vehículos de administración y vías de administración preferidas de la presente invención. La administración de numerosas secuencias de ácido nucleico a diversos tejidos diana se ha conseguido mediante administración vectores virales que codifican las secuencias de ácido nucleico. (Por ejemplo, véase, de muchos ejemplos, vector retroviral; Blaese et al., 1995, Science 270: 475-480; Bordignon et al., 1995, Science 270: 470-475), administración nasal (vector asociado a CFTR-adenovirus), administración intracoronaria (vector adenoviral y virus hemaglutinante de Japón, véase anteriormente), administración intravenosa (vector viral adenoasociado; Koeberl et al., 1997, Proc Natl Acad Sci EE. UU. 94: 1426-1431). Millecamps et al., describieron la dirección de vectores adenovirales a neuronas usando elementos potenciadores-restrictivos neuronales colocados cadena arriba del promotor para el transgén (promotor de fosfoglicerato). Dichos vectores se administraron a ratones y ratas por vía intramuscular y por vía intracerebral, respectivamente, dando como resultado transfección y expresión específicas de neuronas con éxito del transgén *in*

vivo (Millecamps et al., 1999, Nat. Biotechnol. 17: 865-869). Bennett et al., describieron el uso de un vector viral adenoasociado para administrar y expresar un gen mediante inyección subretiniana en la retina neural *in vivo* durante más de 1 año (Bennett, 1999, *ibid.*).

5 Una dosis individual adecuada de un agente inhibidor a administrar a un animal es una dosis que es capaz de reducir o prevenir al menos un síntoma de daño fisiológico debido a LCT o LME en un animal cuando se administra una o más veces durante un periodo de tiempo adecuado. Una dosis individual preferida de un agente, que incluye proteínas, pequeñas moléculas y anticuerpos, para uso en el método descrito en el presente documento, comprende entre aproximadamente 0,01 microgramos x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 10 miligramos x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal. Una dosis individual más preferida de un agente comprende entre aproximadamente 1 microgramo x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 10 miligramos x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal. Una dosis individual aún más preferida de un agente comprende entre aproximadamente 5 microgramos x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 7 miligramos x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal. Una dosis individual aún más preferida de un agente comprende entre aproximadamente 10 microgramos x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 5 miligramos x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal. Una dosis individual particularmente preferida de un agente comprende entre aproximadamente 0,1 miligramos x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 5 miligramos x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal, si el agente es administrado mediante aerosol. Otra dosis individual particularmente preferida de un agente comprende entre aproximadamente 0,1 microgramos x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 10 microgramos x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal, si el agente es administrado por vía parenteral.

20 En un ejemplo, una dosis individual apropiada de un complejo de ácido nucleico:liposoma de la presente invención es de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 100 µg por kg de peso corporal del paciente al que está siendo administrado el complejo. En otra realización, una dosis individual apropiada es de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 µg por kg de peso corporal. En otra realización, una dosis individual apropiada de complejo de ácido nucleico:lipido es al menos aproximadamente 0,1 µg de ácido nucleico, más preferentemente al menos aproximadamente 1 µg de ácido nucleico, aún más preferentemente al menos aproximadamente 10 µg de ácido nucleico, aún más preferentemente al menos aproximadamente 50 µg de ácido nucleico, y aún más preferentemente al menos aproximadamente 100 µg de ácido nucleico.

30 Una dosis individual preferida de un anticuerpo comprende entre aproximadamente 1 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente menos de 1 mg x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal. Una dosis individual más preferida de un anticuerpo comprende entre aproximadamente 20 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 600 µg x kilogramo⁻¹ de peso corporal del animal. Una dosis individual aún más preferida de un anticuerpo, particularmente cuando la formulación del anticuerpo se administra por nebulización, comprende entre aproximadamente 20 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 600 µg x kilogramo⁻¹ de peso corporal del animal, y más preferentemente, entre aproximadamente 20 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 500 µg x kilogramo⁻¹, y más preferentemente, entre aproximadamente 20 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 400 µg x kilogramo⁻¹, y más preferentemente, entre aproximadamente 20 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 300 µg x kilogramo⁻¹, y más preferentemente, entre aproximadamente 20 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 200 µg x kilogramo⁻¹, y más preferentemente, entre aproximadamente 20 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 100 µg x kilogramo⁻¹, y más preferentemente, entre aproximadamente 20 ng x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 50 µg x kilogramo⁻¹ de peso corporal del animal.

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

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

El anticuerpo puede administrarse a una dosis de menos de aproximadamente 500 µg de anticuerpo por mililitro de

formulación, y preferentemente, menos de aproximadamente 250 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y más preferentemente, menos de aproximadamente 100 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y más preferentemente, menos de aproximadamente 50 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y más preferentemente, menos de aproximadamente 40 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y más preferentemente, menos de aproximadamente 30 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y más preferentemente, menos de aproximadamente 20 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y más preferentemente, menos de aproximadamente 10 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y aún más preferentemente, entre aproximadamente 5 µg de anticuerpo y aproximadamente 10 µg de anticuerpo por mililitro de formulación.

De acuerdo con el método descrito en el presente documento, una cantidad eficaz de un agente que inhibe el daño fisiológico debido a LCT o LME a administrar a un animal comprende una cantidad que es capaz de reducir al menos un síntoma o indicador de daño fisiológico debido a LCT o LME, o es capaz de mejorar la recuperación de LCT o LME, sin ser tóxico para el animal. Una cantidad que es tóxica para un animal comprende cualquier cantidad que causa daño a la estructura o función de un animal (es decir, venenosa).

En un animal que ha padecido LCT o LME, una cantidad eficaz de un agente a administrar a un animal puede ser una cantidad que reduce de forma medible al menos un síntoma o indicador de daño fisiológico debido a LCT o LME en el animal en comparación con antes de la administración del agente o en comparación con en ausencia de administración del agente. Una cantidad eficaz de un agente a administrar a un animal puede ser una cantidad que reduce de forma medible al menos un síntoma o indicador de daño debido a LCT o LME en el animal en comparación con un nivel del síntoma en una población de animales que han padecido LCT o LME sustancialmente similar, en la que el agente no se administró. El agente es, preferentemente, capaz de reducir al menos un síntoma o indicador de daño fisiológico debido a LCT (por ejemplo, daño cerebral) o LME (por ejemplo, daño a la médula espinal) en un animal, incluso cuando el agente es administrado después de la aparición de los síntomas físicos del daño. De la forma más preferente, una cantidad eficaz del agente es una cantidad que reduce el síntoma o síntomas o el indicador o indicadores de daño debido a LCT o LME hasta el punto en que el síntoma o síntomas o el indicador o indicadores ya no se detectan en el paciente. En una realización, una cantidad eficaz del agente puede ser una cantidad que mejora la recuperación del paciente de LCT o LME, según lo medido mediante el cese o la inversión de un síntoma o indicador de daño fisiológico, o según lo medido mediante una mejora en una puntuación biológica, valor o medida de funciones neurales o relacionadas en el paciente, medible o detectable.

Una dosis adecuada de un agente de la presente invención es una dosis eficaz para inhibir la expresión o actividad biológica de al menos una proteína en la vía alternativa del complemento, tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, factor B, factor D o properdina), en comparación con en ausencia de la administración del agente. Métodos de medición de la expresión o actividad biológica de una proteína se han descrito anteriormente. En otra realización, una dosis adecuada de un agente de la presente invención es una dosis que inhibe de forma medible la vía alternativa del complemento de la invención. La activación del complemento y la inhibición del mismo pueden medirse usando técnicas/ensayos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede realizarse un análisis *in vitro* de deposición de C3 sobre partículas de cimosano A tal como se describe en los ejemplos. También se puede poner a prueba la capacidad del agente para inhibir la lisis de eritrocitos insensibilizados por suero humano. La extrapolación de los resultados *in vitro* a dosis *in vivo* en base a estos ensayos está dentro de la capacidad de los expertos en la materia.

Un experto en la materia será capaz de determinar que el número de dosis de un agente a administrar a un animal depende del alcance de la LCT o LME y el daño fisiológico previsto o asociado con la lesión, así como la respuesta de un paciente individual al tratamiento. Métodos para diagnosticar tanto LCT como LME, incluyendo la gravedad de las afecciones, se describen anteriormente y son conocidos en la técnica. Además, el facultativo será capaz de determinar la temporización adecuada para la administración del agente de una manera eficaz para reducir el síntoma o síntomas asociados con o que resultan de LCT o LME en el animal. Preferentemente, el agente es administrado en el plazo de 48 horas, y más preferentemente 36 horas, y más preferentemente 24 horas, y más preferentemente en el plazo de 12 horas, y más preferentemente en el plazo de 6 horas, 5 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas o 1 hora, o incluso minutos después del evento que causó la LCT o LME. En un ejemplo, el agente es administrado en cuando es reconocido (es decir, inmediatamente) por el paciente, facultativo u otra persona que el paciente ha sufrido LCT o LME. En otra realización, el agente es administrado en cuando aparece el primer signo de desarrollo de un síntoma de daño cerebral o neural que puede estar asociado con LCT o LME, y preferentemente, en el plazo de al menos 2 horas desde el desarrollo del síntoma o síntomas, y más preferentemente, en el plazo de al menos 1 hora, y más preferentemente en el plazo de al menos 30 minutos, y más preferentemente en el plazo de al menos 10 minutos, y más preferentemente en el plazo de al menos 5 minutos del desarrollo del síntoma o síntomas. Los síntomas de daño fisiológico asociado con LCT o LME y métodos para medir o detectar dichos síntomas se han descrito en detalle anteriormente. Preferentemente, dichas administraciones se dan hasta que aparecen signos de reducción del daño fisiológico o reducción de los síntomas del potencial de daño fisiológico, y a continuación según sea necesario hasta que los síntomas desaparecen o se detienen.

El método de la presente invención puede usarse en cualquier animal, y particularmente, en cualquier animal de la

clase Vertebrate, Mammalia (es decir, mamíferos), incluyendo, sin limitación, primates, roedores, ganado y mascotas domésticas. Los mamíferos preferidos a tratar usando el método de la presente invención son seres humanos.

5 Los siguientes ejemplos se proporcionan para los fines de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

10 El siguiente ejemplo describe el efecto terapéutico de la administración del inhibidor del complemento, Crry-Ig, sobre las funciones fisiológicas después de lesión cerebral traumática (LCT).

15 Crry-Ig es una fusión entre la proteína y relacionada con el receptor del complemento (Crry) y una molécula de inmunoglobulina Fc. Crry es un homólogo funcional del factor acelerador de la degradación (CD55) y la proteína del cofactor de membrana (CD46) e inhibe la convertasa del complemento C3. Por lo tanto, Crry es un inhibidor de las vías del complemento tanto clásica como alternativa.

20 En un modelo estandarizado de traumatismo craneal cerrado en ratones (Chen et al., J. Neurotrauma 1996), la administración post-lesión de 1 mg de Crry-Ig, que corresponde a la "ventana temporal de oportunidad" terapéutica debida a una barrera hematoencefálica que es traspasada de 1-24 h después del traumatismo en este sistema modelo, causó una recuperación neurológica significativamente mejorada después de LCT en el plazo de 24 h, en oposición a ratones de control inyectados con vehículo solamente (figura 6). En este experimento, el alcance de la deficiencia neurológica postraumática se valoró mediante una puntuación de gravedad neurológica (Puntuación de Gravedad Neurológica (NSS)) estandarizada de 10 puntos de manera enmascarada mediante dos investigadores independientes. Además, ratones con traumatismo craneal inyectados con 1 mg de Crry-Ig i.p., una hora después del traumatismo mostraban una pérdida de peso significativamente reducida en comparación con controles a los que se inyectó vehículo (figura 7), indicando que el estado catabólico postraumático inducido por inflamación está protegido en ratones con inhibición del complemento mediante Crry-Ig.

30 Estos resultados demuestran que la inhibición de la vía del complemento al nivel de la convertasa del complemento C3 inhibe el daño fisiológico asociado con LCT.

Ejemplo 2

35 El siguiente ejemplo demuestra que el anticuerpo monoclonal para el Factor B reducía el daño cerebral asociado con lesión cerebral traumática (LCT).

40 Estudios de valoración preliminares revelaron que *in vivo*, la inyección intraperitoneal (i.p.) de 2 mg de mAb1379 (anticuerpo monoclonal para factor B, o anti-fB) en ratones C57BL/6 que pesaban 25-35 g dio como resultado la completa inhibición de la actividad del complemento en la vía alternativa, que duraba 48 horas. Los estudios de inhibición anti-fB después de traumatismo craneal cerrado experimental en ratones C57BL/6 (Chen et al., J. Neurotrauma 1996) se realizaron usando dos grupos experimentales: uno que recibía 2 mg de mAb1379, inyectado i.p. a t = 1 h, 24 h o 72 h; y el segundo que recibía medio de vehículo en solitario, inyectado en puntos temporales idénticos. Los resultados revelaban un efecto neuroprotector significativo de la inhibición del complemento en la vía alternativa en el grupo de anti-fB (mAb1379), en comparación con animales de control a los que se inyectó vehículo, en base a una puntuación de gravedad neurológica (NSS) de 10 puntos reducida significativamente en el plazo de 24 h después del traumatismo (Tabla 3; Figura 8). Este resultado demuestra que la inhibición selectiva de la vía alternativa del complemento reduce el daño fisiológico que resulta de LCT.

50

Tabla 3

| | Puntuación de gravedad neurológica (NSS) | |
|------------------------------------|--|----------------|
| | 0 (mejor) | -10 (peor) |
| | <i>NSS</i> 4h | <i>NSS</i> 24h |
| Traumatismo vehículo (n = 20)* | 6 | 4 |
| Traumatismo anti-factor B (n = 8)* | 3,5 | 2,5 |

*valores medianos

Ejemplo 3

55 El siguiente ejemplo muestra que el anticuerpo monoclonal para Factor B reducía el daño cerebral asociado con lesión de médula espinal (LME).

60 Ratones C57BL/6 hembra de tipo silvestre (Charles River, MD) y ratones fB-/- hembra, 6-8 semanas de edad y 16-20 g de peso (para todos los ratones) se usaron en este estudio. A los animales se les proporcionó agua y alimento *ad libitum* y se alojaron en jaulas de Plexiglas ventiladas (cuatro ratones / por jaula) en un ciclo de luz-oscuridad de 12/12-h con una instalación barrera libre de patógenos y se mantuvieron de acuerdo con la Guía NIH para el cuidado

y uso de animales de laboratorio del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos (Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD). Los ratones se aclimataron durante al menos 1 semana antes de la experimentación.

- 5 Los procedimientos quirúrgicos y postoperatorios en animales fueron aprobados por el Comité sobre Investigación Animal en la Universidad Médica de Carolina del Sur. Los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo en condiciones estériles. Las contusiones de la médula espinal se realizaron usando un dispositivo de caída de peso para la inducción de lesión de médula espinal (LME) en ratones (Pannu et al. (2005) J. Neuroscience Research 79: 340-350). En resumen, los ratones se anestesiaron con una inyección intraperitoneal (i.p.) de ketamina (75 mg/kg) y xilazina (16 mg/kg). El lado dorsal del lomo se afeitó y se frotó con solución yodada. La temperatura corporal se mantuvo durante toda la cirugía mediante una manta calefactora a 37°C colocada debajo del animal. Se realizó una incisión en la línea media en la piel desde los niveles T9 a T13. Se realizó laminectomía a nivel de la T12, dejando la dura intacta. La columna se inmovilizó con un dispositivo estereotáctico y se indujo lesión dejando caer un peso de 5 g desde una altura de 3 cm (15 g-cm de fuerza) sobre la dura expuesta. Animales operados de forma simulada se sometieron a laminectomía solamente. Después de la lesión, los músculos se cerraron en capas y la incisión se suturó. Los ratones se mantuvieron sobre una almohadilla calefactora. No se usaron antibióticos o analgésicos profilácticos pre- o postoperatorios para evitar sus posibles interacciones con la terapia experimental de LME. Las vejigas se exprimieron de forma manual dos veces al día hasta que el vaciado espontáneo adecuado retornaba.
- 10
- 15
- 20 Todos los animales se incluyeron en el estudio de recuperación funcional. La función de la pata trasera de ratones experimentales fue valorada semanalmente mediante observadores con enmascaramiento usando la puntuación de la función motora de la pata trasera (Shuhei K J. of Neuropathology and Experimental Neurology (2004) 64-72). La escala variaba de 0 a 5, y las puntuaciones eran las siguientes: 0: Ningún movimiento de las patas traseras; 1: movimiento apenas perceptible de cualesquiera articulaciones de la pata trasera (cadera, rodilla o tobillo); 2: movimientos bruscos en una o más articulaciones de la pata trasera (cadera, rodilla o tobillo) en una o ambas patas pero sin coordinación; 3: Movimientos de pasos y propulsores alternos de las patas traseras pero sin soportar peso; 4: Soporta peso y puede caminar con cierto déficit; 5: Camina con normalidad.
- 25

La figura 9 muestra los resultados de un estudio que investiga el efecto de la administración de anticuerpo monoclonal para factor B sobre la recuperación funcional de lesión de médula espinal. En el modelo murino para LME descrito anteriormente, ratones C57BL/6 recibieron dos inyecciones intravenosas de 1 mg/10 g de anti-factor B (mAb 1379) a 1 hora y 12 horas post-lesión (Número de grupo, n=8). La recuperación funcional se evaluó tal como se ha descrito anteriormente una vez al día durante 21 días post-lesión. Los animales tratados de forma simulada, ratones no tratados con LME experimental, y ratones factor B (-/-) con LME experimental también se evaluaron durante la evolución temporal. Tal como se muestra en la figura 9, los ratones factor B (-/-) y los ratones que recibieron anti-factor B presentaban una puntuación de recuperación funcional significativamente ($p < 0,01$) mejorada en cada uno de los puntos temporales de 21 días, en comparación con ratones no tratados con lesión de médula espinal experimental. Estos resultados demuestran que la inhibición selectiva de la vía alternativa del complemento es suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico significativo en un modelo de LME.

30

35

40

Ejemplo 4

El siguiente ejemplo demuestra que la vía alternativa de activación del complemento desempeña un papel crucial en la patofisiología de LCT.

45

Materiales y métodos

Ratones Factor B^{-/-}. Los ratones knockout genéticos deficientes en factor B (fB^{-/-}) se caracterizaron previamente y mostraron tener una completa falta de una vía alternativa del complemento funcional [58]. Se crearon originalmente con células madre embrionarias Sv129 y se cruzaron con ratones C57BL/6 antes de la expansión de la colonia en la F1. A continuación se retrocruzaron durante más de 10 generaciones contra un fondo C57BL/6 puro y se descubrió que eran sumamente indistinguibles de ratones C57BL/6 [34]. Los ratones knockout y los miembros de la misma camada de tipo silvestre (fB^{+/+}) se aclimataron varias semanas antes de los experimentos y se mantuvieron aislados de influencias externas durante toda la evaluación temporal del estudio. Se criaron en un entorno libre de patógenos selectivo (SPF) y condiciones estandarizadas de temperatura (21°C), humedad (60%), ciclos de luz oscuridad (12:12h), con alimento y agua proporcionados *ad libitum*. Para este estudio solamente se usaron ratones macho para evitar un sesgo de género con respecto a niveles de actividad del complemento [59] y a susceptibilidad a lesión cerebral que parece estar influida significativamente por hormonas sexuales femeninas [60, 61]. Todos los experimentos se realizaron cumpliendo los estándares de la Federación de Asociaciones Europeas de las Ciencias del Animal de Laboratorio (FELASA) y fueron aprobados por el comité institucional de cuidado animal (Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlín, Alemania, No. G0099/03 y No. G0308/04).

50

55

60

Modelo de lesión cerebral. Se realizó traumatismo craneal cerrado experimental en ratones knockout (fB^{-/-}) y miembros de la misma camada de tipo silvestre (fB^{+/+}) de la estirpe C57BL/6 (n=6 por grupo y punto temporal) usando un dispositivo de caída de peso estandarizado, tal como se ha descrito anteriormente [13, 38, 62-64]. En resumen, después de la inducción de anestesia con isoflurano, el cráneo se expuso mediante una incisión

65

longitudinal en el cuero cabelludo en la línea media. Se dejó caer un peso de 333 g sobre el cráneo fijado desde una altura de 2 cm, dando como resultado un traumatismo contuso focal en el hemisferio izquierdo. Después del traumatismo, los ratones recibieron oxigenación de apoyo con O₂ al 100% hasta que estaban completamente despiertos y a continuación fueron devueltos a sus celdas. En puntos temporales definidos (t = 4 h, 24 h y 7 días), los ratones se sacrificaron y los hemisferios cerebrales se extrajeron para análisis mediante inmunohistoquímica, histoquímica TUNEL y análisis por SDS-PAGE/transferencia de Western. Además, se recogieron muestras de suero para determinación de niveles de anafilatoxina C5a del complemento mediante análisis de ELISA y transferencia de Western de Bcl-2 (véase a continuación).

Los ratones operados de forma simulada se mantuvieron en condiciones idénticas que el grupo de traumatismo y se sometieron a los mismos procedimientos (anestesia e incisión en el cuero cabelludo) excepto que no se aplicó traumatismo craneal.

ELISA para C5a de ratón. Para la determinación de los niveles de anafilatoxina C5a del complemento en muestras de suero de ratones C57BL/6 con traumatismo craneal y normales de control, se usó un ELISA desarrollado en el laboratorio del Dr. P.A. Ward (Ann Arbor, MI, EE. UU.). En resumen, placas de ELISA (Immulon 4HBX, Thermo Labsystems, Milford, MA, EE. UU.) se revistieron con IgG monoclonal anti-C5a de ratón (5 µg/ml, BD Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU.). Después del bloqueo de sitios de unión inespecíficos con leche al 1% (Roth, Karlsruhe, Alemania) en PBS (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) que contenía TWEEN 20 al 0,05% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), la placa se revistió con 100 µl de suero diluidos a 1:20 (en leche al 0,1% en PBS que contenía TWEEN al 0,05%) y C5a de ratón recombinante murina a concentraciones definidas para establecer la curva patrón. Después de la incubación y posteriores etapas de lavado, se añadió anticuerpo monoclonal biotinilado anti-C5a de ratón a 500 ng/ml (BD Pharmingen) seguido por etapas de lavado e incubación con estreptavidina-peroxidasa a 400 ng/ml (Sigma). Para reacción colorimétrica, el sustrato (0,4 mg/ml de OPD con 0,4 mg/ml de urea peróxido de hidrógeno en tampón fosfato citrato 0,05 M; Sigma) se añadió y la reacción de color se interrumpió con ácido sulfúrico 3 M. La absorbancia se leyó a 490 nm (lector "SpectraMax 190", Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU.). Todas las muestras se analizaron en pocillos por duplicado y los resultados se calcularon a partir de las medias de análisis de muestras por duplicado. La curva patrón era lineal de 50 ng/ml a 0,1 ng/ml, que representa el límite inferior de detección de este ensayo.

Transferencia de Western. Todos los ratones usados en este estudio se cribaron mediante análisis por transferencia de Western para la presencia de factor B en el suero, como control de calidad interno. Los niveles de proteína del mediador anti-apoptótico mitocondrial Bcl-2 y del receptor Fas pro-apoptótico se determinaron en cerebros de ratón homogeneizados y se emparejaron con muestras de suero a 4 h, 24 h y 7 d después de traumatismo craneal u operación simulada en ratones fB^{-/-} y fB^{+/+}. La técnica de transferencia de Western se describió previamente [32]. En resumen, se extrajeron cerebros de ratón bajo anestesia, se separaron en hemisferios izquierdo y derecho, y se homogeneizaron inmediatamente en tampón de lisis (Sigma) que contenía TRIS-HCl 100 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,5%, Nonidet P-40 al 0,5%, 10 mg/ml de aprotinina, 10 mg/ml de leupeptina, 5 mg/ml de pepstatina, fluoruro de fenil-metil-sulfonilo 1 mM en agua desionizada, usando un homogeneizador Ultra Turrax Homogenizer® (IKA Werke, Staufen, Alemania). Después de 15 minutos de centrifugado a 13.000 x g, el contenido de proteínas de los sobrenadantes se determinó mediante el ensayo de proteínas colorimétrico disponible en el mercado ("BCA Protein Assay", Pierce/Perbio Science, Bonn, Alemania). Una muestra de 60 µg de proteínas totales se desnaturizó en tampón de carga y se separó en condiciones reductoras en geles de SDS-poliacrilamida al 12% en paralelo con un estándar de proteína de SDS-PAGE preteñido de amplio rango (Bio-Rad, Múnich, Alemania). Las proteínas se transfirieron a continuación a membranas de nitrocelulosa Protran BA 83 (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) mediante electrotransferencia (Bio-Rad). Las transferencias se bloquearon durante una noche y a continuación se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-Bcl-2 de ratón (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania), diluido a 1:500, anticuerpo de conejo policlonal anti-Fas de ratón (clon A-20, Santa Cruz), diluido a 1:200, anticuerpo policlonal de pollo anti-factor B de ratón, diluido a 1:8.000 (suministrado amablemente por el Dr. Scott R. Barnum, Universidad de Alabama en Birmingham, AL, EE. UU.) como anticuerpos primarios, y con un anticuerpo monoclonal anti-β-actina (clon AC-15, Sigma) diluido a 1:10.000, como control interno para establecer una carga igual de las bandas. Después de la incubación con anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa (Dako, Hamburgo, Alemania, y Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania), diluida a 1:5.000, la unión a anticuerpos se visualizó mediante una técnica de quimioluminiscencia no radiactiva usando un kit de transferencia de Western ECL® disponible en el mercado (Amersham Pharmacia Biotech, Friburgo, Alemania). La transferencia de proteínas por igual a la membrana de transferencia se confirmó mediante tinción con rojo Ponceau (Sigma).

Inmunohistoquímica. Para valoración de la morfología, integridad y apoptosis neuronales, cerebros de ratón extraídos se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido, se incluyeron en compuesto OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA) y se almacenaron a -80°C hasta que se usaron para análisis. Se cortaron secciones de tejido coronal de seis a ocho micrómetros de grosor con un criostato a -20°C. Para inmunohistoquímica, se fijaron portaobjetos en acetona y a continuación se analizaron mediante una técnica con biotina/avidina/peroxidasa convencional con DAB-tetraclorhidrato como cromógeno (Vector, Burlingame, CA), tal como se ha descrito previamente [13, 32]. Los siguientes anticuerpos primarios se usaron como marcadores celulares: monoclonal anti-NeuN, a una dilución valorada cuantitativamente de 1:2.000 (Chemicon, Hampshire, RU) para neuronas; policlonal de conejo anti-GFAP, 1:100 (Shandon Immunon, Pittsburgh, PA, EE. UU.) para astrocitos; monoclonal de rata anti-CD11b, 1:100,

(Accurate Chemical, Westbury, NY, EE. UU.) para microglia; policlonal de cabra anti CD144, 1:200 (Santa Cruz) para células endoteliales. Se usó IgG no inmunizada (Vector) como control negativo a diluciones iguales que el anticuerpo específico omitido.

5 Para determinar el alcance de la muerte celular neuronal intracerebral, se realizó histoquímica TUNEL usando un “kit de detección de muerte celular in situ con fluoresceína” (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, tal como se ha descrito previamente [38]. En resumen, los portaobjetos se secaron durante 30 minutos, seguido por fijación en solución al 10% de formalina a temperatura ambiente. Después de lavar en PBS (tres veces durante 3 minutos), las secciones se incubaron en solución de etanol-ácido
10 acético enfriada con hielo (2:1) durante 5 minutos a -20°C . Seguidamente, se lavaron en PBS y se incubaron en una solución de permeabilización con Triton X-100 al 3% en PBS durante 60 minutos a temperatura ambiente, a continuación se incubaron con la enzima TdT en un tampón de reacción que contenía fluoresceína-dUTP durante 90 minutos a 37°C . Se realizó un control negativo usando solamente el tampón de reacción sin enzima TdT. Se realizaron controles positivos dirigiendo secciones de cerebro iguales con solución de ADNasa de grado I (500 U/ml; Roche) durante 20 minutos a temperatura ambiente y se mantuvieron siempre separadas de las otras muestras en lo sucesivo. Después del marcado, las secciones se lavaron de nuevo en PBS y para visualizar las células no teñidas (negativas en TUNEL), las secciones se cubrieron con medio de montaje VectashieldO para fluorescencia con DAPI (Vector). Todas las muestras se evaluaron inmediatamente después de la tinción usando un microscopio de fluorescencia Axioskop 40 (Zeiss, Alemania) a 460 nm para DAPI y 520 nm para fluorescencia TUNEL y se
20 analizaron mediante el software Alpha digi doc 1201 (Alpha Innotech, San Leandro, CA, EE. UU.).

Análisis estadístico. El análisis estadístico se realizó usando software disponible en el mercado (SPSS 9.0 para Windows®). Las diferencias en los niveles de C5a del complemento en suero de ratones fB^{-/-} y fB^{+/+} se determinaron mediante el prueba de la t de Student para datos no emparejados. Un valor $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.
25

Resultados

La activación del complemento está atenuada en ratones fB^{-/-} con lesión cerebral.

30 El cribado de muestras de suero de todos los ratones fB^{-/-} y miembros de la misma camada de tipo silvestre (fB^{+/+}) usados en el presente estudio reveló que el factor B solamente era detectable en suero de animales fB^{+/+}, pero no en los ratones fB^{-/-}. Estos experimentos de control se realizaron para valorar que los ratones knockout están completamente desprovistos de factor B en suero (no se muestran los datos).
35

Con referencia a la figura 10, muestras de suero de ratones fB^{+/+} y fB^{-/-} con lesión cerebral de la estirpe C57BL/6 (n=6 por grupo y punto temporal) y de ratones C57BL/6 normales (control; n=4) se analizaron mediante ELISA específico para C5a de ratón (los datos en la figura 10 se muestran como niveles medios \pm SD; * $P < 0,05$, ratones fB^{+/+} frente a control y fB^{+/+} frente a fB^{-/-}. LCT, lesión cerebral traumática). El traumatismo craneal cerrado experimental en ratones C57BL/6 de tipo silvestre dio como resultado una activación sistémica de la cascada del complemento, según lo determinado mediante niveles en suero significativamente elevados del producto de activación del complemento C5a en todos los puntos temporales evaluados de 4 horas a 7 días ($P < 0,05$ frente a suero de ratón normal, prueba de la t de Student para datos no emparejados; figura 10). En contraste, los niveles en suero de anafilatoxina C5a se reducían drásticamente en ratones fB^{-/-} en todos los puntos temporales correspondientes después de traumatismo craneal, llegando a niveles iniciales en ratones normales ($P < 0,05$ frente a ratones fB^{+/+} con lesión cerebral, prueba de la t de Student para datos no emparejados; figura 10). Estos datos implican que la vía alternativa es la fuente para activación del complemento después de lesión cerebral, una noción que solamente se ha sustanciado previamente para enfermedades fuera del SNC, tales como artritis reumatoide, nefritis autoinmunitaria, e isquemia/lesiones por reperusión [33, 37].
45
50

La falta de factor B causa muerte celular neuronal reducida después de traumatismo craneal.

Tal como se ha descrito previamente, se observó muerte celular neuronal en cerebros lesionados de ratones C57BL/6 de tipo silvestre durante hasta 7 días después de traumatismo craneal cerrado [38]. Con referencia a las
55 figuras 12-14, criosecciones coronales del hemisferio izquierdo (lesionado) de ratones de tipo silvestre (fB^{+/+}, paneles A-E en cada figura) y knockout para el factor B (fB^{-/-}, paneles F-J en cada figura) se analizaron mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo específico para el marcador neuronal NeuN (A, B, F, G en cada figura) o mediante TUNEL-histoquímica de secciones adyacentes (D, E, I, J en cada figura). La morfología celular global de las secciones TUNEL se revela mediante tinción nuclear DAPI (C, H en cada figura). Los paneles B, E, G, J en cada
60 figura representan un aumento de 4 veces de los respectivos paneles A, D, F, I en cada figura (aumentos originales: 100x (A, C, D, F, H, I), 400x (B, E, G, J)). Un incremento de células positivas en TUNEL se detectó en los hemisferios lesionados de ratones fB^{+/+} en el plazo de 4 a 24 horas después del traumatismo (figuras 12 y 13, respectivamente), persistiendo durante hasta 7 días (figura 14). La tinción nuclear con 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI; paneles C y H de las figuras 12-14) mostraba la morfología celular en secciones adyacentes a las valoradas por histoquímica TUNEL. Las neuronas se determinaron como el principal tipo celular positivo en TUNEL mediante
65 tinción inmunohistoquímica de secciones adyacentes con el marcador celular específico NeuN (paneles A, B, F y G

de las figuras 12-14). En contraste, la tinción de astrocitos (anti-GFAP), microglia (anti-CD11b) y células endoteliales (anti-CD144) revelaba que estas células residentes en el cerebro no muestran una tinción en TUNEL relevante en el presente modelo de traumatismo craneal (no se muestran los datos). Además, las neuronas se confirmaron como el tipo celular positivo en TUNEL predominante mediante su tamaño y morfología celulares típicas (en oposición a las células gliales) y a las capas neuronales típicas de células positivas en TUNEL en la corteza lesionada. Estos descubrimientos corroboran datos publicados previamente sobre apoptosis neuronal en el actual y otros modelos de LCT experimental, así como en pacientes con traumatismo craneal [38-42]. En contraste al alcance de muerte celular neuronal en ratones fB+/+ con lesión cerebral, los animales fB-/- mostraban una clara reducción de neuronas positivas en TUNEL en cerebros lesionados de 4 horas a 7 días después del traumatismo (Paneles D, E, I y J de las figuras 12-14). Estos descubrimientos apoyan el concepto recientemente establecido de regulación dependiente del complemento de la apoptosis neuronal [7, 10, 15, 43] y promueven la importancia *in vivo* de la vía alternativa (dependiente del factor B) de activación del complemento en la regulación del alcance de neurodegeneración secundaria después de LCT.

Éste es el primer estudio, al saber y entender de los inventores de la presente invención, que investigó exclusivamente el papel de la vía alternativa en contribuir a neuropatología después de lesión cerebral. Los ratones fB-/- han demostrado previamente estar protegidos de desmielinación experimental en un modelo animal de esclerosis múltiple [44]. Los estudios de Nataf y colaboradores apoyan los presentes descubrimientos de los inventores de la presente invención de que la deficiencia genética de factor B, que provoca la completa falta de una vía de activación del complemento alternativa funcional, desempeña un papel esencial para neuroprotección en modelos de lesión del SNC autoinmunitaria y traumática.

Regulación positiva de Bcl-2 y regulación negativa de Fas en cerebros de fB-/- lesionados

La apoptosis neuronal postraumática ha demostrado estar promovida por la vía extrínseca mediada por Fas y por una supresión del mediador anti-apoptótico mitocondrial Bcl-2 de la vía intrínseca de apoptosis [45-51]. Con referencia a la figura 11, piezas de biopsia de tejido cerebral homogeneizadas de los hemisferios lesionados de ratones fB+/+ y fB-/- operados de forma simulada y con traumatismo cerebral se desplazaron en SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se analizaron, con anticuerpos monoclonales específicos para Bcl-2 y detección mediante ensayo quimioluminiscente (sistema ECL®, Amersham). La banda de 26 kDa visualizada correspondiente a Bcl-2 de ratón está intensificada en los ratones knockout a las 24 horas, en comparación con miembros de la misma camada de tipo silvestre con traumatismo craneal. Además, una regulación negativa de la intensidad de tinción del receptor Fas era obvia en ratones knockout con lesión cerebral en todos los puntos temporales valorados, en comparación con ratones fB+/+ (no se muestran los datos). La transferencia ejemplar es representativa de tres experimentos independientes.

Más particularmente, mediante análisis por transferencia de Western, los inventores descubrieron una marcada regulación positiva de niveles de proteínas de Bcl-2 protectores en homogenados de cerebro de ratones fB-/- con traumatismo craneal a las 24 horas después del traumatismo, en comparación con miembros de la misma camada fB+/+ (figura 11). No se observaron diferencias evidentes en la expresión de Bcl-2 entre ratones knockout y de tipo silvestre en otros puntos temporales después de LCT (figura 11). Con respecto a la vía extrínseca de apoptosis, una marcada regulación negativa en la expresión del receptor Fas se observó en el plazo de 4 horas a 7 días después de LCT en ratones fB-/-, en comparación con animales fB+/+ (figura 11). Aunque estos datos no son cuantitativos, las diferencias de intensidad de tinción de las bandas de 26 kDa (Bcl-2; figura 11) y 48 kDa (Fas; no se muestran los datos) parecen más intensas en los ratones knockout con lesión cerebral que en los miembros de la misma camada de tipo silvestre correspondientes en los puntos temporales mencionados anteriormente. Estos descubrimientos indican una implicación de la vía alternativa de activación del complemento en la regulación de la apoptosis neuronal después de LCT mediante supresión de Bcl-2 e inducción de expresión del receptor Fas en el cerebro lesionado. Ambos aspectos son críticos en la regulación de apoptosis neuronal posterior a la lesión, tal como ha sido determinado previamente por otros investigadores en diferentes sistemas modelo [45-47]. Un estudio experimental sobre un modelo de lesión cerebral con impacto cortical controlado demostró que el volumen de la lesión cortical se reducía significativamente en ratones transgénicos con sobreexpresión del gen Bcl-2 a los 7 días después del traumatismo, en comparación con miembros de la misma camada de tipo silvestre [52]. Por lo tanto, a Bcl-2 se le atribuyó un importante papel en la regulación de la vía mitocondrial (intrínseca) de apoptosis después de LCT [4, 50, 52, 53].

Los inventores de la presente invención han demostrado previamente que la “pan”-inhibición farmacológica de la activación del complemento a nivel de las convertasas C3 mediante Crry-Ig, una molécula de fusión química recombinante murina, causa expresión intracerebral mejorada del gen y la proteína de Bcl-2 y supervivencia neuronal incrementada en el hipocampo de ratones con lesión cerebral [32]. En un modelo de encefalitis autoinmunitaria murina, el bloqueo de la activación del complemento por Crry-Ig dio como resultado una atenuación significativa de la apoptosis neuronal [15].

Los datos del presente estudio apoyan la importancia biológica de la vía alternativa de activación del complemento en la contribución a las secuelas neuropatológicas de LCT y proporcionan la base para futuros estudios farmacológicos con inhibidores selectivos de la vía alternativa, por ejemplo tales como antagonistas del factor B [33,

54].

En resumen, los presentes datos proporcionan las primeras pruebas de un papel fundamental de la vía alternativa de activación del complemento en contribuir al alcance global de activación postraumática del complemento (generación de C5a) y a muerte celular neuronal secundaria después de lesión cerebral (datos de TUNEL, Bcl-2 y Fas). Éste es un descubrimiento nuevo y estimulante, dado que todos los estudios publicados previamente sobre inhibición experimental del complemento en modelos de LCT se han centrado en interferir en la cascada del complemento a nivel de la “unión común” de convertasas C3 [26, 28-32] o más aguas abajo en la cascada, por ejemplo mediante bloqueo específico de anafilatoxina C5a o su receptor [30]. La subestimación hasta la fecha del papel patofisiológico de la vía alternativa del complemento en la neuropatología de lesión cerebral puede ser debida en parte al papel predominante establecido históricamente de la vía clásica en diversas enfermedades neurológicas [55, 56]. Sin embargo, los resultados del presente estudio indican que estas percepciones pueden no reflejar necesariamente la “verdadera” importancia *in vivo* de la vía alternativa del complemento en una enfermedad neuroinflamatoria multifactorial compleja, tales como en el marco de LCT [57]. El hecho de que niveles elevados de factor B estén presentes en el compartimento intratecal de pacientes con traumatismo craneal grave [36] apoya adicionalmente la reivindicación en el presente documento de que la dirección farmacológica del factor B es razonable y predecible.

Referencias para el ejemplo 4

1. McArthur et al., Brain Pathol 2004, 14: 185-94.
2. Gaetz, Clin Neurophysiol 2004, 115: 4-18.
3. Eldadah et al., J Neurotrauma 2000, 17: 811-829.
4. Raghupathi R, Brain Pathol 2004, 14: 215-222.
5. Wong et al., Neurocrit Care 2005, 3: 177-182.
6. Zhang et al., Crit Care 2005, 9: 66-75.
7. Stahel et al., Brain Res Rev 1998, 27: 243-56.
8. Cole et al., Clin Sci (Lond) 2003, 104: 455-66.
9. Schmidt et al., Eur J Trauma 2004, 30: 135-149.
10. Cole et al., Mol Immunol 2006, 5 de enero [Publicación virtual antes de la impresión].
11. Farkas et al., J Physiol 1998, 507: 679-87.
12. Nataf et al., Trends Neurosci 1999, 22: 397-402.
13. Stahel et al., J Neuroimmunol 2000, 109: 164-72.
14. O'Barr et al., J Immunol 2001, 166: 4154-4162.
15. Alexander et al., J Immunol 2005, 175: 8312-8319.
16. Morgan, Crit Rev Immunol 1999, 19: 173-98.
17. Singhrao et al., Am J Pathol 2000, 157: 905-18.
18. Bellander et al., J Neurotrauma 2001, 18: 1295-311.
19. Ohlsson et al., J Neurotrauma 2003, 20: 895-904.
20. Ohlsson y Havton, Neurosci Lett 2005, 10 de noviembre [Publicación virtual antes de la impresión].
21. Casarsa et al., Eur J Immunol 2003, 33: 1260-1270.
22. Xiong et al., J Neurosci 2003, 23: 955-60.
23. Bellander et al., J Neurosurg 1996, 85: 468-75.
24. Keeling et al., J Neuroimmunol 2000, 105: 20-30.
25. Kyrkanides et al., J Neuroimmunol 2001, 119: 268-277.
26. Rancan et al., J Cereb Blood Flow Metab 2003, 23: 1070-4.
27. Stahel et al., J Neurotrauma 2001, 18: 773-81.
28. Kaczorowski et al., J Cereb Blood Flow Metab 1995, 15: 860-4.
29. Hicks et al., J Neurotrauma 2002, 19: 705-14.
30. Sewell et al., J Neuroimmunol 2004, 155: 55-63.
31. Pillay et al., Ann N Y Acad Sci 2005, 1056: 450-461.
32. Leinhase et al., Exp Neurol 2006 (en prensa).
33. Holers y Thurman, Mol Immunol 2004, 41: 147-152.
34. Thurman et al., J Immunol 2003, 170: 1517-1523.
35. Thurman et al., Kidney Int 2005, 67: 524-30.
36. Kossmann et al., J Neuroimmunol 1997, 73: 63-9.
37. Thurman y Holers, J Immunol 2006, 176: 1305-1310.
38. Stahel et al., J Cereb Blood Flow Metab 2000, 20: 369-80.
39. Rink et al., Am J Pathol 1995, 147: 1575-1583.
40. Yakovlev et al., J Neurosci 1997, 17: 7415-7424.
41. Williams et al., Acta Neuropathol 2001, 102: 581-590.
42. Marciano et al., J Neurosci 2004, 24: 2866-2876.
43. Elward et al., J Biol Chem 2005, 280: 36342-54.
44. Nataf et al., J Immunol 2000, 165: 5867-5873.
45. Felderhoff-Mueser et al., Neurobiol Dis 2002, 11: 231-245.
46. Qiu et al., J Neurosci 2002, 22: 3504-3511.

47. Raghupathi et al., Neuroscience 2002, 110: 605-616.
 48. Raghupathi et al., J Neurotrauma 2003, 20: 421-435.
 49. Strauss et al., Neurotox Res 2004, 6: 333-342.
 50. Mohamad et al., Biocell 2005, 29: 149-161.
 51. Friedlander, N Engl J Med 2003, 348: 1365-1375.
 52. Raghupathi et al., J Cereb Blood Flow Metab 1998, 18: 1259-69.
 53. Shacka et al., Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 2005, 4: 25-39.
 54. Thurman et al., Mol Immunol 2005, 42: 87-97.
 55. Morgan y Gasque, Immunol Today 1996,17: 461-6.
 56. Barnum, Mol Med 1999, 5: 569-82.
 57. Schmidt et al., Brain Res Rev 2005, 48: 388-399.
 58. Matsumoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 1997, 94: 8720-8725.
 59. Holers, Immunopharmacology 2000, 49: 125-31.
 60. Roof y Hall, J Neurotrauma 2000,17: 367-388.
 61. Yao et al., J Neurotrauma 2005, 22: 656-658.
 62. Chen et al., J Neurotrauma 1996, 13: 557-68.
 63. Yatsiv et al., J Cereb Blood Flow Metab 2002, 22: 971-8.
 64. Yatsiv et al., FASEB J 2005, 19: 1701-1703.

20 Aunque se han descrito en detalle diversas realizaciones de la presente invención, es evidente que modificaciones y adaptaciones de esas realizaciones se les ocurrirán a los expertos en la materia. Debe entenderse expresamente, sin embargo, que dichas modificaciones y adaptaciones están dentro del alcance de la presente invención, tal como se describe en las siguientes reivindicaciones.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> The Regents of the University of Colorado
 MUSC Foundation for Research Development
- 30 <120> Inhibición de la vía alternativa del complemento para el tratamiento de lesión cerebral traumática, lesión de médula espinal y afecciones relacionadas
- <130> 5375-3-PCT
- 35 <150> 60/685.289
 <151> 26-05-2005
- <160> 8
- 40 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
 <211> 764
 <212> PRT
- 45 <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 548 700 T3

Met Gly Ser Asn Leu Ser Pro Gln Leu Cys Leu Met Pro Phe Ile Leu
 1 5 10 15
 Gly Leu Leu Ser Gly Gly Val Thr Thr Thr Pro Trp Ser Leu Ala Arg
 20 25 30
 Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser
 35 40 45
 Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser
 50 55 60
 Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly
 65 70 75 80
 Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp Gln Lys Thr Val Arg Lys Ala
 85 90 95
 Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg Pro His Asp Phe Glu Asn Gly
 100 105 110
 Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr Asn Val Ser Asp Glu Ile Ser
 115 120 125
 Phe His Cys Tyr Asp Gly Tyr Thr Leu Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr
 130 135 140
 Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn
 145 150 155 160

ES 2 548 700 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys
 405 410 415

Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro
 420 425 430

Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn
 435 440 445

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

Phe Tyr Gln Met Ile Asp Glu Ser Gln Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met
 465 470 475 480

Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln
 485 490 495

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

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

Thr Val Asp Asp Lys Glu His Ser Ile Lys Val Ser Val Gly Gly Glu
 530 535 540

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

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

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

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

Leu Pro Pro Thr Thr Thr Cys Gln Gln Gln Lys Glu Glu Leu Leu Pro
 610 615 620

Ala Gln Asp Ile Lys Ala Leu Phe Val Ser Glu Glu Glu Lys Lys Leu
 625 630 635 640

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

Glu Arg Asp Ala Gln Tyr Ala Pro Gly Tyr Asp Lys Val Lys Asp Ile
 660 665 670

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

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

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

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

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

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

<210> 2
 <211> 739
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 548 700 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 548 700 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp Val Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys
 545 550 555 560 565

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

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

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

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

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

ES 2 548 700 T3

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

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

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

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

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

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

Gly Phe Leu

<210> 3
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

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

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

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

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

Lys Ala Glu Cys Arg Ala
 65 70

10

<210> 4
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 4

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

ES 2 548 700 T3

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

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

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

<210> 5
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

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

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

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

10

<210> 6
 <211> 761
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 6

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

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

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

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

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

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

ES 2 548 700 T3

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

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

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

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

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

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

Val Leu Arg Gly Ser Gln Lys Arg Lys Cys Gln Glu Gly Gly Ser Trp
195 200 205

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

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

Gly Ala Asp Ala Glu Asp Gly His Ser Pro Gly Glu Gln Gln Lys Arg
245 250 255

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

Asp Gly Ser Asp Ser Ile Gly Ser Ser Asn Phe Thr Gly Ala Lys Arg
275 280 285

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

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

Val Ser Asp Glu Arg Ser Ser Asp Ala Asp Trp Val Thr Glu Lys Leu
325 330 335

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

ES 2 548 700 T3

Lys Arg Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met Met Ser Trp Ala Gly Asp
 355 360 365
 Ala Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile Ile Ile Met
 370 375 380
 Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asn Pro Val Thr Val Ile Gln
 385 390 395 400
 Asp Ile Arg Ala Leu Leu Asp Ile Gly Arg Asp Pro Lys Asn Pro Arg
 405 410 415
 Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro Leu Val Asp
 420 425 430
 Ser Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn Glu His His
 435 440 445
 Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asp Leu Glu Asn Val Phe Tyr Gln
 450 455 460
 Met Ile Asp Glu Thr Lys Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met Val Trp Glu
 465 470 475 480
 His Lys Lys Gly Asn Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln Ala Lys Ile
 485 490 495
 Ser Val Thr Arg Pro Leu Lys Gly His Glu Thr Cys Met Gly Ala Val
 500 505 510
 Val Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Met Val Asp
 515 520 525
 Asp Gln Lys His Ser Ile Lys Val Ser Val Gly Gly Gln Arg Arg Asp
 530 535 540
 Leu Glu Ile Glu Glu Val Leu Phe His Pro Lys Tyr Asn Ile Asn Gly
 545 550 555 560
 Lys Lys Ala Glu Gly Ile Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp Val Ala Leu
 565 570 575
 Val Lys Leu Lys Asn Lys Leu Lys Tyr Gly Gln Thr Leu Arg Pro Ile
 580 585 590
 Cys Leu Pro Cys Thr Glu Gly Thr Thr Arg Ala Leu Arg Leu Pro Gln
 595 600 605

ES 2 548 700 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Lys Asp Glu Asp Leu Gly Phe Leu
 755 760

<210> 7
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 7

Met His Ser Trp Glu Arg Leu Ala Val Leu Val Leu Leu Gly Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Cys Ala Ala Pro Pro Arg Gly Arg Ile Leu Gly Gly Arg Glu Ala
 20 25 30

Glu Ala His Ala Arg Pro Tyr Met Ala Ser Val Gln Leu Asn Gly Ala
 35 40 45

His Leu Cys Gly Gly Val Leu Val Ala Glu Gln Trp Val Leu Ser Ala
 50 55 60

Ala His Cys Leu Glu Asp Ala Ala Asp Gly Lys Val Gln Val Leu Leu

10

ES 2 548 700 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65 | | | | | 70 | | | | | | 75 | | | | 80 |
| Gly | Ala | His | Ser | Leu | Ser | Gln | Pro | Glu | Pro | Ser | Lys | Arg | Leu | Tyr | Asp |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Val | Leu | Arg | Ala | Val | Pro | His | Pro | Asp | Ser | Gln | Pro | Asp | Thr | Ile | Asp |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| His | Asp | Leu | Leu | Leu | Leu | Gln | Leu | Ser | Glu | Lys | Ala | Thr | Leu | Gly | Pro |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Ala | Val | Arg | Pro | Leu | Pro | Trp | Gln | Arg | Val | Asp | Arg | Asp | Val | Ala | Pro |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Gly | Thr | Leu | Cys | Asp | Val | Ala | Gly | Trp | Gly | Ile | Val | Asn | His | Ala | Gly |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Arg | Arg | Pro | Asp | Ser | Leu | Gln | His | Val | Leu | Leu | Pro | Val | Leu | Asp | Arg |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Ala | Thr | Cys | Asn | Arg | Arg | Thr | His | His | Asp | Gly | Ala | Ile | Thr | Glu | Arg |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| Leu | Met | Cys | Ala | Glu | Ser | Asn | Arg | Arg | Asp | Ser | Cys | Lys | Gly | Asp | Ser |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Gly | Gly | Pro | Leu | Val | Cys | Gly | Gly | Val | Leu | Glu | Gly | Val | Val | Thr | Ser |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Gly | Ser | Arg | Val | Cys | Gly | Asn | Arg | Lys | Lys | Pro | Gly | Ile | Tyr | Thr | Arg |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Val | Ala | Ser | Tyr | Ala | Ala | Trp | Ile | Asp | Ser | Val | Leu | Ala | | | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | | |

<210> 8
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 8

Met Ile Thr Glu Gly Ala Gln Ala Pro Arg Leu Leu Leu Pro Pro Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gly Ser Asp Pro Val Leu Cys
 20 25 30

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

10

ES 2 548 700 T3

Gly Gly Val Ser Val Glu Asp Cys Cys Leu Asn Thr Ala Phe Ala Tyr
50 55 60

Gln Lys Arg Ser Gly Gly Leu Cys Gln Pro Cys Arg Ser Pro Arg Trp
65 70 75 80

Ser Leu Trp Ser Thr Trp Ala Pro Cys Ser Val Thr Cys Ser Glu Gly
85 90 95

Ser Gln Leu Arg Tyr Arg Arg Cys Val Gly Trp Asn Gly Gln Cys Ser
100 105 110

Gly Lys Val Ala Pro Gly Thr Leu Glu Trp Gln Leu Gln Ala Cys Glu
115 120 125

Asp Gln Gln Cys Cys Pro Glu Met Gly Gly Trp Ser Gly Trp Gly Pro
130 135 140

Trp Glu Pro Cys Ser Val Thr Cys Ser Lys Gly Thr Arg Thr Arg Arg
145 150 155 160

Arg Ala Cys Asn His Pro Ala Pro Lys Cys Gly Gly His Cys Pro Gly
165 170 175

Gln Ala Gln Glu Ser Glu Ala Cys Asp Thr Gln Gln Val Cys Pro Thr
180 185 190

His Gly Ala Trp Ala Thr Trp Gly Pro Trp Thr Pro Cys Ser Ala Ser
195 200 205

Cys His Gly Gly Pro His Glu Pro Lys Glu Thr Arg Ser Arg Lys Cys
210 215 220

Ser Ala Pro Glu Pro Ser Gln Lys Pro Pro Gly Lys Pro Cys Pro Gly
225 230 235 240

Leu Ala Tyr Glu Gln Arg Arg Cys Thr Gly Leu Pro Pro Cys Pro Val
245 250 255

Ala Gly Gly Trp Gly Pro Trp Gly Pro Val Ser Pro Cys Pro Val Thr
260 265 270

Cys Gly Leu Gly Gln Thr Met Glu Gln Arg Thr Cys Asn His Pro Val
275 280 285

Pro Gln His Gly Gly Pro Phe Cys Ala Gly Asp Ala Thr Arg Thr His
290 295 300

ES 2 548 700 T3

Ile Cys Asn Thr Ala Val Pro Cys Pro Val Asp Gly Glu Trp Asp Ser
 305 310 315 320

Trp Gly Glu Trp Ser Pro Cys Ile Arg Arg Asn Met Lys Ser Ile Ser
 325 330 335

Cys Gln Glu Ile Pro Gly Gln Gln Ser Arg Gly Arg Thr Cys Arg Gly
 340 345 350

Arg Lys Phe Asp Gly His Arg Cys Ala Gly Gln Gln Gln Asp Ile Arg
 355 360 365

His Cys Tyr Ser Ile Gln His Cys Pro Leu Lys Gly Ser Trp Ser Glu
 370 375 380

Trp Ser Thr Trp Gly Leu Cys Met Pro Pro Cys Gly Pro Asn Pro Thr
 385 390 395 400

Arg Ala Arg Gln Arg Leu Cys Thr Pro Leu Leu Pro Lys Tyr Pro Pro
 405 410 415

Thr Val Ser Met Val Glu Gly Gln Gly Glu Lys Asn Val Thr Phe Trp
 420 425 430

Gly Arg Pro Leu Pro Arg Cys Glu Glu Leu Gln Gly Gln Lys Leu Val
 435 440 445

Val Glu Glu Lys Arg Pro Cys Leu His Val Pro Ala Cys Lys Asp Pro
 450 455 460

Glu Glu Glu Glu Leu
 465

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso en la reducción o prevención de al menos un síntoma de daño fisiológico que resulta de lesión cerebral traumática (LCT) o lesión de médula espinal (LME) en un animal o para mejorar la recuperación de LCT o LME en el animal, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une selectivamente a e inhibe la actividad del factor B, el factor D o properdina.
2. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une selectivamente al factor B en el tercer dominio de la repetición consenso corta (SCR) y previene la formación de un complejo C3bBb.
3. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une al factor B y previene o inhibe la escisión del factor B por el factor D.
4. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une al tercer dominio de la repetición consenso corta (SCR) del factor B humano.
5. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une selectivamente a un epítipo en el tercer dominio de la SCR del factor B seleccionado entre el grupo constituido por:
- a) un epítipo del factor B que incluye al menos una sección del factor B humano (SEC ID N° 2) que comprende de la posición Tyr139 a la posición Ser185;
 - b) un epítipo de B que incluye al menos una sección del factor B humano (SEC ID N° 2) que comprende de la posición Tyr139 a la posición Ser141;
 - c) un epítipo del factor B que incluye al menos una sección del factor B humano (SEC ID N° 2) que comprende de la posición Glu182 a la posición Ser185;
 - d) un epítipo del factor B que incluye al menos una sección del factor B humano (SEC ID N° 2) que comprende una o más cualesquiera de las siguientes posiciones: Tyr139, Cys140, Ser141, Glu182, Gly184 o Ser185;
 - e) un epítipo en el tercer dominio de la SCR del factor B (SEC ID N° 2) que comprende una o más de las siguientes posiciones de aminoácidos: Ala137, Tyr139, Ser141, Glu182, Ser185, Thr189, Glu190 y Ser192;
 - f) un epítipo en el tercer dominio de la SCR del factor B (SEC ID N° 2) que comprende las siguientes posiciones de aminoácidos: Ala137, Tyr139, Ser141, Glu182, Ser185, Thr189, Glu190 y Ser192;
 - g) un epítipo en el tercer dominio de la SCR del factor B (SEC ID N° 2) que consta de las siguientes posiciones de aminoácidos: Ala137, Tyr139, Ser141, Glu182, Ser185, Thr189, Glu190 y Ser192; y
 - h) un epítipo no lineal dentro de la estructura tridimensional de una sección del tercer dominio de la SCR del factor B, en el que la sección está definida por al menos las posiciones de aminoácidos Ala137-Ser192 de la SEC ID N° 2.
6. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une selectivamente al factor B de múltiples especies de mamífero y previene la formación de un complejo C3bBb.
7. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une selectivamente al factor B de ser humano y un animal seleccionado entre el grupo constituido por: primate no humano, ratón, rata, cerdo, caballo y conejo.
8. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es de un isotipo o subclase que no activa al complemento.
9. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se selecciona entre el grupo constituido por: un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo, un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno del mismo, un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión al antígeno del mismo, un anticuerpo monovalente o fragmento de unión al antígeno del mismo y un anticuerpo quimérico o fragmento de unión al antígeno del mismo.
10. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el fragmento de unión al antígeno es un Fab.
11. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es: a) el anticuerpo monoclonal 1379 (producido por el N° de Depósito de la ATCC PTA-6230) o un fragmento de unión al antígeno del mismo; o b) un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une al mismo epítipo en el factor B que mAb 1379,

preferentemente en el que,
el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es una versión humanizada o quimérica de mAb 1379 o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

- 5 12. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es administrado por vía intravenosa o al cerebro del animal que padece LCT o es administrado por vía intravenosa o a la médula espinal o al espacio epidural de la médula espinal del animal que padece LME.
- 10 13. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo reduce de forma medible al menos un síntoma de daño fisiológico que resulta de LCT o LME en el animal en comparación con en ausencia de administración del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.
- 15 14. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el animal ha padecido LCT, y en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo mantiene una presión de perfusión cerebral (PPC) de por encima de 70-80 mmHg, o rebaja la presión intracraneal (PIC).
- 20 15. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el animal ha padecido LME, y en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo reduce la tumefacción en la médula espinal.
- 25 16. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es administrado en un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 17. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el portador farmacéuticamente aceptable es: a) un compuesto o composición que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica o b) un excipiente inyectable.
- 35 18. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cuando el animal ha padecido LCT, y en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es para uso junto con otro compuesto para uso en el tratamiento de un síntoma de LCT seleccionado entre el grupo constituido por: una deficiencia física, una deficiencia cognitiva y una deficiencia psicossocial-conductual-emocional.
- 40 19. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el compuesto se selecciona entre el grupo constituido por: un fármaco osmótico, un sedante, un analgésico, un relajante muscular y un barbitúrico.
- 45 20. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cuando el animal ha padecido LME, y en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es para uso junto con un esteroide.
- 50 21. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cuando el animal ha padecido LCT, y en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es para uso junto con un protocolo seleccionado entre el grupo constituido por: reducción de lesiones masivas mediante evacuación quirúrgica de hematomas intracraneales; reducción de la tumefacción cerebral con fármacos osmóticos; drenaje terapéutico de líquido cefalorraquídeo (LCR) a través de catéteres intraventriculares; exploraciones por tomografía computarizada (TC); sedación; analgesia; relajación muscular; hiperventilación moderada; hipotermia moderada; y coma inducido por barbitúricos.
- 55 22. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el animal ha padecido LME, y en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es para uso junto con un protocolo seleccionado entre el grupo constituido por: administración de esteroides; inmovilización de la columna; descompresión quirúrgica; cirugía para estabilizar las vértebras; cirugía para realinear las vértebras; y tracción.
- 60 23. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en el que el animal es un mamífero, preferentemente en el que el animal es un ser humano.
- 65 24. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el síntoma de LCT es vasoespasmos cerebrales, descenso de presión cardiovascular, hipotensión, hipoxemia, hipercarbina, hipoglucemia, deficiencia neurológica postraumática y muerte celular neuronal; y/o en el que el síntoma de LME es tumefacción de la médula espinal, déficit de la función motora o déficit de la capacidad de marcha.
25. Una composición para uso en la reducción o prevención de un síntoma de lesión cerebral traumática (LCT) o

lesión de médula espinal (LME) en un animal o para mejorar la recuperación de LCT o LME en un animal, en la que la composición comprende:

- 5 a) un primer agente seleccionado entre el grupo constituido por: un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une selectivamente a e inhibe la actividad del factor B, el factor D o properdina; y
b) un segundo agente para uso en el tratamiento de un síntoma de LCT o LME.

10 26. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 25, en la que el anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo se une al factor B dentro del tercer dominio de la repetición consenso corta (SCR) e inhibe o previene la formación de un complejo C3bBb.

15 27. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 25 ó 26, en la que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es: a) el anticuerpo monoclonal 1379 (producido por el N° de Depósito de la ATCC PTA-6230) o un fragmento de unión al antígeno del mismo; o b) un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une al mismo epítipo en el factor B que mAb 1379, preferentemente en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es una versión humanizada o quimérica de mAb 1379 o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

20 28. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 25, en la que el segundo agente es un compuesto para tratar un síntoma de LCT seleccionado entre el grupo constituido por: una deficiencia física, una deficiencia cognitiva y una deficiencia psicosocial-conductual-emocional.

25 29. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 25, en la que el segundo agente para tratar LCT se selecciona entre el grupo constituido por: un fármaco osmótico, un sedante, un analgésico, un relajante muscular y un barbitúrico.

30. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 25, en la que el segundo agente para tratar LME es un esteroide.

30 31. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 25, en la que el síntoma de LCT es una deficiencia física, una deficiencia cognitiva, una deficiencia psicosocial-conductual-emocional o muerte celular neuronal, y/o en el que el síntoma de LME es tumefacción de la médula espinal.

FIG. 1

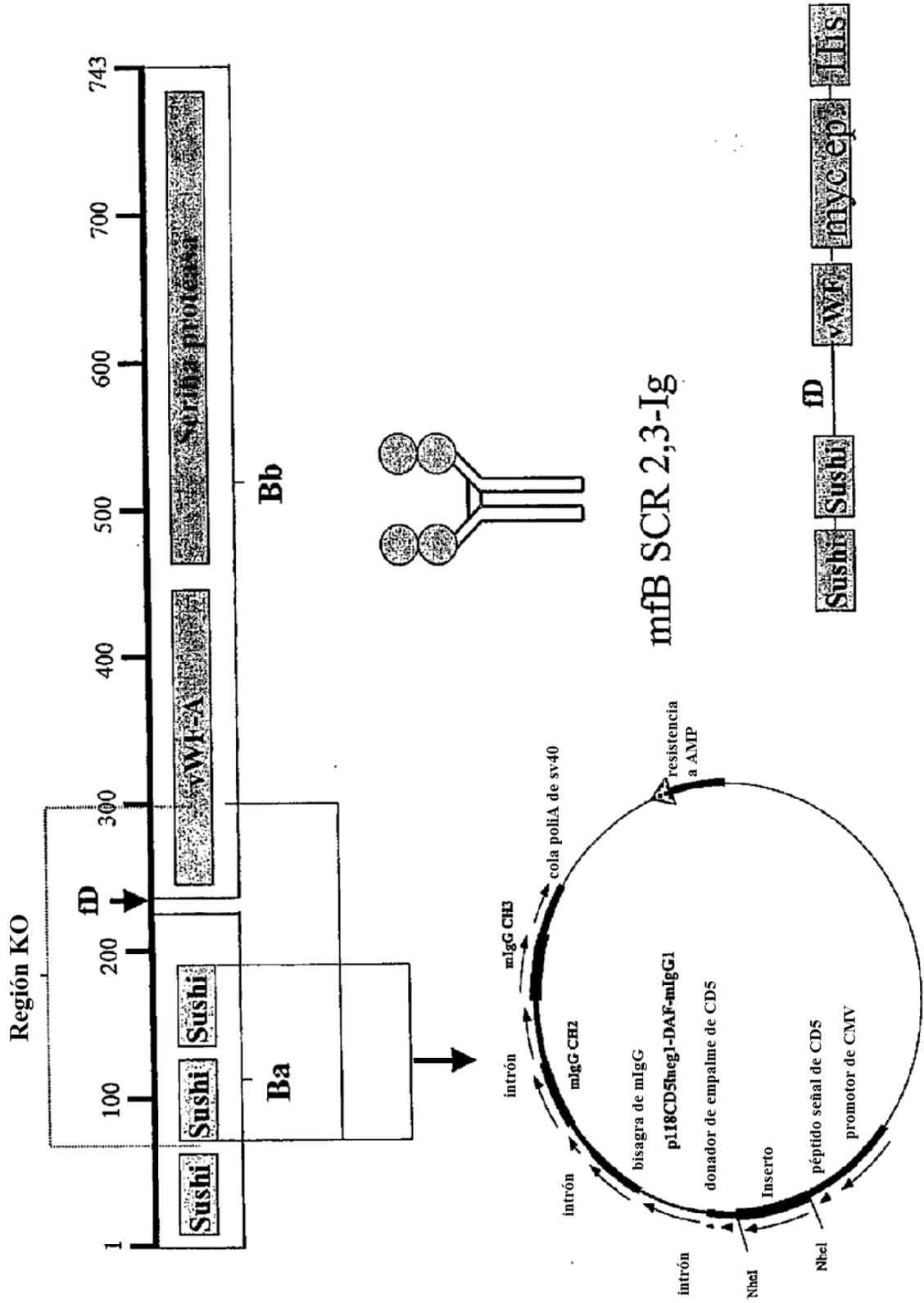


FIG. 2A

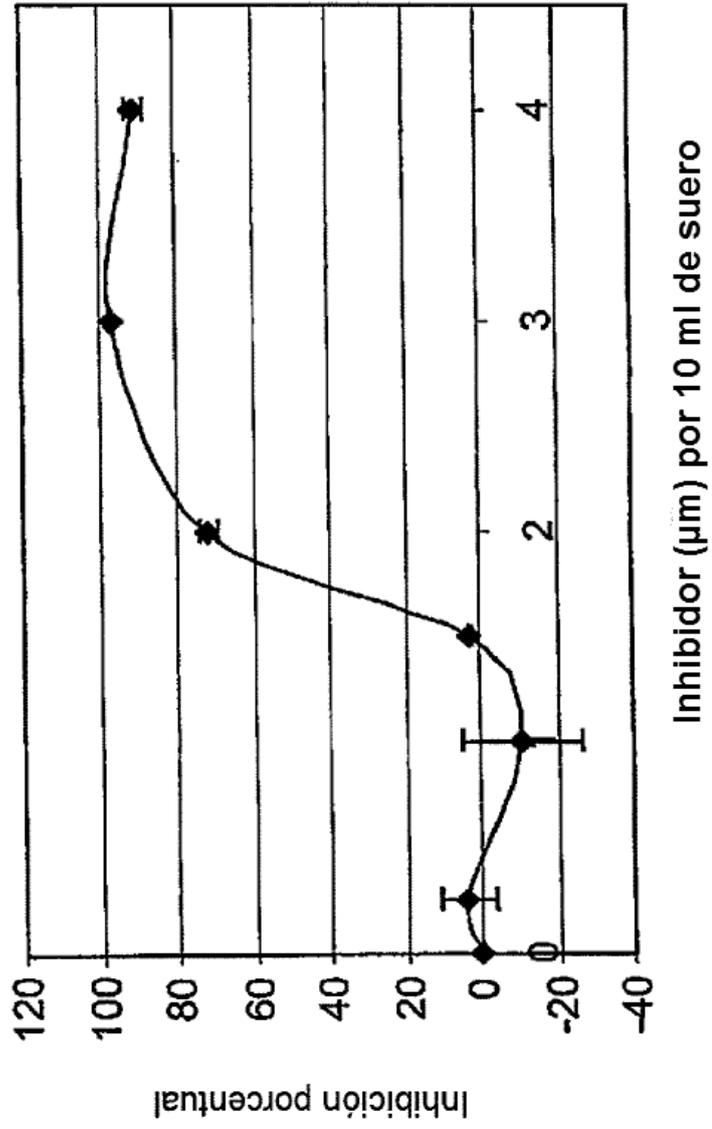


FIG. 2B

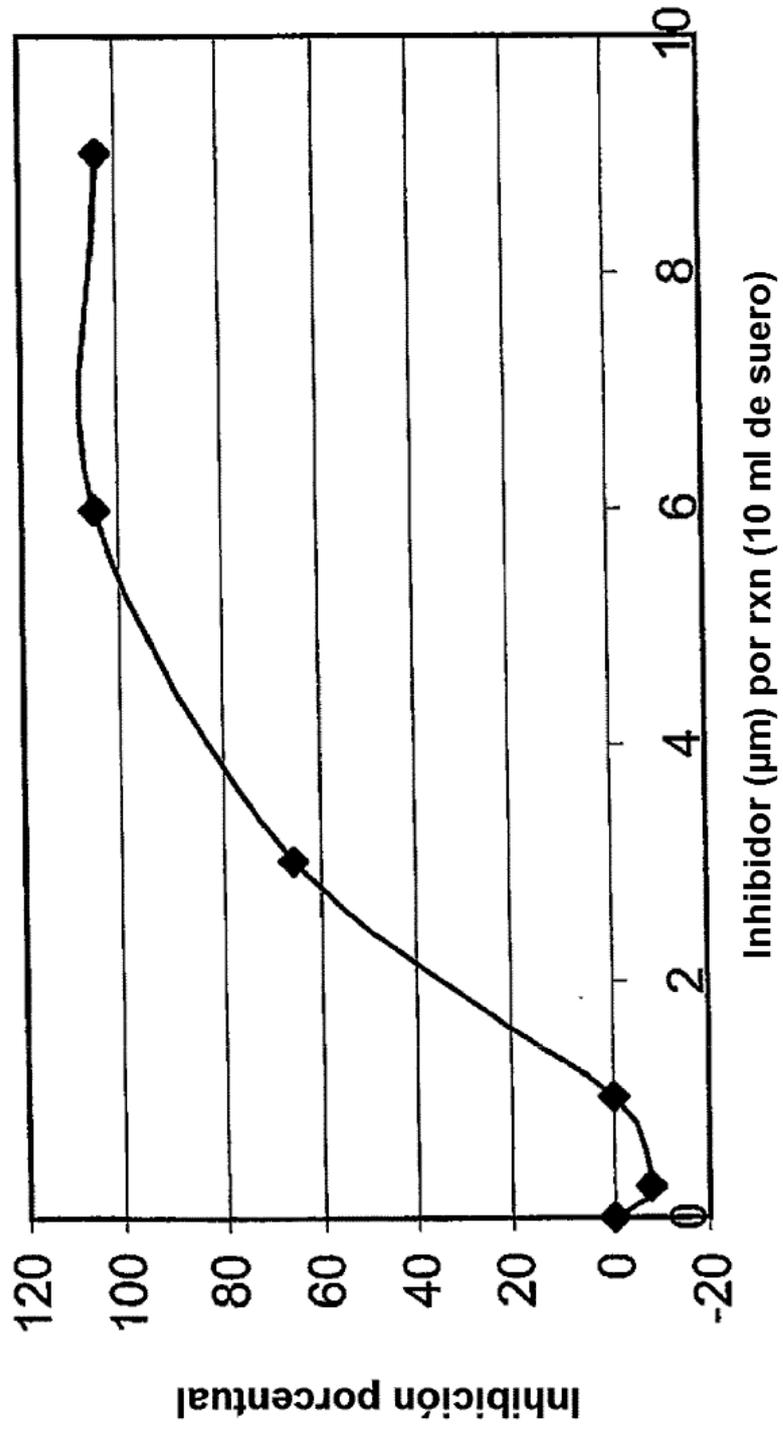


FIG. 3

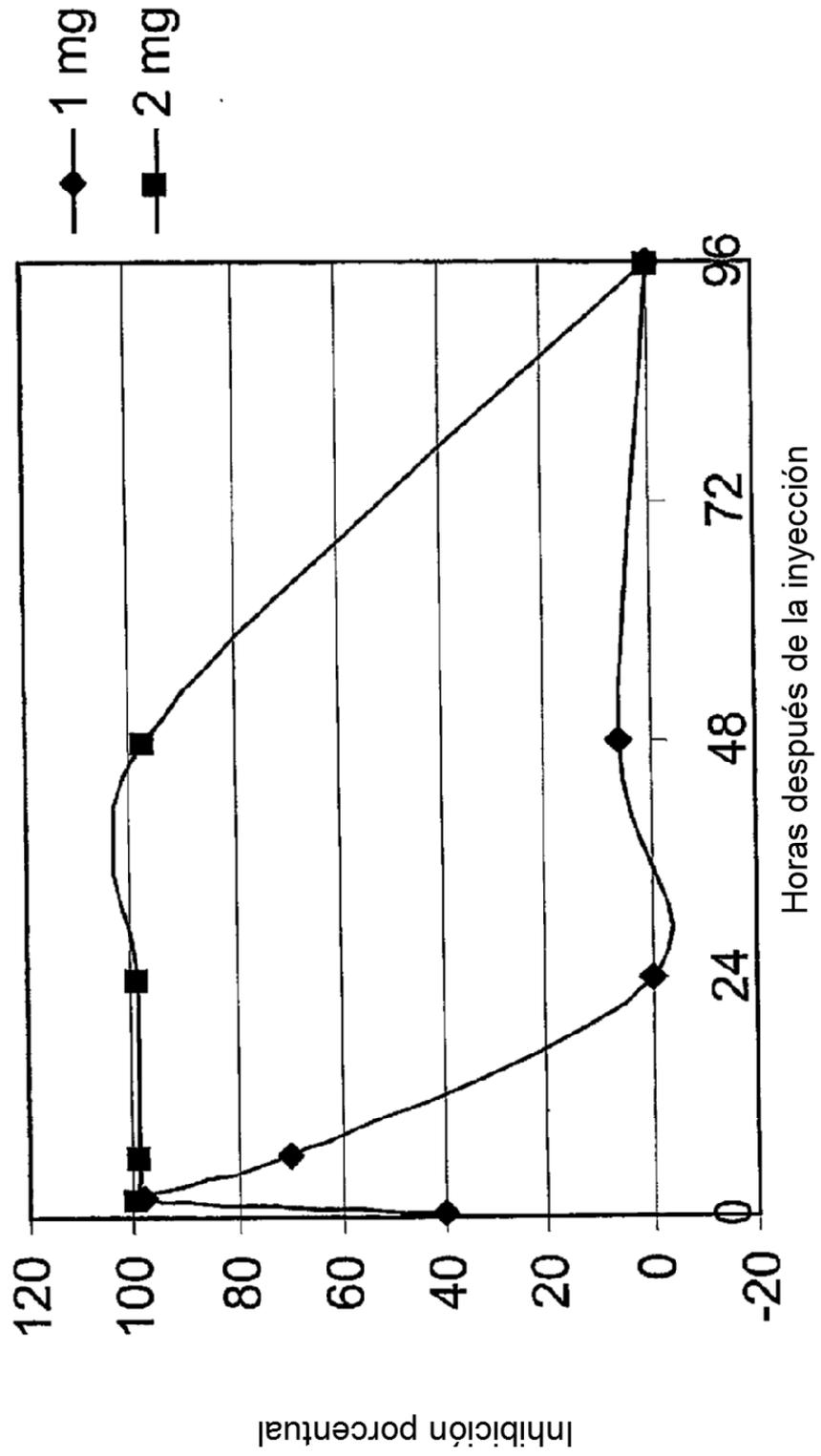


FIG. 4

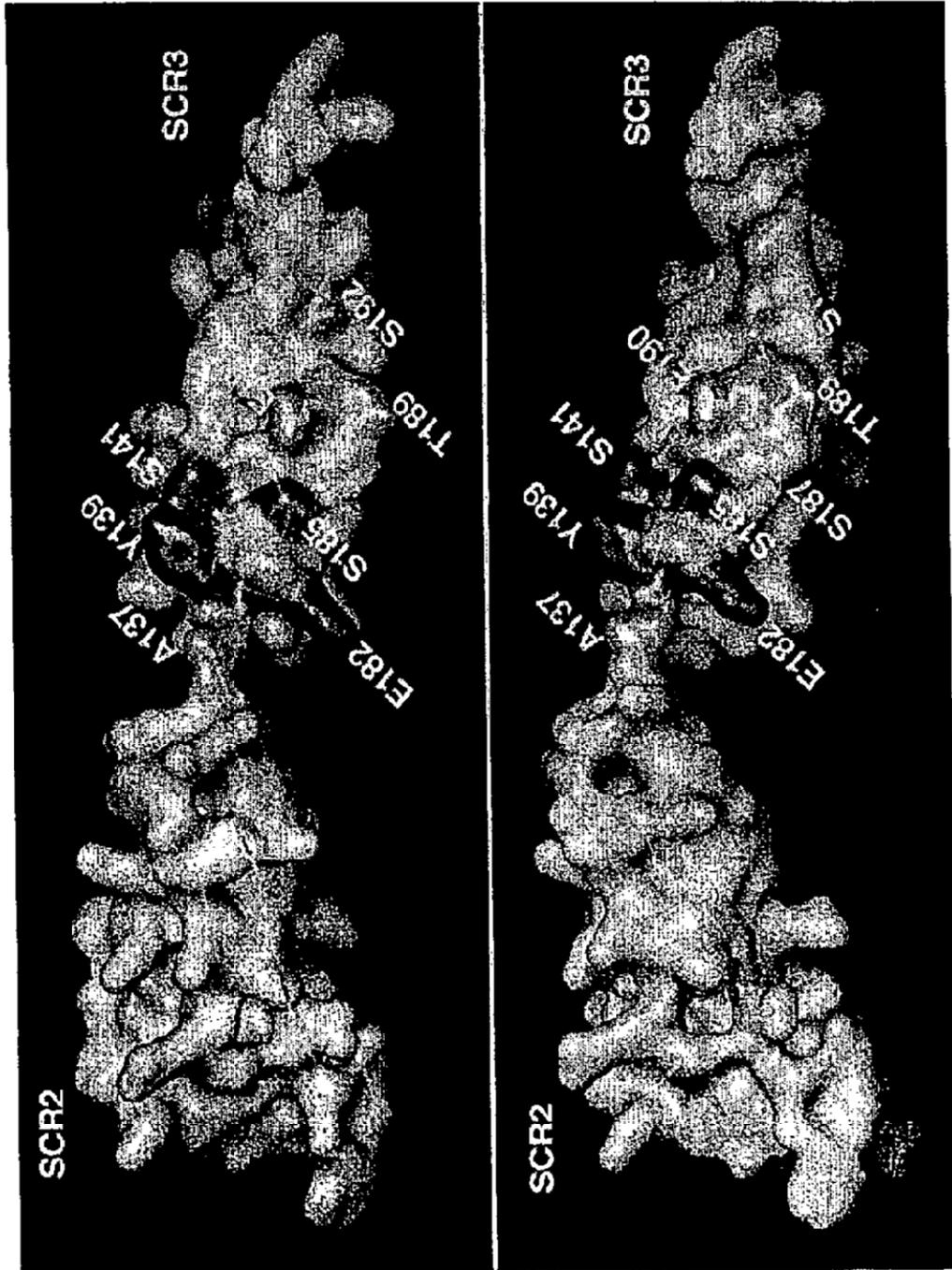
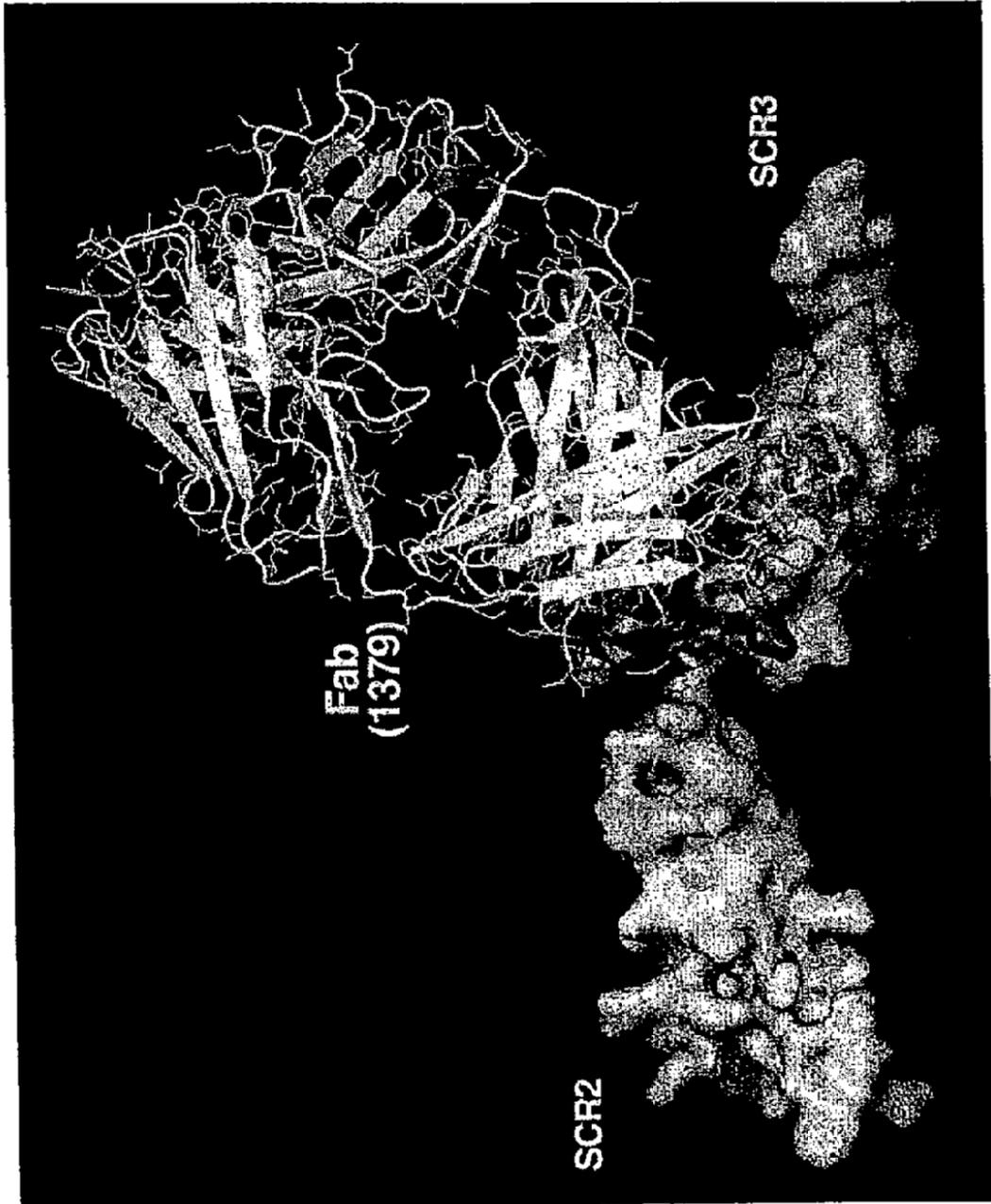


FIG. 5



Deficiencia neurológica después de traumatismo

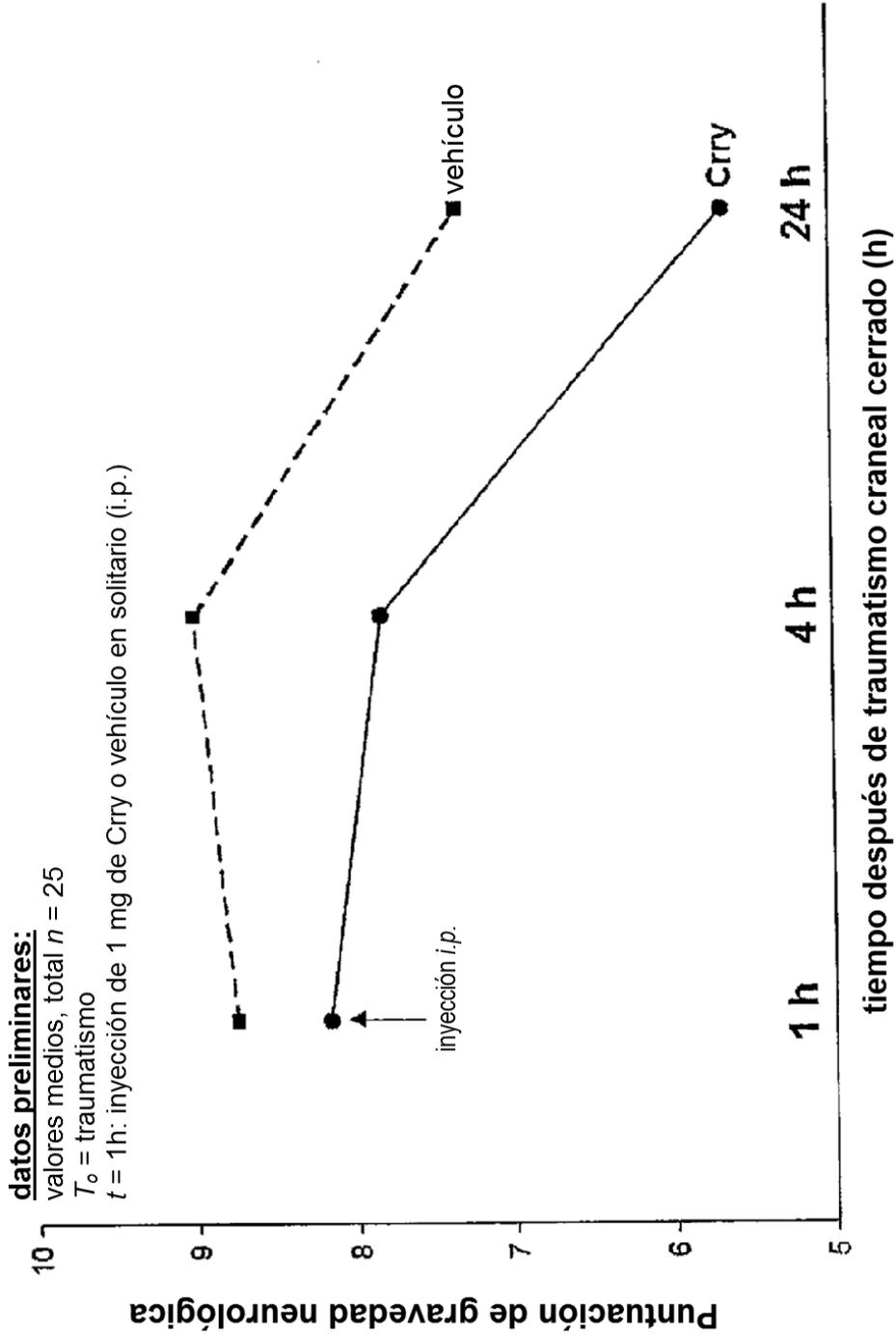
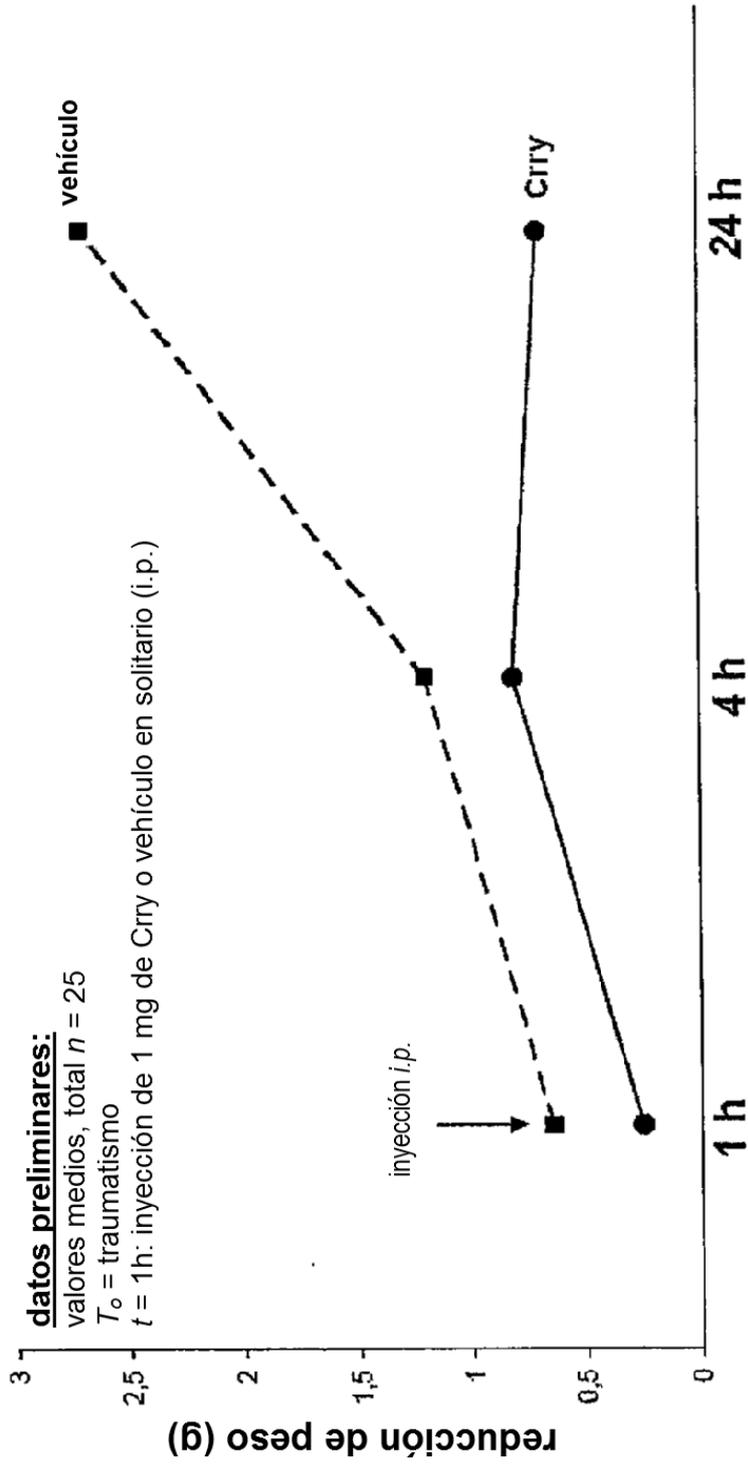


FIG. 6

Pérdida de peso después de traumatismo



Tiempo después de traumatismo craneal cerrado (h)

FIG. 7

FIG. 8

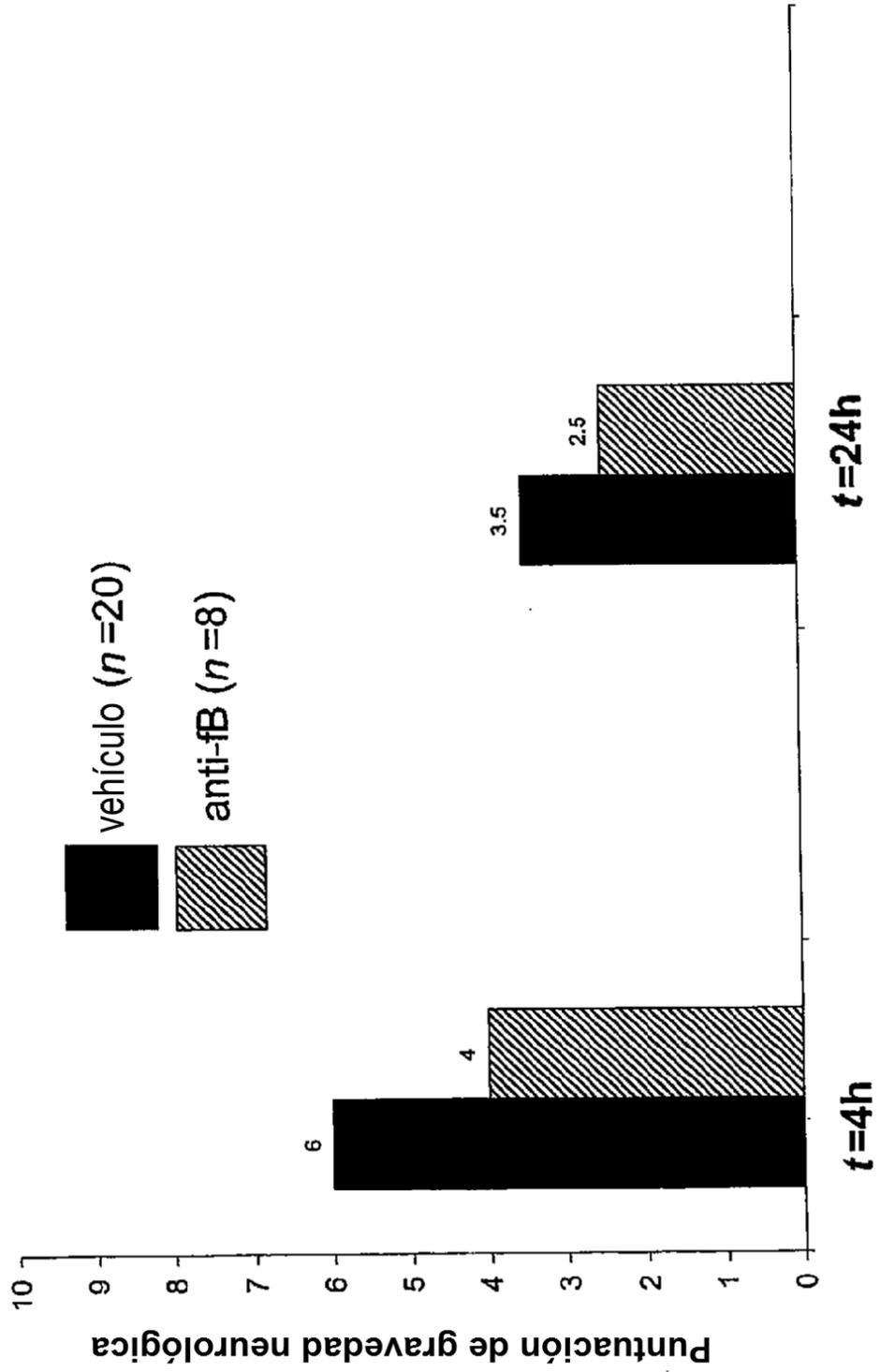


FIG. 9

Recuperación de lesión de médula espinal

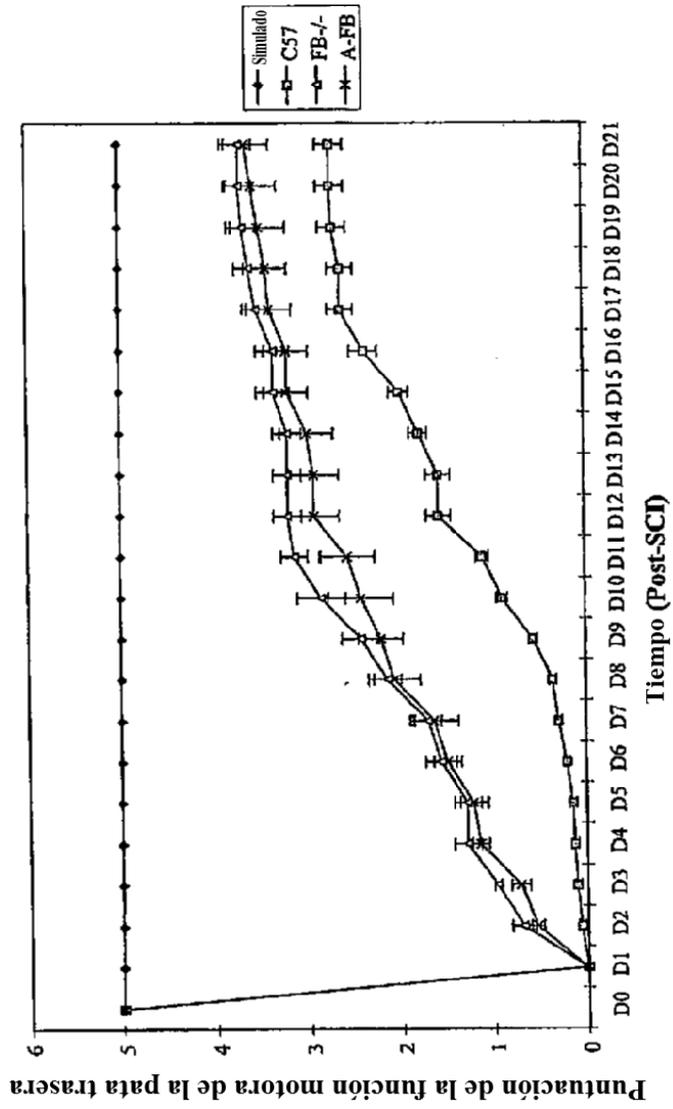


FIG. 10

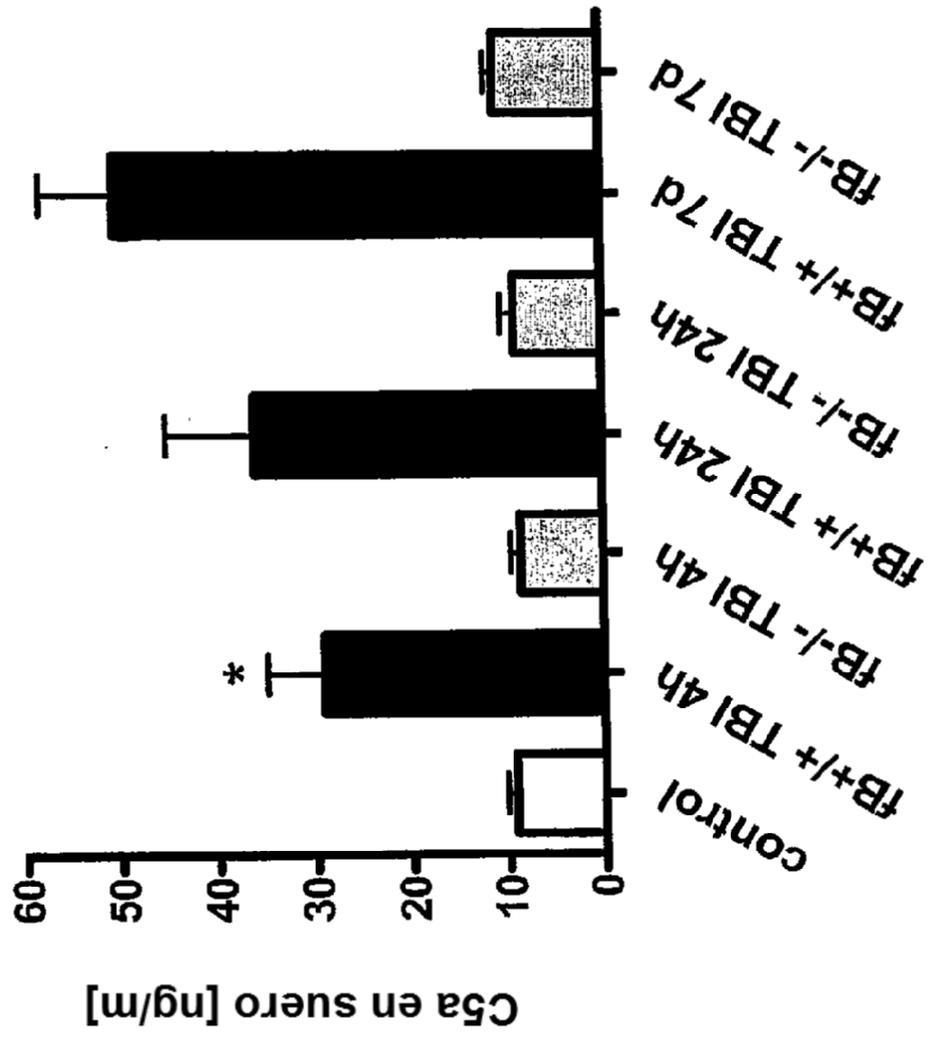
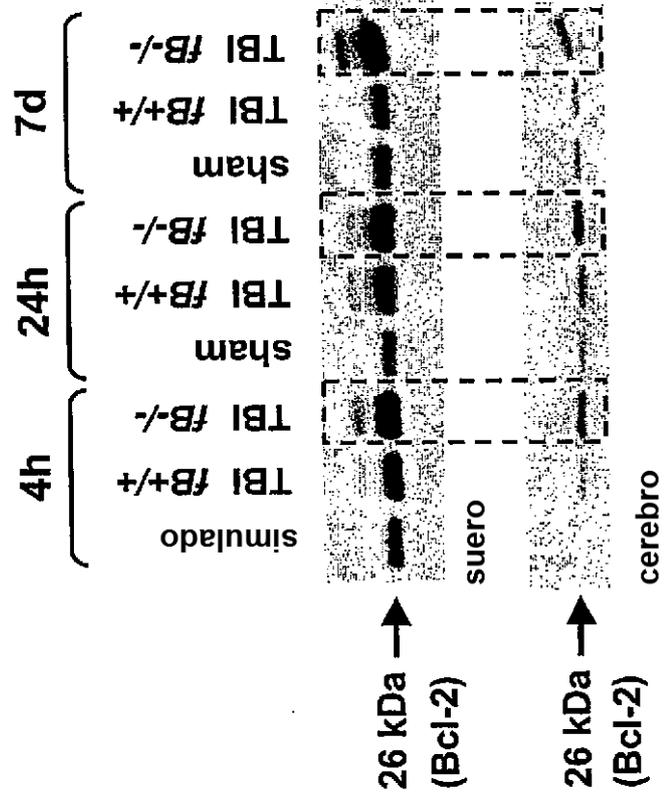


FIG. 11



Traumatismo craneal cerrado, $t = 4$ h

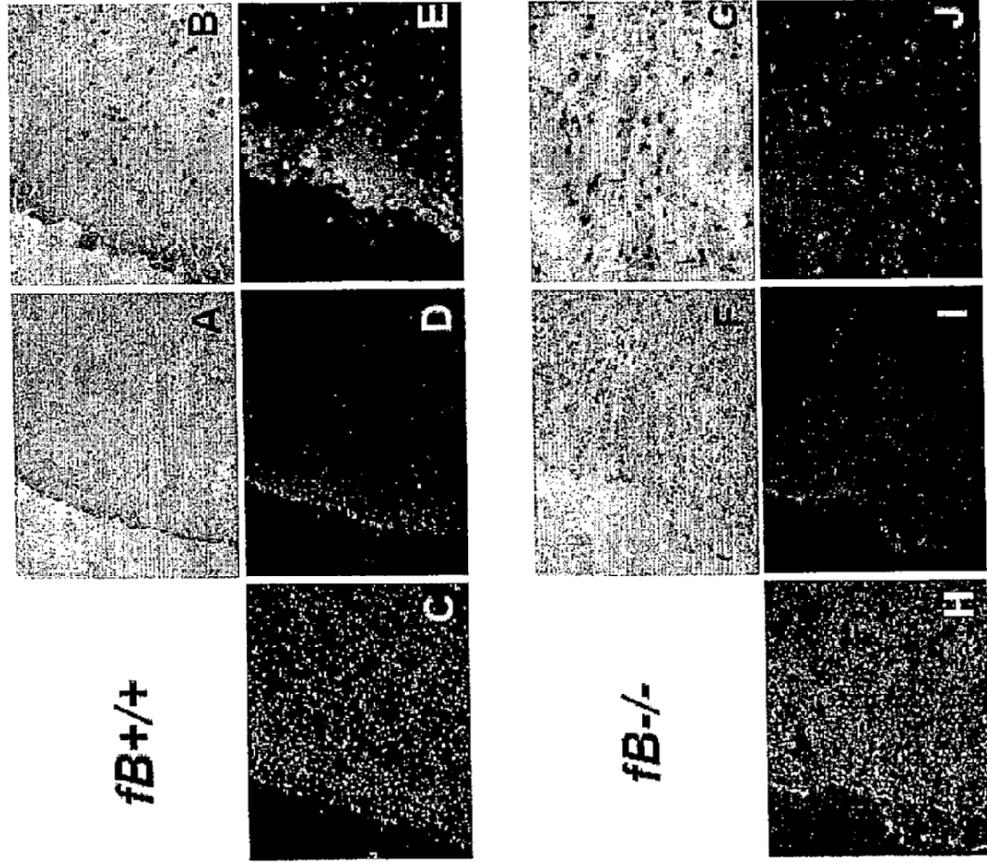


FIG. 12

Traumatismo craneal cerrado, $t = 24$ h

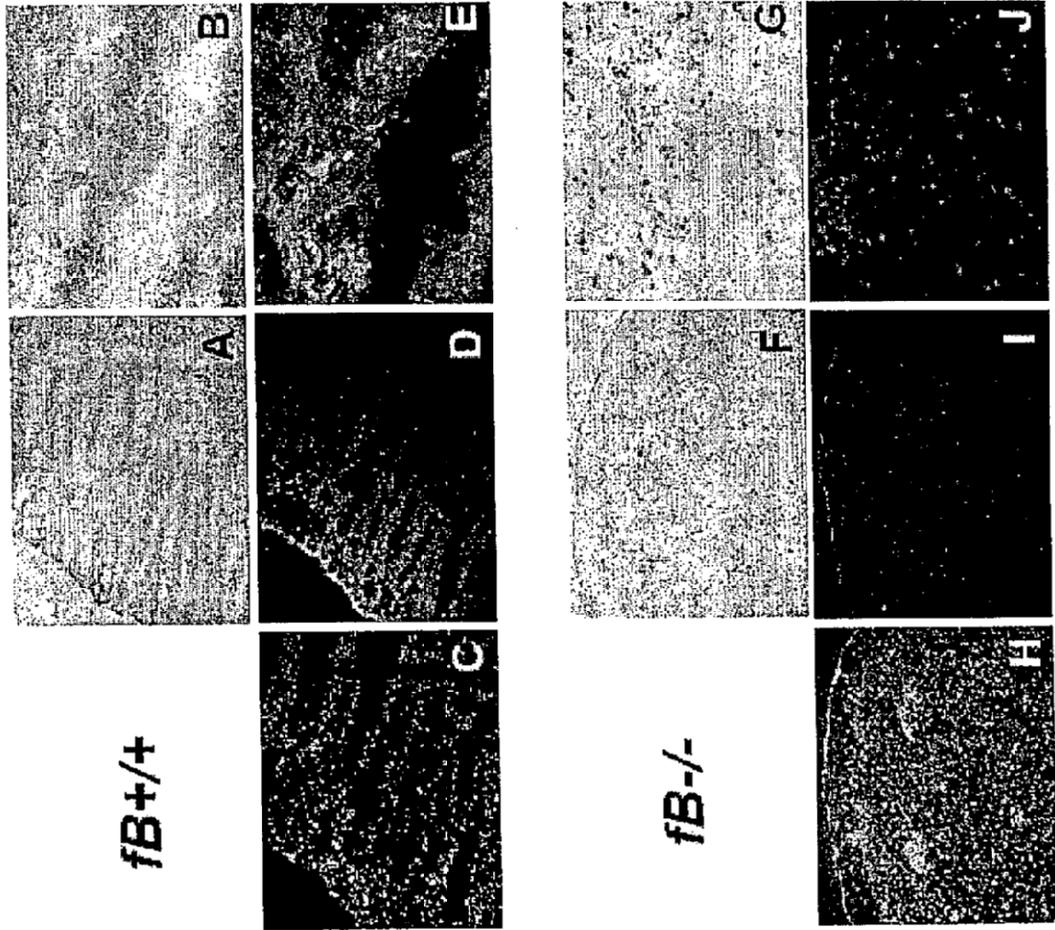


FIG. 13

Traumatismo craneal cerrado, $t = 7$ d

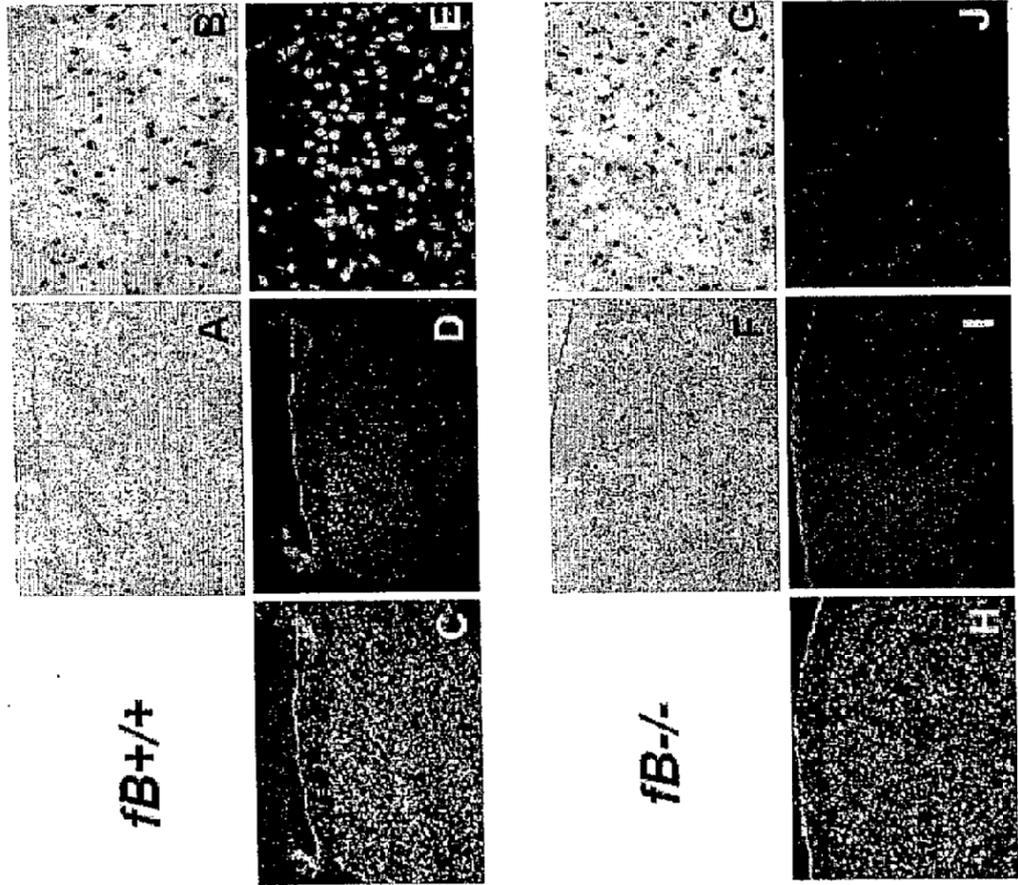


FIG. 14