

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 274**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2003 PCT/US2003/027808**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.03.2004 WO04022096**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2003 E 03752016 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 1545611**

54 Título: **Procedimiento de tratamiento de asma usando anticuerpos frente al componente de complemento C5**

30 Prioridad:

06.09.2002 US 408571 P
09.05.2003 US 469189 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.05.2017

73 Titular/es:

ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
352 Knotter Drive
Cheshire, CT 06410, US

72 Inventor/es:

WANG, YI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 614 274 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

Procedimiento de tratamiento de asma usando anticuerpos frente al componente de complemento C5

5 **Antecedentes****Campo técnico**

10 Esta divulgación se refiere a un procedimiento de tratamiento de asma usando un compuesto que se une a o de otro modo bloquea la generación y/o actividad de uno o más componentes de complemento tal como, por ejemplo, un anticuerpo inhibidor del complemento.

Descripción de la técnica anterior

15 El asma, bronquitis y enfisema se conocen de manera colectiva como enfermedades pulmonares obstructivas crónicas. Estas enfermedades se caracterizan como obstrucción generalizada de las vías respiratorias, especialmente de las vías respiratorias menores, asociada con grados variables de síntomas de bronquitis crónica, asma y enfisema. Estas enfermedades pueden coexistir con frecuencia en un individuo, y puede ser difícil de determinar la causa primaria de una obstrucción de las vías respiratorias. La obstrucción de las vías respiratorias se define como un aumento de la resistencia al flujo de aire durante la espiración forzada. La obstrucción de las vías respiratorias mayores muy producirse también en estas enfermedades, particularmente en asma.

25 El asma es un trastorno pulmonar obstructivo reversible provocado por una hipersensibilidad de las vías respiratorias a estímulos específicos y/o no específicos. La obstrucción de las vías respiratorias asmática resulta normalmente de broncoespasmos. El asma puede desencadenarse por una variedad de causas tales como reacciones alérgicas, una respuesta secundaria a infecciones, exposiciones industriales u ocupacionales, ingestión de ciertos productos químicos o fármacos, ejercicio y vasculitis. Gran parte de la patología de asma puede atribuirse a la desgranulación de mastocitos. Los mastocitos se desgranularán en respuesta a varios estados tales como, por ejemplo, estimulación con antígeno IgE clásica. Se cree que cuando el asmático, humano o animal, inhala una sustancia alérgica, los anticuerpos IgE sensibilizados desencadenan la desgranulación de mastocitos en el intersticio pulmonar. La desgranulación de mastocitos libera histamina, bradiquinina, y sustancia de reacción lenta de anafilaxis (SRS-A) que incluye los leucotrienos C, D y E, prostaglandinas que incluyen PGF₂, PGF_{2α}, y PGD₂, y tromboxano A₂. La histamina se une entonces a sitios de receptor en los bronquios mayores, causando irritación, inflamación y edema. La SRS-A se une a sitios de receptor en los bronquios menores, causando edema y atrayendo prostaglandinas, que potencian los efectos de histamina en los pulmones. La histamina, en combinación con las prostaglandinas, también estimula la secreción mucosa excesiva, estrechando adicionalmente el lumen bronquial. Cuando un individuo asmático inhala, el lumen bronquial estrechado todavía se expande ligeramente, permitiendo que el aire alcance los alveolos. Sin embargo, tras el esfuerzo de exhalar, el aumento de la presión torácica cierra el lumen bronquial completamente. Por tanto, el aire puede entrar en los pulmones, pero no puede salir durante un ataque de asma. La ventilación en los alveolos está entonces inhibida mediante la recogida mucosa en las bases del pulmón. En un esfuerzo de compensar la ventilación alveolar reducida, la sangre se desvía a otros alveolos. Sin la intervención médica puede resultar la hipoxia, y en casos extremos, acidosis respiratoria. En muchos casos, existen dos fases en un ataque de asma alérgico, una fase temprana y una fase tardía que sigue 4-6 horas tras estimulación bronquial. La fase temprana incluye la respuesta inflamatoria inmediata, incluyendo las reacciones provocadas por la liberación de mediadores celulares desde los mastocitos (es decir, histamina). Las reacciones de la fase tardía se desarrollan durante un periodo de horas y se caracterizan histológicamente por una afluencia temprana de leucocitos polimorfonucleares y deposición de fibrina, esta última seguida por la infiltración de eosinófilos. Un aumento de los niveles de mediadores inflamatorios derivados de eosinófilos en plasma y BAL, incluyendo la proteína catiónica eosinófila y la proteína básica principal, se ha observado durante la reacción de fase tardía. La regulación por incremento de citocinas tipo TH2 (IL4, IL5 e IL 13) que sigue a la exposición a alérgenos también se ha observado durante la fase tardía. Por tanto, la respuesta inflamatoria celular, en combinación con mediadores pro-inflamatorios liberados (por ejemplo, mmp9) y las citocinas producidas localmente en la mucosa bronquial, desempeñan un papel central en la inflamación alérgica de fase tardía y la broncoconstricción. Las reacciones de fase tardía aumentan la reactividad de las vías respiratorias y conducen a exacerbaciones asmáticas prolongadas que pueden durar desde horas a días hasta meses en algunos sujetos. Uno de los efectos residuales de las reacciones asmáticas es esta hipersensibilidad de las vías respiratorias a estímulos no específicos.

60 Actualmente, los tratamientos de asma no son siempre adecuados y muchos tienen efectos secundarios graves. Los objetivos generales de la terapia farmacológica para asma son la prevención de broncoespasmos y el control de la hiperreactividad o hipersensibilidad de las vías respiratorias, una indicación de la inflamación de las vías respiratorias. Es muy difícil de eliminar o prevenir la exposición a todos los alérgenos que pueden desencadenar un ataque de asma. Para prevenir estos ataques, la mayoría de los asmáticos se tratan con diversos agentes farmacológicos, muchos de los cuales tienen efectos secundarios.

65 En un estudio divulgado por Lukacs et al. (Lukacs *et al*, Am. J. Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001, vol. 280, páginas L512-L518), se administraron anticuerpos anti-C5a por vía intratraqueal junto con anticuerpo anti-BSA durante la

inducción de la inflamación pulmonar mediada por complejo inmunitario. De manera específica, el estudio de Lukacs usa un modelo de inflamación pulmonar tisular aguda mediada por complejo inmunitario similar a la reacción de Arthus pasiva inversa en la piel, con una breve AHR a exposiciones intravenosas de metacolina. Los animales no desarrollaron inflamación de las vías respiratorias crónica caracterizada por eosinofilia; ni experimentaron ataque asmático grave previo tras exponerse a alérgenos tal como se demuestra en la presente invención. La característica clave del estudio de Lukacs era la formación de complejos inmunitarios de BSA y anti-BSA localmente a lo largo de las vías respiratorias, que activan la cascada de complementos y producen cantidad significativa de componentes de complemento terminal tras inyectar por vía intratraqueal anticuerpo anti-BSA a los animales. El desarrollo posterior de AHR frente a metacolina que dura hasta cuatro horas durante la fase aguda de inflamación pulmonar inducida por BSA-anti-BSA, que se observa en contraste significativo con la AHR grave y de larga duración en pacientes con asma. Es razonable asumir basándose en el estudio de Lukacs que el anticuerpo anti-C5a neutraliza C5a producido localmente en las vías respiratorias y por tanto evita el desarrollo de acontecimientos posteriores nocivos mediados por C5a tal como la captación y activación de células inflamatorias, que estimulan la liberación de mediadores y síndromes de fuga vascular. La combinación logra bloquear la captación mediada por C5a de células inflamatorias, la liberación de mediadores tales como histamina, y el desarrollo de edema de vías respiratorias que conduce a la reducción de resistencia de las vías respiratorias y prevención del desarrollo de AHR cuando se expusieron los animales con metacolina iv. Este estudio puede sugerir la importancia de C5a en el desarrollo de AHR de inflamación pulmonar mediada por complejos inmunitarios. Sin embargo, este estudio no proporciona base para predecir si existe algún efecto directo e inmediato de dilatación bronquial mediante inhibidores de C5 durante un ataque asmático en curso o respuestas de las vías respiratorias de fase tardía a alérgenos. Ni este estudio implica el tratamiento de sujetos que tienen inflamación de las vías respiratorias establecida o sujetos que han experimentado síntomas asmáticos previos.

Abe *et al.* (J Immunol. 15 oct 2001;167(8):4651-60) investigaron la contribución de anafilatoxina C5a a respuestas de las vías respiratorias tardías tras la exposición repetida de antígeno a ratas alérgicas. Krug *et al.* (Am J Respir Crit Care Med. 15 nov 2001;164:1841-3) divulga que factores de complemento C3a y C5a están aumentados en fluido de lavado broncoalveolar tras provocación alérgica segmentaria en sujetos con asma. Thomas *et al.* (Mol Immunol. dic 1996; 33(17-18):1389-401) investigan la inhibición de la actividad del complemento mediante el anticuerpo anti-C5 humanizado y la cadena sencilla Fv.

Sumario

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo anti-C5 para su uso en el tratamiento de asma en un sujeto susceptible a o que tiene asma, en el que el anticuerpo anti-C5 es h5G1.1.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo anti-C5 para su uso para reducir la gravedad de un ataque de asma en un sujeto que tiene un ataque de asma, en el que el anticuerpo anti-C5 es h5G1.1.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo anti-C5 para su uso para reducir la obstrucción de las vías respiratorias en un sujeto que tiene asma, en el que el anticuerpo anti-C5 es h5G1.1

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un fármaco y un anticuerpo anti-C5 en combinación para su uso en el tratamiento de un sujeto susceptible a o que tiene asma, en el que el anticuerpo anti-C5 es h5G1.1 y en el que el fármaco se selecciona del grupo que consiste en esteroides, anticuerpos anti-IgE, anticuerpos anti-IL-4, anticuerpos anti-IL-5, agonistas de adrenorreceptores β_2 , inhibidores de leucotrienos, inhibidores de 5 lipoxigenasa, inhibidores de PDE, antagonistas de CD23, antagonistas de IL-13, inhibidores de la liberación de citocinas, antagonistas del receptor H1 de histamina, anti-histaminas e inhibidores de la liberación de histamina.

Se describe en el presente documento un tratamiento para asma usando un compuesto que se une a o de otro modo bloquea la generación y/o actividad de uno o varios componentes de complemento o bloquea el vínculo de receptores de componente de complemento tales como, por ejemplo, receptores de C5a. La terapia de tratamiento descrita en el presente documento incluye la administración de un compuesto que inhibe la producción y/o actividad de al menos un componente de complemento. Los compuestos adecuados incluyen, por ejemplo, anticuerpos que se unen a o de otro modo bloquean la generación y/o actividad de uno o varios componentes de complemento, tales como, por ejemplo, un anticuerpo específico para componente de complemento C5.

El compuesto inhibidor del complemento puede administrarse de manera profiláctica en individuos que se sabe que son asmáticos (tal como aquellos que tienen inflamación de las vías respiratorias establecida o un sujeto que ha experimentado síntomas asmáticos previos) para prevenir, o ayudar a prevenir ataques de asma. Esta terapia profiláctica puede administrarse por vía intravenosa, por aerosol, por vía subcutánea o por vía intramuscular.

El compuesto inhibidor del complemento puede administrarse como un régimen terapéutico a un individuo que experimenta un ataque de asma. El régimen puede administrarse por vía intravenosa, por aerosol, por vía subcutánea o por vía intramuscular.

Una terapia de combinación también puede usarse que incluye un compuesto inhibidor de complemento en combinación con un régimen de terapia para asma conocido, tal como, por ejemplo, esteroides, anticuerpos anti-IgE, anticuerpos anti-IL-4, anticuerpos anti-IL-5, agonistas de receptor β_2 , inhibidores de leucotrienos, inhibidores de 5 lipoxigenasa, agonistas de adrenorreceptores β_2 , inhibidores de PDE, antagonistas de IL 5, antagonistas de CD23, antagonistas de IL 13, inhibidores de la liberación de citocinas, antagonistas del receptor H1 de histamina, anti-histaminas e inhibidores de la liberación de histamina. Compuestos adecuados de cada clase enumerada anteriormente así como otros tratamientos de asma están enumerados en Asma Therapeutic: New Treatment Options and Emerging Drug Discovery Tasrgerts, Barnes, abril 2003, Lead Discovery, <http://www.leaddiscovery.co.uk/target-discovery/abstracts/dossier-asma.html>.

Un procedimiento para reducir la inflamación en los pulmones de pacientes con asma también se describe en el presente documento. Los procedimientos incluyen la etapa de administrar a un sujeto que tiene o susceptible de asma un compuesto que reduce la liberación o la producción de mediadores inflamatorios (tales como, por ejemplo, metaloproteasa de matriz 9 (mmp9 - también conocida como la colagenasa/gelatinasa tipo IV 92-kDa o gelatinasa B), TGF β , gránulos eosinófilos y similares) en las vías respiratorias del sujeto. El compuesto puede actuar a nivel celular para reducir la producción o la liberación del mediador inflamatorio, puede interactuar con el mediador inflamatorio de manera que interactúa con su actividad, (tal como, por ejemplo evitando la conversión de pro-mmp-9 en la forma activa de 83 kDa o puede interactuar con una forma activa) del mediador inflamatorio para prevenir los efectos inflamatorios asociados a esto.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra gráficamente las reacciones asmáticas inducidas por OVA en ratones BALB/c normales.

La figura 2a muestra el programa y la naturaleza de exposiciones a antígeno y tratamiento profiláctico de ratones BALB/c normales.

La figura 2b muestra un programa de exposición a antígeno y tratamiento profiláctico en ratones BALB/c normales.

La figura 3 resume gráficamente los efectos de los tratamientos mostrados en las figuras 2a y 2b.

La figura 4a muestra el programa y la naturaleza de exposiciones a antígeno y tratamiento iv o por aerosol de ratones BALB/c normales durante un ataque de asma.

La figura 4b representa el protocolo y los resultados de la inducción de ataque asmático en ratones BALB/c.

Las figuras 5a y 5b resumen gráficamente los efectos de los tratamientos por aerosol mostrados en la figura 4a.

Las figuras 6a y 6b resumen gráficamente los efectos de los tratamientos intravenosos mostrados en la figura 4a.

La figura 7 representa gráficamente los efectos sistémicos de diversos tratamientos sobre la actividad de C5 para tratamientos mostrados en la figura 4a.

La figura 8 muestra gráficamente el efecto de diversos tratamientos intravenosos sobre el recuento total de WBC en BAL.

Las figuras 9 y 10 muestran que se halló que los eosinófilos eran las células inflamatorias predominantes en BAL.

La figura 11 muestra gráficamente el efecto de diversos tratamientos intravenosos sobre histamina y en BAL.

La figura 12 muestra gráficamente el efecto de diversos tratamientos intravenosos sobre niveles de MMP-9 en BAL.

La figura 13 muestra gráficamente el efecto de diversos tratamientos intravenosos sobre niveles de TGF β en BAL.

La figura 14 muestra el programa y la naturaleza de exposiciones a antígeno y el tratamiento por canulación y aerosol de ratones BALB/c normales durante un ataque de asma.

La figura 15 muestra la resistencia pulmonar en ratones asmáticos tratados durante un ataque de asma con anti-C5, agonista del receptor β_2 o una combinación de los mismos.

Descripción detallada

La presente divulgación se refiere a un procedimiento de tratamiento de asma en mamíferos. Específicamente, los procedimientos de tratamiento de asma descritos en el presente documento implican usar compuestos que se unen a o de otro modo bloquean la generación y/o actividad de uno o varios componentes de complemento. La inhibición o el bloqueo de la generación de componentes de complemento inhibe múltiples factores implicados en las respuestas de bronco-constricción en asma. Una clase específica de tales compuestos, que son particularmente útiles, son anticuerpos específicos a un componente de complemento humano, especialmente anticuerpos anti-C5.

El sistema del complemento actúa junto con otros sistemas inmunológicos del organismo para defender contra la intrusión de patógenos celulares y virales. Existen al menos 25 proteínas de complemento, que se encuentran como una colección compleja de proteínas plasmáticas y cofactores de membrana. Las proteínas plasmáticas constituyen aproximadamente el 10 % de las globulinas en suero de vertebrados. Los componentes de complemento logran sus funciones de defensa inmunitaria mediante interacción en una serie de acontecimientos de escisión enzimática compleja pero precisa y de unión a membrana. La cascada de complementos resultante conduce a la producción de productos con funciones opsonicas, inmunorreguladoras y líticas. Un resumen conciso de las actividades biológicas asociadas a la activación del complemento se proporciona, por ejemplo, en The Merck Manual, 16ª edición.

La cascada de complementos se desarrolla por medio de la ruta clásica o la ruta alternativa. Estas rutas comparten muchos componentes, y aunque se diferencian en sus etapas iniciales, convergen y comparten los mismos componentes de "complemento terminal" (C5 a C9) responsables de la activación y destrucción de células diana.

5 La ruta de complementos clásica se inicia normalmente mediante el reconocimiento de anticuerpos de y unión a un sitio antigénico en una célula diana. La ruta alternativa es normalmente independiente de anticuerpos, y puede iniciarse por ciertas moléculas en superficies patogénicas. Adicionalmente, la ruta de lectinas se inicia normalmente con unión de lectina de unión a manosa (MBL) a altos sustratos de manosa. Estas rutas convergen en el punto donde el componente de complemento C3 se escinde mediante una proteasa activa (que es diferente en cada ruta) para proporcionar C3a y C3b. Otras rutas de activación del ataque de complemento pueden actuar más tarde en la secuencia de acontecimientos que conducen a diversos aspectos de la función del complemento.

15 C3a es una anafilatoxina. C3b se une a células bacterianas y otras células, así como también a ciertos virus y complejos inmunitarios, y las etiqueta para eliminarlas de la circulación. (C3b en este papel se conoce como opsonina.) La función opsonica de C3b se considera generalmente que es la acción anti-infecciosa más importante del sistema del complemento. Los pacientes con lesiones genéticas que bloquean la función de C3b son propensos a la infección por una amplia variedad de organismos patogénicos, mientras que se ha encontrado que los pacientes con lesiones más tarde en la secuencia de cascada de complementos, es decir pacientes con lesiones que bloquean las funciones de C5, son más propensos solo a infección por *Neisseria*, y entonces solo un tanto más propensos.

20 C3b también forma un complejo con otros componentes únicos para cada ruta para formar C5 convertasa clásica o alternativa, que escinde C5 en C5a y C5b. C3 se considera de ese modo como la proteína central en la secuencia de reacción de complemento ya que es esencial para las dos rutas alternativa y clásica. Esta propiedad de C3b se regula por el factor I de proteasa sérica, que actúa sobre C3b para producir iC3b. Aunque aún funcional como opsonina, iC3b no puede formar una C5 convertasa activa.

30 C5 es una beta-globulina de 190 kDa encontrada en suero normal en aproximadamente 75 µg/ml (0,4 µM). C5 se glicosila, atribuyéndose aproximadamente el 1,5-3 por ciento de su masa a hidratos de carbono. C5 maduro es un heterodímero de una cadena alfa de 999 aminoácidos de 115 kDa que está unida mediante disulfuro a una cadena beta de 656 aminoácidos de 75 kDa. C5 se sintetiza como un producto de proteína precursora de cadena sencilla de un gen de una sola copia (Haviland *et al.* J. Immunol. 1991,146:362-368). La secuencia de ADNc del transcrito de este gen predice un precursor pro-C5 secretado de 1659 aminoácidos junto con una secuencia líder de 18 aminoácidos (véase, patente estadounidense 6.355.245).

35 El precursor pro-C5 se escinde tras el aminoácido 655 y 659, para proporcionar la cadena beta como un fragmento amino-terminal (residuos de aminoácidos +1 con respecto a 655 de la secuencia anterior) y la cadena alfa como un fragmento carboxilo-terminal (residuos de aminoácidos 660 con respecto a 1658 de la secuencia anterior), con cuatro aminoácidos (residuos de aminoácidos 656-659 de la secuencia anterior) delecionados entre las dos.

40 C5a se escinde a partir de la cadena alfa de C5 mediante o bien la C5 convertasa alternativa o clásica como un fragmento amino-terminal que comprende los primeros 74 aminoácidos de la cadena alfa (es decir, residuos de aminoácidos 660-733 de la secuencia anterior). Aproximadamente el 20 por ciento de la masa de 11 kDa de C5a se atribuye a hidratos de carbono. El sitio de escisión para la acción convertasa está en, o inmediatamente adyacente al residuo de aminoácido 733 de la secuencia anterior. Un compuesto que se uniría a, o adyacente a este sitio de escisión tendría el potencial de bloquear el acceso de las enzimas C5 convertasa al sitio de escisión y por tanto actuaría como un inhibidor de complemento.

50 C5 puede activarse también por medio de otra actividad distinta de C5 convertasa. La digestión con tripsina limitada (Minta y Man, J. Immunol. 1977, 119:1597-1602; Wetsel y Kolb, J. Immunol. 1982, 128:2209-2216) y el tratamiento con ácido (Yammamoto y Gewurz, J. Immunol. 1978,120:2008; Damerau *et al.*, Molec. Immunol. 1989, 26:1133-1142) también pueden escindir C5 y producir C5b activo.

55 La escisión de C5 libera C5a, una potente anafilatoxina y factor quimiotáctico, y conduce a la formación del complejo de complemento terminal lítico, C5b-9. C5a y C5b-9 también tienen propiedades de activación de células pleiotrópicas, amplificando la liberación de factores inflamatorios posteriores, tales como enzimas hidrolíticas, especies de oxígeno reactivas, metabolitos de ácido araquidónico y diversas citocinas.

60 C5b combina con C6, C7 y C8 para formar el complejo C5b-8 en la superficie de la célula diana. Tras la unión de varias moléculas de C9, se forma el complejo de ataque a membrana (MAC, C5b-9, complejo de complemento terminal -- TCC). Cuando se inserta un número suficiente de MAC en membranas de células diana, las aberturas que crean (poros de MAC) median la lisis osmótica rápida de las células diana. Concentraciones inferiores, no líticas de MAC pueden producir otros efectos. En particular, la inserción de membrana de un pequeño número de complejos C5b-9 en células endoteliales y plaquetas puede causar la activación celular destructora. En algunos casos, la activación puede preceder a la lisis celular.

65

Tal como se ha mencionado anteriormente, C3a y C5a son anafilatoxinas. Estos componentes de complemento activados pueden desencadenar la desgranulación de mastocitos, que libera histamina de basófilos y mastocitos, y otros mediadores de inflamación, que dan como resultado la contracción del músculo liso, un aumento de la permeabilidad vascular, activación de leucocitos, y otros fenómenos inflamatorios incluyendo la proliferación celular dando como resultado la hiperplasia. C5a actúa también como un péptido quimiotáctico que sirve para atraer los granulocitos pro-inflamatorios al sitio de activación del complemento.

Los receptores de C5a se encuentran en las superficies de células epiteliales bronquiales y alveolares y células de músculo liso bronquiales. Los receptores de C5a se han encontrado también en eosinófilos, mastocitos, monocitos, neutrófilos y linfocitos activados. Así, los compuestos que bloquean la conexión de receptores de componentes de complemento son útiles en el presente documento.

Cualquier compuesto que se una a o de otro modo bloquee la generación y/o actividad de cualquiera de los componentes de complemento humano, tal como, por ejemplo, anticuerpos específicos para un componente de complemento humano, es útil en el presente documento. Algunos compuestos incluyen anticuerpos dirigidos contra los componentes de complemento C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, factor D, factor B, factor P, MBL, MASP-1, y MASP-2, previniendo de ese modo la generación de la actividad anafilatóxica asociada con C5a y previniendo el ensamblaje del complejo de ataque a membrana asociado con C5b. También son útiles en los procedimientos descritos en el presente documento formas que se producen en la naturaleza o solubles de compuestos inhibidores de complemento tales como CR1, LEXCR1, MCP, DAF, CD59, factor H, factor de veneno de cobra, FUT-175, y proteína de unión, complestatina, y K76 COOH.

Los compuestos particularmente útiles para su uso, tal como se ha descrito en el presente documento, son anticuerpos que reducen, directa o indirectamente, la conversión del componente de complemento C5 en componentes de complemento C5a y C5b. Una clase de anticuerpos útiles son aquellos que tienen al menos un sitio de unión a antígeno de anticuerpo y que muestran unión específica al componente de complemento humano C5, en los que la unión específica está dirigida a la cadena alfa de componente de complemento humano C5. Más en particular puede usarse un anticuerpo monoclonal (Acm). Un anticuerpo de este tipo 1) inhibe la activación del complemento en un fluido corporal humano; 2) inhibe la unión de componente de complemento humano C5 purificado a o bien componente de complemento humano C3 o componente de complemento humano C4; y 3) no se une específicamente al producto de activación del complemento humano para C5a. Los inhibidores de complemento particularmente útiles son compuestos que reducen la generación de C5a y/o C5b-9 en más de aproximadamente el 30 %. Los anticuerpos anti-C5 que tienen la capacidad deseable de bloquear la generación de C5a se conocen en la técnica desde al menos 1982 (Moongkarndi *et al.* Immunobiol. 1982, 162:397; Moongkarndi *et al.* Immunobiol. 1983, 165:323). Los anticuerpos conocidos en la técnica que son inmunorreactivos frente a C5 o fragmentos de C5 incluyen anticuerpos frente a la cadena beta de C5 (Moongkarndi *et al.* Immunobiol. 1982, 162:397; Moongkarndi *et al.* Immunobiol. 1983, 165:323; Wurzner *et al.* 1991, citado anteriormente; Mollnes *et al.* Scand. J. Immunol. 1988,28:307-312); C5a (véase por ejemplo, Ames *et al.* J. Immunol. 1994, 152:4572-4581, patente estadounidense n.º 4.686.100, y publicación de patente europea n.º 0 411 306); y anticuerpos frente a C5 no humano (véase por ejemplo, Giclas *et al.* J. Immunol. Meth. 1987, 105:201-209). Los anticuerpos anti-C5 particularmente útiles son h5G1.1, h5G1.1-scFv y fragmentos funcionales de h5G1.1. Los procedimientos para la preparación de h5G1.1, h5G1.1-scFv y fragmentos funcionales de h5G1.1 se describen en la patente estadounidense n.º 6.355.245 y "Inhibition of Complement Activity by Humanized Anti-C5 Antibody and Single Chain Fv", Thomas *et al.*, Molecular Immunology, vol. 33, n.º 17/18, páginas 1389-1401, 1996.

Funcionalmente, un anticuerpo adecuado inhibe la escisión de C5, que bloquea la generación de potentes moléculas proinflamatorias C5a y C5b-9 (complejo de complemento terminal). Preferentemente, el anticuerpo no evita la formación de C3b, que favorece las funciones inmunoprotectoras críticas de opsonización y aclaramiento del complejo inmunitario.

Durante la prevención de la generación de estos componentes de complemento terminal proinflamatorios, la inhibición mediada por anticuerpos de la cascada de complementos en C5 conserva la capacidad de generar C3b, que es crítico para la opsonización de muchos microorganismos patogénicos, así como también para la solubilización y aclaramiento del complejo inmunitario. Retener la capacidad para generar C3b parece ser particularmente importante como factor terapéutico en la inhibición del complemento para enfermedades inflamatorias, en las que un aumento de la susceptibilidad a la infección y el aclaramiento deteriorado de complejos inmunitarios son características clínicas preexistentes del proceso patológico.

El anticuerpo anti-C5 humano descrito en el presente documento es preferentemente un anticuerpo monoclonal, aunque también pueden usarse si se desea anticuerpos policlonales producidos y seleccionados mediante técnicas convencionales.

Los anticuerpos anti-C5 preferentes usados para tratar asma de acuerdo con esta descripción se unen a C5 o fragmentos del mismo, por ejemplo, C5a o C5b. Preferentemente, los anticuerpos anti-C5 son inmunorreactivos frente a epítopos en la cadena alfa del componente de complemento humano C5 purificado y pueden bloquear la

conversión de C5 en C5a y C5b mediante la C5 convertasa. Esta capacidad puede medirse usando las técnicas descritas en Wurzner, *et al.*, *Complement Inflamm* 8:328-340, 1991.

5 En una descripción particularmente útil, los anticuerpos anti-C5 no son inmunorreactivos frente a epítopos en la cadena beta, sino que más bien son inmunorreactivos frente a epítopos dentro de la cadena alfa del componente de complemento humano C5 purificado. En esta descripción, los anticuerpos también pueden bloquear la conversión de C5 en C5a y C5b mediante la C5 convertasa. Dentro de la cadena alfa, los anticuerpos más preferentes se unen a una región amino-terminal, sin embargo no se unen a C5a libre.

10 Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales reactivos con el componente de complemento C5 pueden obtenerse de acuerdo con las enseñanzas de Sims, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.135.916. Los anticuerpos se preparan usando componentes purificados del complejo de ataque a membrana de complemento como inmunógenos de acuerdo con los procedimientos conocidos. De acuerdo con esta descripción, el componente de complemento C5 o C5b se usa preferentemente como el inmunógeno. De acuerdo con descripciones útiles
15 particularmente preferentes, el inmunógeno es la cadena alfa de C5.

Los anticuerpos particularmente útiles comparten las propiedades funcionales requeridas tratadas en el párrafo anterior y tienen cualquiera de las siguientes características:

- 20 (1) éstos compiten por la unión a porciones de C5, la cadena alfa de C5; y
 (2) éstos se unen específicamente a la cadena alfa de C5. Tal unión específica y la competencia por la unión puede determinarse mediante diversos procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo el procedimiento de resonancia de plasmones superficiales (Johns *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 1993,160:191-198).
 (3) Éstos bloquean la unión de C5 a o bien a C3 o C4 (que son componentes de la C5 convertasa).

25 Se proporciona un procedimiento para reducir la inflamación en los pulmones de pacientes con asma. Los procedimientos incluyen la etapa de administrar a un sujeto que tiene o susceptible a asma un compuesto que reduce la producción o liberación de mediadores inflamatorios en las vías respiratorias del sujeto. Ejemplos no limitativos de mediadores inflamatorios que pueden reducirse de acuerdo con esta descripción incluyen TGFβ,
 30 proteínas granulares eosinófilas y metaloproteasa de matriz 9 (mmp9 - también conocida como la colagenasa/gelatinasa tipo IV de 92-kDa o gelatinasa B). Los compuestos pueden reducir la inflamación mediante cualquier variedad de mecanismos. Si el mediador inflamatorio es MMP-9, por ejemplo, el compuesto puede actuar a nivel celular para reducir la producción o liberación de pro-mmp-9, puede interactuar con pro-mmp-9 de manera que prevenga la conversión de pro-mmp-9 para dar la forma activa de 83 kDa o puede interactuar con la forma
 35 activa de mmp9 para prevenir los efectos inflamatorios asociados con la enzima (tal como, por ejemplo, la generación de TGF-beta). Los compuestos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los compuestos descritos anteriormente que se unen a o de otro modo bloquean la generación y/o liberación y/o actividad de uno o varios componentes de complemento o bloquean la conexión de los receptores de los componentes de complemento.

40 La actividad de MMP-9 puede detectarse de acuerdo con una variedad de procedimientos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, los procedimientos zimográficos cuantitativos proporcionan una evaluación relativamente refinada de la actividad de esta enzima. Este procedimiento permite la detección de la actividad de MMP-9 basándose en capacidad de la enzima de hidrolizar colágeno desnaturalizado, es decir, gelatina, que es un sustrato natural para MMP-9. La gelatina se incorpora en un gel tal como poli(acrilamida). Véase Hibbs *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2493-2500
 45 (1985) y Moll *et al.*, *Cancer Res.* 50:6162-70 (1990). El ensayo puede normalizarse usando una preparación de MMP-9 purificada que se analiza en paralelo con la muestra de prueba. Puede prepararse MMP-9 purificada mediante procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Okada *et al.*, citado anteriormente, y Morodomi *et al.*, *Biochem J.* 285:603:11 (1992). El grado de hidrólisis de la gelatina está directamente relacionado con la actividad de MMP-9 en la muestra y las formas activas de MMP-9 pueden identificarse mediante sus pesos
 50 moleculares característicos. En la zimografía de gelatina, las especies de proMMP-9 pueden detectarse debido a la activación catalítica que se produce durante la electroforesis y posterior incubación. Sin embargo, las formas de MMP-9 presentes antes de la aparición de laboratorio no pueden someterse a este tipo de activación, es decir, son latentes.

55 La actividad de MMP-9 puede detectarse también usando técnicas inmunológicas convencionales, por ejemplo, ELISA, ensayos de inmunofluorescencia o radioinmunoensayos. En una realización preferente, la actividad de MMP-9 se detecta usando ELISA, que implica el uso de anticuerpos específicos para MMP-9. Véase David *et al.*, patente estadounidense n.º 4.376.110 (y las referencias citadas en la misma). Los anticuerpos monoclonales específicos para MMP-9 se han preparado usando preparaciones de enzimas parcialmente purificadas. Véase, por ejemplo, Moll
 60 *et al.*, citado anteriormente; Ramos-DeSimone *et al.*, *HIBRIDOMA* 12(4):349-63 (1993) y Goldberg *et al.* Los anticuerpos policlonales específicos para MMP-9 pueden prepararse también de acuerdo con procedimientos convencionales. En una descripción preferente, los anticuerpos policlonales se preparan usando péptidos no conservados conjugados con un vehículo macromolecular. La elección de un péptido no conservado específico tal como el dominio de unión a metal, entre los miembros de las MMP se considera dentro de un nivel de habilidad
 65 ordinaria en la técnica. Véase Woessner, y Goldberg *et al.*, citado anteriormente. Ensayos enzimáticos que pueden

detectar MMP-9 en cantidades de picograma o nanograma se describen también en Manicourt *et al.*, Anal. Biochem. 215(2):171-9 (1993).

5 La actividad de MMP-9 puede detectarse además en una muestra mediante análisis de inmunotransferencia tipo western, que requiere separación electroforética del material de prueba en un gel, seguido de transferencia de las proteínas separadas a una membrana de nitrocelulosa y detección de los antígenos MMP-9 con un anticuerpo específico y reactivo que reacciona con el anticuerpo fijado al antígeno. Véase Towbin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(9):4350-4354 (1979).

10 Los ensayos adecuados para la detección de mmp9 están disponibles comercialmente de una variedad de fuentes tales como, por ejemplo Boehringer Mannheim Biochemicals (Mannheim, Alemania) y R&D Systems, (Minneapolis, MN).

15 El compuesto que inhibe la producción y/o actividad de al menos un componente de complemento puede administrarse en una variedad de formas de administración unitaria. La dosis variará de acuerdo con el compuesto particular empleado. Por ejemplo, diferentes anticuerpos pueden tener diferentes masas y/o afinidades, y así requieren diferentes niveles de dosificación. Los anticuerpos preparados como fragmentos Fab' requerirán también diferentes dosificaciones que las inmunoglobulinas intactas equivalentes, ya que son de masa considerablemente menor que las inmunoglobulinas intactas, y así requieren dosificaciones inferiores para alcanzar los mismos niveles molaes en la sangre del paciente.

La dosis variará también dependiendo del modo de administración, los síntomas particulares del paciente que está tratándose, la salud general, estado, tamaño, y edad del paciente y la valoración del médico encargado.

25 La administración del compuesto que inhibe la producción y/o actividad de al menos un componente de complemento será generalmente en una forma de aerosol con un vehículo farmacéuticamente adecuado, por medio de infusión intravenosa, mediante inyección, o inyección subcutánea. Si se desea pueden usarse otras vías de administración. La administración por aerosol se prefiere puesto que evita los efectos sistémicos del compuesto inhibidor del complemento, mientras que proporciona los efectos deseados para el tratamiento de asma para que se consigan de acuerdo con esta descripción.

35 Las formulaciones adecuadas para inyección se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17^a ed. (1985). Tales formulaciones deben ser estériles y no pirogénicas, y generalmente incluirán un vehículo farmacéuticamente eficaz, tal como solución salina, solución salina tamponada (por ejemplo, tamponada con fosfato), solución de Hank, solución de Ringer, dextrosa/solución salina, soluciones de glucosa y similares. Las formulaciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables si se requieren, como tales, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, agentes bactericidas, conservantes, estabilizadores y similares.

40 EJEMPLO 1- El uso de anticuerpos anti-C5 como un profiláctico para la inhibición de C5 para tratar asma.

Se indujo asma en ratones BALB/c normales exponiéndolos a antígeno de ovoalbúmina ("OVA") y alumbre, de acuerdo con las dosificaciones y el programa mostrados en la figura 4b. Estas exposiciones solicitaron la respuesta asmática convencional durante un ataque. Los ratones expuestos mostraron tanto reacciones de fase temprana como reacciones de fase tardía. Tal como puede observarse en la figura 1, la reacción de fase temprana era resistencia específica de las vías respiratorias en el intervalo de 15 minutos tras la exposición. Una reacción de fase tardía más grave de la resistencia específica de las vías respiratorias se produjo aproximadamente 5 horas tras la exposición. La resistencia específica de las vías respiratorias se midió por medio de pletismógrafo de doble cámara equipado con neumotacógrafos, que está disponible comercialmente de the Buxo Corporation.

50 Para demostrar los beneficios profilácticos de un compuesto inhibidor de componente de complemento, se administró a grupos de ratones uno de tres tratamientos diferentes de acuerdo con el programa de dosificaciones mostrado en las figuras 2a y 2b. El grupo control positivo se trató con un anticuerpo control (hibridoma 135.8) en una dosis de 40 mg/kg. Un segundo grupo de ratones se trató con el anticuerpo anti-C5, BB5.1, en una dosis de 40 mg/kg. Un tercer grupo de ratones se trató con dexametasona ("DEX"). Un grupo control negativo se expuso inicialmente a PBS (solución salina tamponada con fosfato) y alumbre, y se administró más tarde PBS tal como se muestra en el programa de la figura 2a. Este grupo control proporcionó una medición de la resistencia al aire de referencia.

60 El anticuerpo BB5.1 se prepara de acuerdo con procedimientos conocidos. (véase, Frei, Y., Lambris, J.D., Stockinger, B. Mol. Cell. Probes. 1: 141-149 (1987)). Tanto el anticuerpo BB5.1 como el anticuerpo de hibridoma 135.8 control de apareamiento de isotipos se hicieron crecer como ascitis en ratones atómicos y los anticuerpos se purificaron a partir de la ascitis mediante cromatografía de afinidad a proteína A seguida de elución con tampón de elución ImmunoPure IgG (Pierce) y diálisis frente a solución salina tamponada con PBS. (Wang *et al.* 1996).

65 Se encontró que el grupo tratado profilácticamente por vía subcutánea con anticuerpo anti-C5 respondía así como también los ratones expuestos tratados con esteroides y el control negativo, tal como se muestra en la figura 3. Los

tratamientos con anti-C5 habían inhibido la producción del componente de complemento C5 en la cascada, y mediante la inhibición de la producción de C5, los ratones experimentaron significativamente menos constricción de las vías respiratorias. El grupo control positivo que se trató con un anticuerpo control mostró un aumento de la resistencia específica de las vías respiratorias provocado por un ataque asmático.

5 EJEMPLO 2 - El uso de anticuerpos anti-C5 por medio de administración intravenosa como un procedimiento terapéutico para tratar asma

10 Para demostrar los beneficios terapéuticos de administrar un inhibidor de componente de complemento C5 por vía intravenosa durante un ataque de asma, se administró a grupos de ratones uno de tres tratamientos diferentes de acuerdo con el programa de dosificaciones mostrado en la figura 4a. Un grupo control positivo se expuso con OVA y se trató con un anticuerpo control (hibridoma 135.8) administrado por vía intravenosa, 15 minutos después de provocar el ataque asmático inicial. Un segundo grupo de ratones se expuso de manera similar y se trató por vía intravenosa con BB5.1, el anticuerpo anti-C5, 15 minutos después de provocar el ataque asmático inicial. Un tercer grupo de ratones se expuso de manera similar y se trató por vía intravenosa con DEX, 15 minutos después de provocar el ataque asmático inicial. Ratones operados de manera simulada proporcionaron una medición de la resistencia al aire de referencia que se proporcionó mediante administración de solución salina de tampón fosfato (PBS) y alumbre a un grupo de ratones, y administración de dosis de aerosol de PBS de acuerdo con el programa mostrado en la figura 4a.

20 Los resultados de esta exposición (mostrada en las figuras 6a y 6b) encontraron que el grupo de ratones tratados terapéuticamente con anti-C5 por vía intravenosa mostró una constricción específica de las vías respiratorias muy pequeña y esos ratones respondían a los tratamientos así como también el grupo tratado con el esteroide, DEX. El grupo control positivo que se trató con un anticuerpo control mostró un aumento significativo de la resistencia específica de las vías respiratorias, tal como se muestra en la figura 6a. El anticuerpo anti-C5 había inhibido la respuesta inflamatoria de los componentes de complemento y permitió un paso de aire mayor durante los ataques de asma en los ratones.

30 EJEMPLO 3 - El uso de anticuerpos anti-C5 por medio de administración por aerosol como un procedimiento terapéutico para tratar asma

35 Para demostrar los beneficios terapéuticos de administrar un inhibidor de componente de complemento C5 por medio de aerosol durante un ataque de asma, se administró a grupos de ratones uno de tres tratamientos diferentes de acuerdo con el programa de dosificaciones mostrado en la figura 4a. Un grupo control positivo se expuso con OVA y se trató con un anticuerpo control (hibridoma 135.8) administrado por aerosol, 15 minutos después de provocar el ataque asmático inicial. Un segundo grupo de ratones se expuso de manera similar y se trató por medio de administración por aerosol de BB5.1, un anticuerpo anti-C5, 15 minutos después de provocar el ataque asmático inicial. Un tercer grupo de ratones se expuso de manera similar y se trató por aerosol con DEX, 15 minutos después de provocar el ataque asmático inicial. Se proporcionó una medición de la resistencia al aire de referencia mediante administración de solución salina de tampón fosfato (PBS) y alumbre a un grupo de ratones, y administración de dosis de aerosol de PBS de acuerdo con el programa mostrado en la figura 4a.

45 Se encontró que los tratamientos terapéuticos con aerosol de ratones con anticuerpo anti-C5, BB5.1 durante ataques de asma reducían significativamente la resistencia específica de las vías respiratorias y estos ratones respondían también como, y más rápidamente que, los ratones tratados con esteroide. Los resultados de los tratamientos con aerosol se muestran en la figuras 5a y 5b. El grupo control positivo que se trató con un anticuerpo control experimentó una resistencia específica de las vías respiratorias varias veces mayor que los ratones tratados con anticuerpo anti-C5, tal como se muestra en la figura 5b.

50 El anticuerpo anti-C5, BB5.1 se administró también a los animales de ensayo a través de nebulización, que se encontró que es un procedimiento de administración eficaz. Los resultados de los ensayos en suero tras la nebulización indican que el BB5.1 se unió con el sitio C5 y, por tanto, permaneció intacto durante la administración a través de la nebulización.

55 El efecto sistémico de cada tratamiento dado en los ejemplos 2 y 3 se midió usando las técnicas descritas en Wurzner, *et al.*, Complement Inflamm 8:328-340, 1991 para determinar la actividad hemolítica. Los resultados de estos ensayos se muestran en la figura 7. Tal como se observa en este caso, el anticuerpo control y es esteroide no redujeron sustancialmente la actividad de C5 sistémica, independientemente del procedimiento de administración. Con el anticuerpo anti-C5 BB5.1, sin embargo, el modo de administración afectaba directamente a la actividad de C5 sistémica. Específicamente, aunque tanto la administración por aerosol como la intravenosa eran eficaces en reducir la gravedad de un ataque de asma, la administración por aerosol lo hizo así sin reducir sustancialmente la actividad de C5 sistémica. Tal como puede observarse en la figura 7, la administración intravenosa del anticuerpo anti-C5 reducía la actividad de C5 sistémica en cerca del 80 %.

65 EJEMPLO 4 - El uso de anticuerpos anti-C5 para reducir la presencia de mediadores inflamatorios

Para demostrar los beneficios terapéuticos de administrar un inhibidor de componente de complemento C5 para reducir la presencia de mediadores inflamatorios durante un ataque de asma, se administró a grupos de ratones uno de tres tratamientos diferentes de acuerdo con el programa de dosificaciones mostrado en la figura 4a. Un grupo control positivo se expuso con OVA y se trató con un anticuerpo control (hibridoma 135.8) administrado por vía intravenosa, 15 minutos después de provocar el ataque asmático inicial. Un segundo grupo de ratones se expuso de manera similar y se trató por vía intravenosa con BB5.1, el anticuerpo anti-C5, 15 minutos después de provocar el ataque asmático inicial. Un tercer grupo de ratones se expuso de manera similar y se trató por vía intravenosa con DEX, 15 minutos después de provocar el ataque asmático inicial. Ratones operados de manera simulada proporcionaron una medición de la resistencia al aire de referencia que se proporcionó mediante administración de solución salina de tampón fosfato (PBS) y alumbre a un grupo de ratones, y administración de dosis de aerosol de PBS de acuerdo con el programa mostrado en la figura 4a. Tras 5 horas se sometieron los ratones a eutanasia y los pulmones se lavaron usando técnicas convencionales. Generalmente, 1 cc de solución salina de PBI se introdujo en los pulmones y se recuperó. Este proceso se repitió tres veces. El fluido se recuperó y se centrifugó. Se inspeccionaron las células contenidas en el sedimento resultante. El sobrenadante se sometió a ensayo para determinar la presencia de histamina, IL-5, IL-4, IL-13, proteínas granulares eosinófilas, TGF β y/o mmp-9. Los ensayos se realizaron todos usando kits de ensayo disponibles comercialmente. Los resultados se muestran en las figuras 8 a 13. Estos resultados del lavado broncoalveolar (BAL) muestran la presencia o ausencia de proteínas que se producían o se liberaban por las células estructurales del pulmón o células inflamatorias, más que la presencia de tales componentes en el propio tejido pulmonar.

Se encontró que el tratamiento de ratones con anticuerpo anti-C5 y DEX reducían ambos el recuento total de WBC. (véase la figura 8). Se encontró que los eosinófilos eran las células inflamatorias predominantes en el BAL. (véanse las figuras 9A-D y 10.)

La figura 11 muestra que el anticuerpo anti-C5 tenía poco efecto sobre el nivel de histamina, un resultado similar al obtenido con el esteroide DEX. Sin embargo, el anticuerpo anti-C5 reducía significativamente el nivel de mmp-9 detectado en BAL tal como se muestra en la figura 12, en comparación con el tratamiento con esteroide. Así, mientras que tanto el anticuerpo anti-C5 como DEX dieron como resultado una cantidad detectable inferior de TGF- β (véase la figura 13), solo el anticuerpo anti-C5 hizo esto a través de un mecanismo que implicaba una reducción de la producción o liberación de mmp-9.

EJEMPLO 5 - El uso de anticuerpos anti-C5 como dilatador bronquial

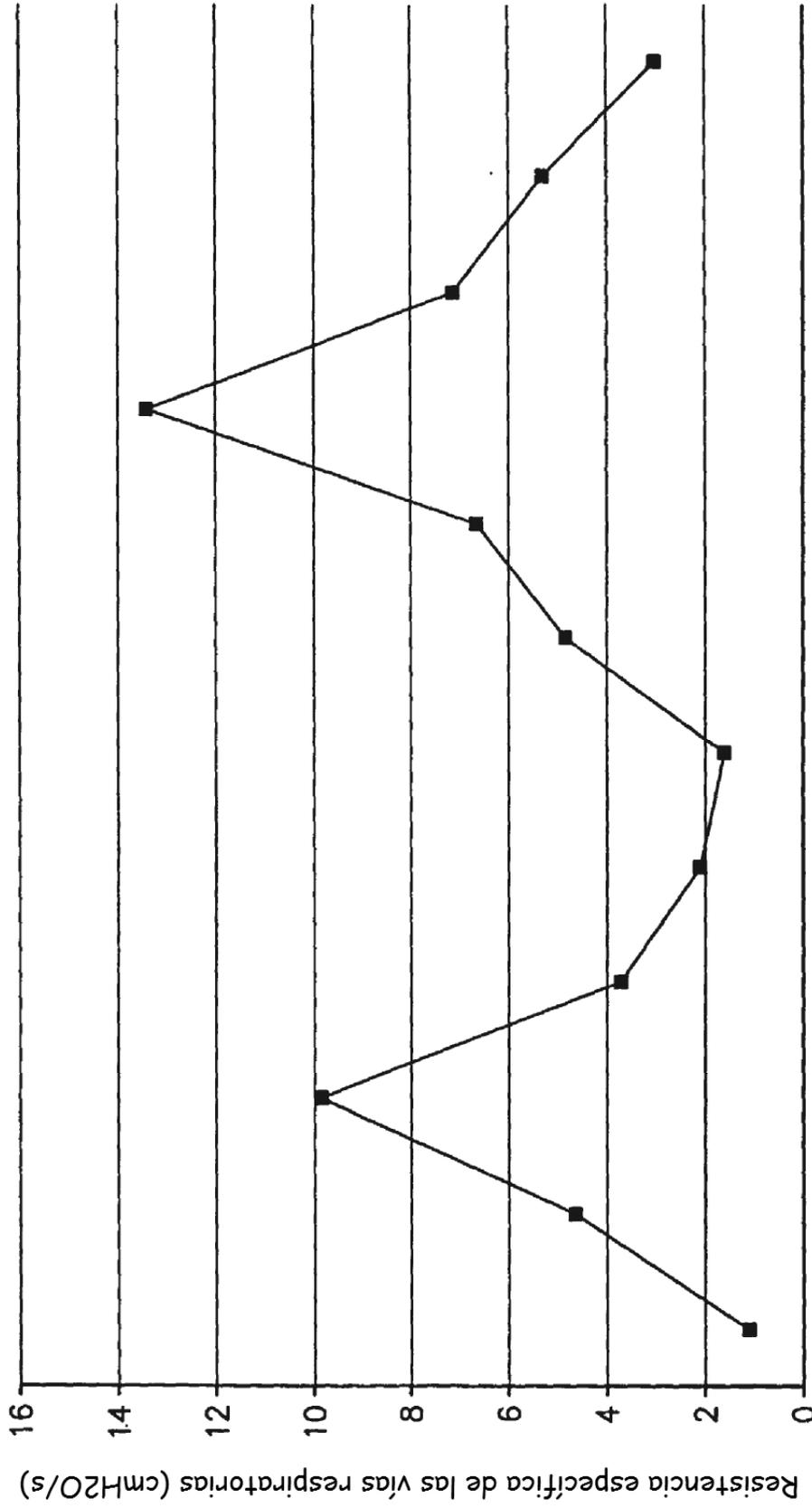
Para demostrar el efecto de dilatación bronquial directo e inmediato de administrar un inhibidor de componente de complemento C5 (solo o en combinación con un agonista de adrenorreceptores β 2), durante un ataque de asma, se expusieron grupos de ratones con antígeno y se les administró uno de cuatro tratamientos diferentes de acuerdo con el programa de dosificaciones mostrado en las figuras 14 y 15. Un grupo control positivo se expuso con OVA, se canuló y se trató con un anticuerpo control (IgG1 de ratón) administrado por medio de aerosol después de provocar un segundo ataque asmático. Un segundo grupo de ratones se expuso de manera similar y se trató con BB5.1, un anticuerpo anti-C5 después de provocar un segundo ataque asmático. Un tercer grupo de ratones se expuso de manera similar y se trató con salbutamol (un agonista de adrenorreceptores β 2 disponible comercialmente de Sigma) después de provocar un segundo ataque asmático. Un cuarto grupo de ratones se expuso de manera similar y se trató con una combinación de anticuerpo anti-C5 y salbutamol después de provocar un segundo ataque asmático. Ratones operados de manera simulada proporcionaron una medición de la resistencia al aire de referencia que se proporcionó mediante administración de solución de tampón fosfato (PBS) y alumbre a un grupo de ratones, y administración de dosis de aerosol de PBS de acuerdo con el programa mostrado en las figuras 14 y 15.

La sensibilidad de las vías respiratorias se evaluó entonces como un cambio en la función de las vías respiratorias mediante un procedimiento invasivo, en el que se midieron los cambios en la resistencia pulmonar usando un software de Buxco Biosystem y pletismografía de cuerpo completo. Se anestesiaron los ratones con avertina (160 mg/kg) mediante inyección i.p. y se ventilaron mediante un ventilador Harvard Apparatus Inspira. Después de la cánula traqueal, se inyectó pancuronio (0,3 mg/kg) por vía intraperitoneal para inducir parálisis e inhibir la respiración espontánea. Los ratones se mantienen respirando mediante un ventilador, que está ajustado en un volumen tidal y velocidad respiratoria mediante un programa de peso corporal. Las mediciones de RL para antígeno específico se realizaron a las 5 horas tras provocación con el 5 % de OVA. Los resultados, que están indicados en la figura 15 muestran que el tratamiento con anticuerpo anti-C5 tenía un efecto de dilatación bronquial significativo en 3 de 4 ratones y que un efecto sinérgico se observa a partir del tratamiento con anticuerpo anti-C5 en combinación con un agonista de adrenorreceptores β 2.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti-C5 para su uso en el tratamiento de asma en un sujeto susceptible a o que tiene asma, en el que el anticuerpo anti-C5 es h5G1.1.
2. Un anticuerpo anti-C5 para su uso para reducir la gravedad de un ataque de asma en un sujeto que tiene un ataque de asma, en el que el anticuerpo anti-C5 es h5G1.1.
- 10 3. Un anticuerpo anti-C5 para su uso para reducir la obstrucción de las vías respiratorias en un sujeto que tiene asma, en el que el anticuerpo anti-C5 es h5G1.1.
4. El anticuerpo anti-C5 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el uso comprende la administración del anticuerpo anti-C5 al sujeto durante un ataque de asma.
- 15 5. El anticuerpo anti-C5 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el sujeto es un ser humano.
6. El anticuerpo anti-C5 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo anti-C5 se administra al sujeto como un aerosol.
- 20 7. El anticuerpo anti-C5 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo anti-C5 se administra al sujeto mediante infusión intravenosa o inyección subcutánea.
- 25 8. El anticuerpo anti-C5 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el uso comprende administrar al sujeto un fármaco seleccionado del grupo que consiste en esteroides, anticuerpos anti-IgE, anticuerpos anti-IL-4, anticuerpos anti-IL-5, agonistas de adrenorreceptores β 2, inhibidores de leucotrienos, inhibidores de 5 lipoxigenasa, inhibidores de PDE, antagonistas de CD23, antagonistas de IL-13, inhibidores de la liberación de citocinas, antagonistas del receptor H1 de histamina, anti-histaminas e inhibidores de la liberación de histamina.
- 30 9. Un fármaco y un anticuerpo anti-C5 en combinación para su uso en el tratamiento de un sujeto susceptible a o que tiene asma, en el que el anticuerpo anti-C5 es h5G1.1 y en el que el fármaco se selecciona del grupo que consiste en esteroides, anticuerpos anti-IgE, anticuerpos anti-IL-4, anticuerpos anti-IL-5, agonistas de adrenorreceptores β 2, inhibidores de leucotrienos, inhibidores de 5 lipoxigenasa, inhibidores de PDE, antagonistas de CD23, antagonistas de IL-13, inhibidores de la liberación de citocinas, antagonistas del receptor H1 de histamina, anti-histaminas e inhibidores de la liberación de histamina.
- 35 10. El anticuerpo anti-C5 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo anti-C5 se administra al sujeto mediante nebulización.
- 40

Hipersensibilidad de las vías respiratorias en fase temprana
y tardía tras exposición por aerosol de antígeno



Tiempo (min) tras exposición con un 5 % de OVA

FIG. 1

Inducción de ataque asmático en ratones BALB/c normales y efecto de inhibición de C5 profiláctica

<u>Grupo y programa</u>	<u>día 1, 14</u>	<u>día 25, 29, 32</u>	<u>día 28, 29, 30</u>	<u>día 33</u>
Control positivo	Ova + Alumbre	135.8, 40mg/kg	aerosol del 1 % de OVA	aerosol del 5 % de OVA
Anti-C5	Ova + Alumbre	BB5.1, 40mg/kg	aerosol del 1 % de OVA	aerosol del 5 % de OVA
Esteroides	Ova + Alumbre	Dex	aerosol del 1 % de OVA	aerosol del 5 % de OVA
Control negativo	PBS + Alumbre	PBS	PBS	PBS

FIG. 2a

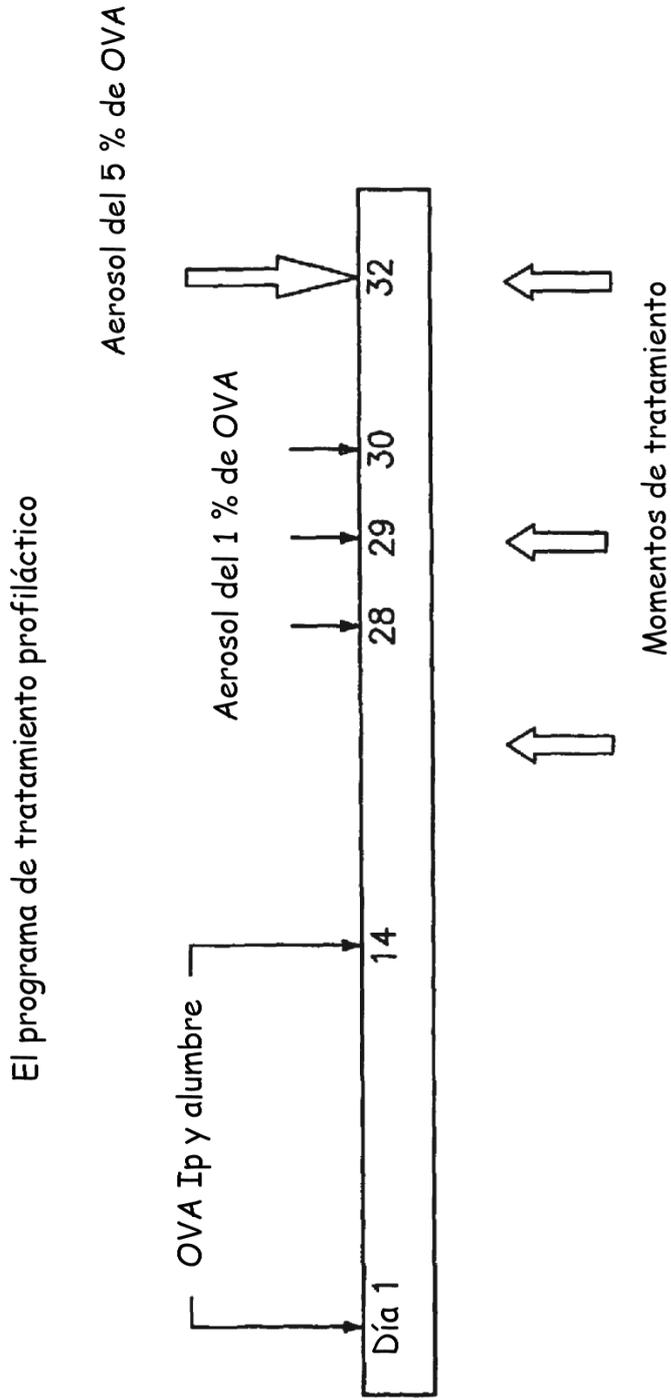


FIG. 2b

Inducción de ataque asmático en ratones BALB/c normales
y efecto de inhibición de C5 profiláctica

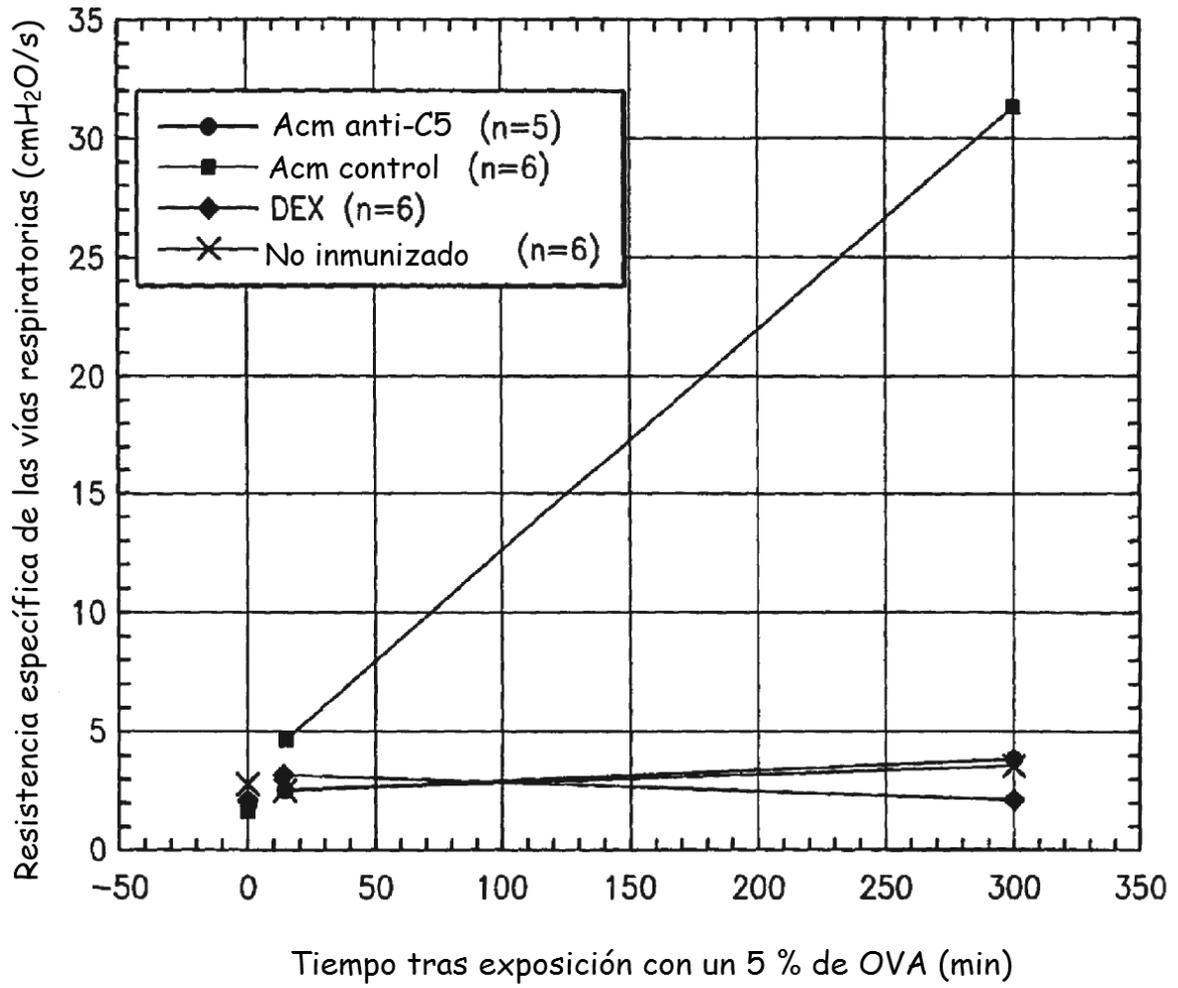


FIG. 3

Efecto de inhibición de C5 terapéutica (aerosol o IV) durante ataque asmático

<u>Grupo y programa</u>	<u>día 1, 14</u>	<u>Aerosol en día 28-30 y día 32</u>	<u>día 35</u>	<u>día 35</u>
Control positivo	Ova + Alumbre	1 % de OVA en el día 29-30, 5% en 32	5 % de OVA	IV o aerosol 135.8 = 135.8 iv o por aerosol
Anti-C5	Ova + Alumbre	1 % de OVA en el día 29-30, 5% en 32	5 % de OVA	IV o aerosol BB5.1 = BB5.1 iv o por aerosol
Esteroides	Ova + Alumbre	1 % de OVA en el día 29-30, 5% en 32	5 % de OVA	IV o aerosol Dex = Dex iv o por aerosol
Control negativo	PBS + Alumbre	PBS en el día 29-30, PBS en 32	PBS	IV o aerosol PBS = PBS iv o por aerosol

FIG. 4a

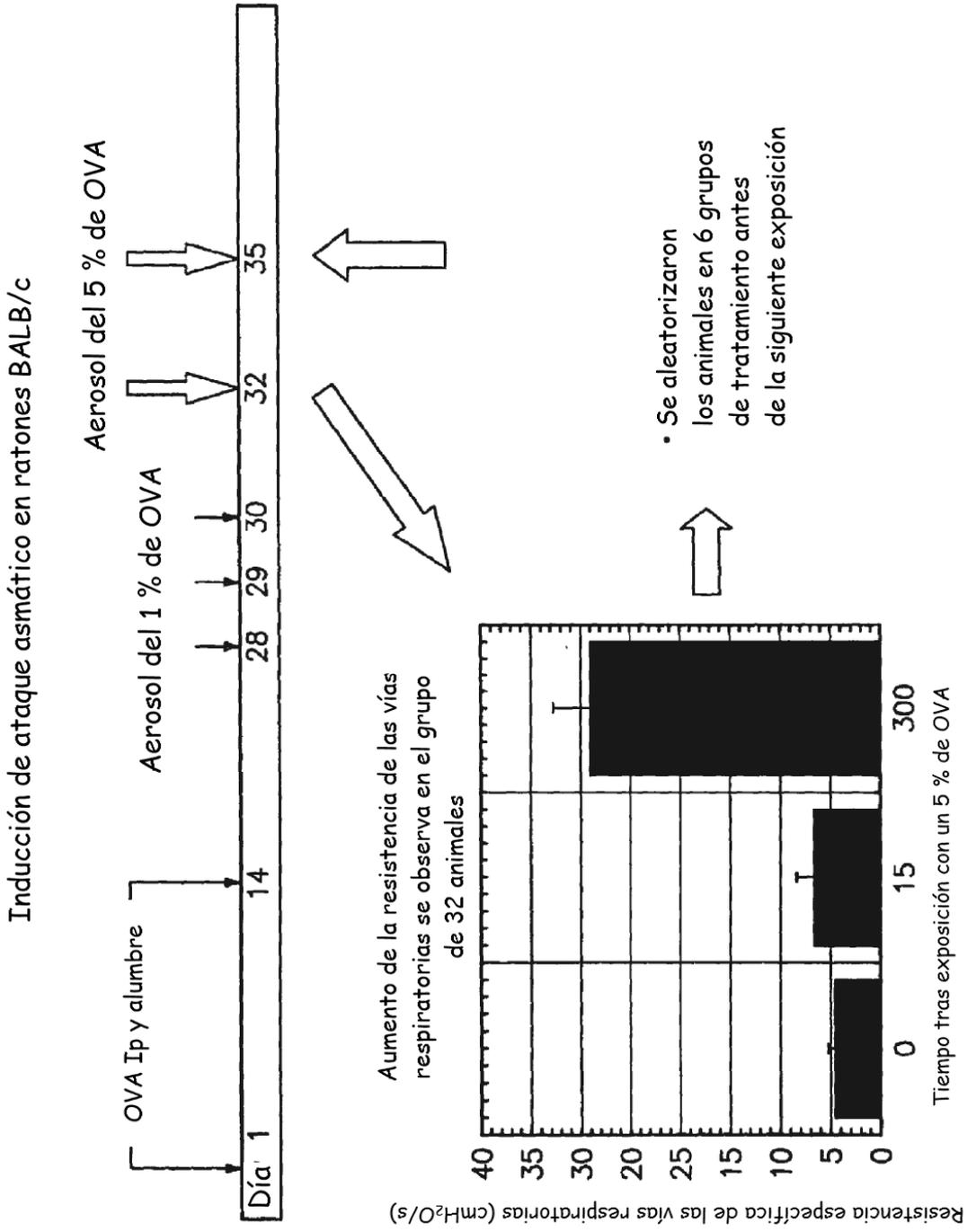


FIG. 4b

Efecto de tratamiento por aerosol de Acm anti-C5 durante ataque asmático

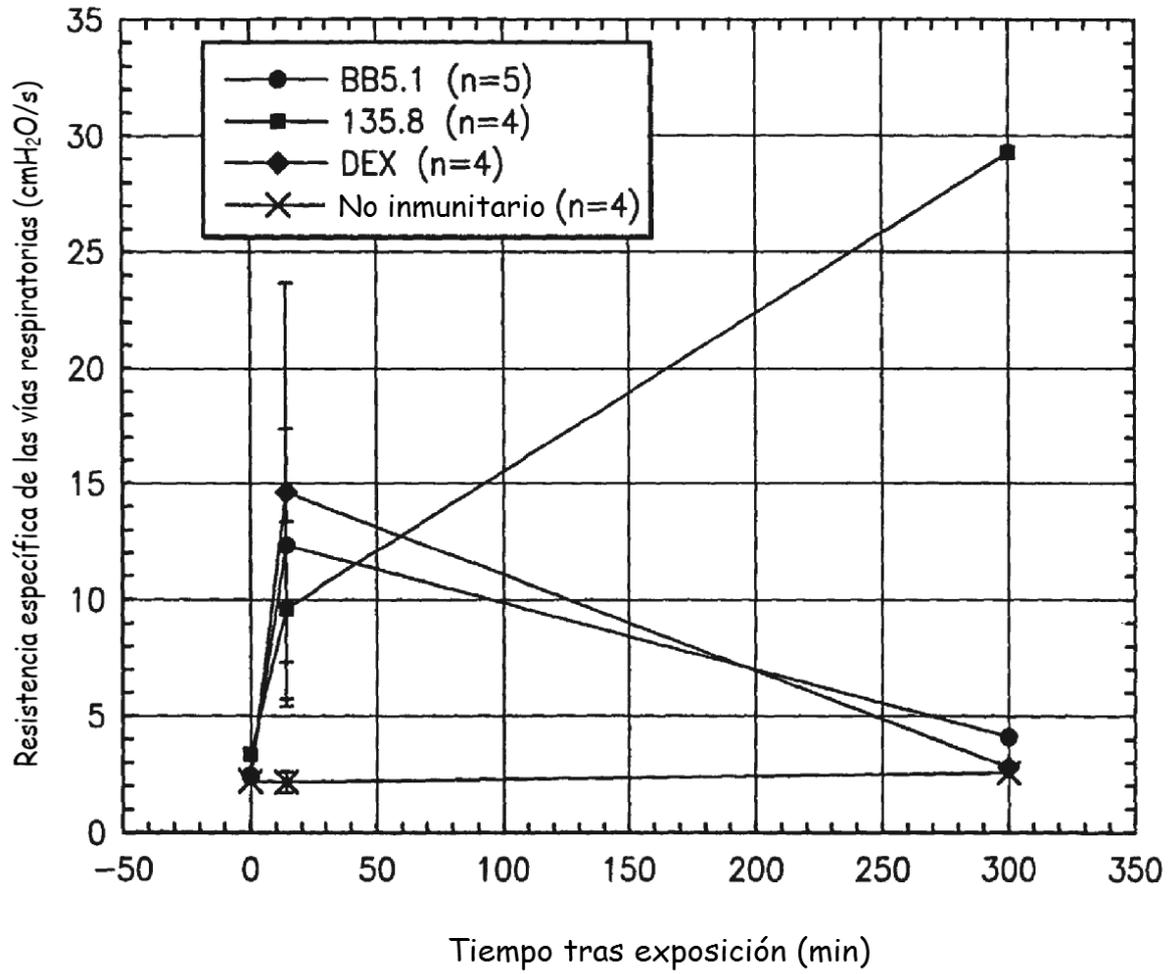


FIG. 5a

Efecto de tratamiento por aerosol de Acm anti-C5 durante ataque asmático (medición continua)

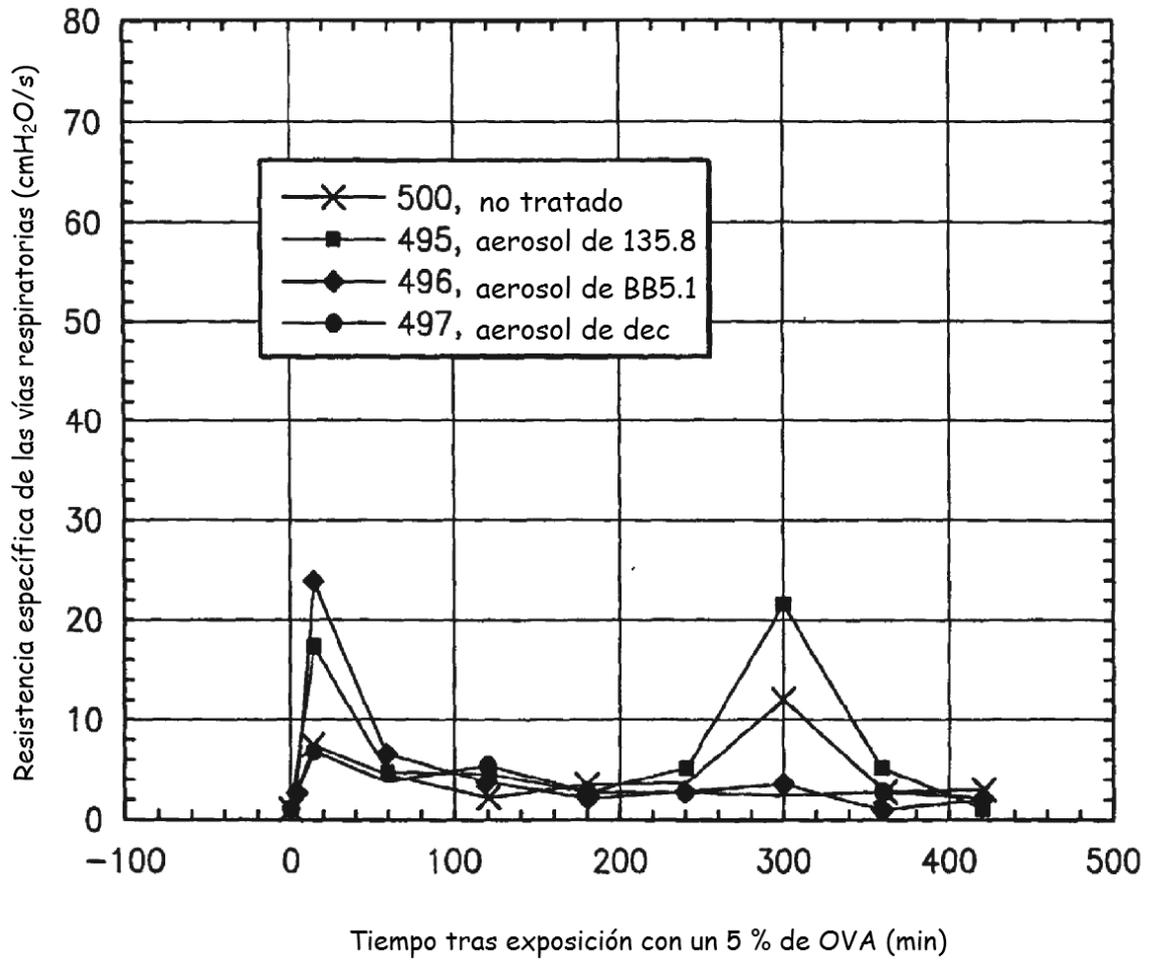


FIG. 5b

Efecto de tratamiento con Acm anti-C5 IV durante
ataque asmático

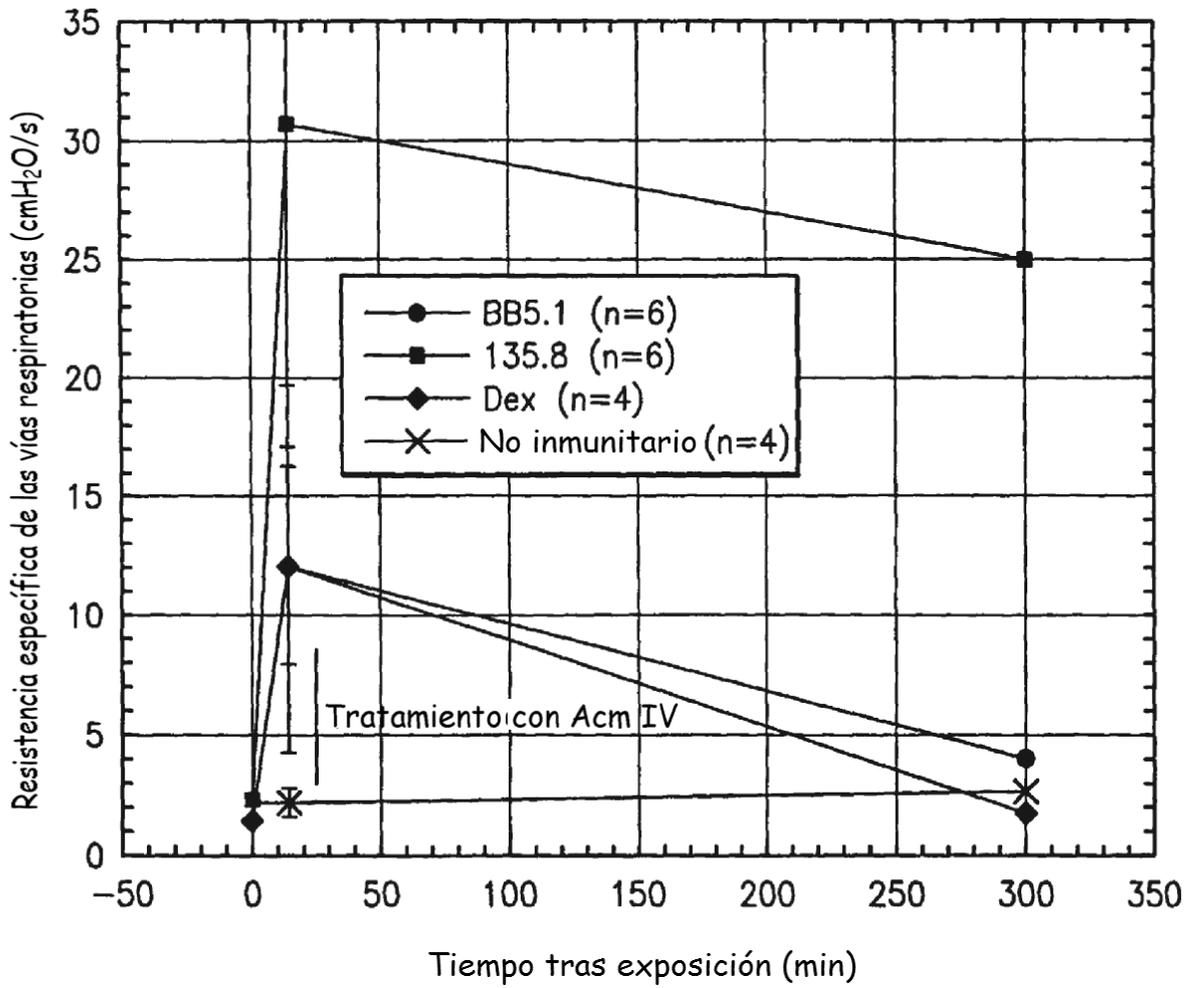


FIG. 6a

Efecto de tratamiento con Acm anti-C5 IV durante ataque asmático (medición continua)

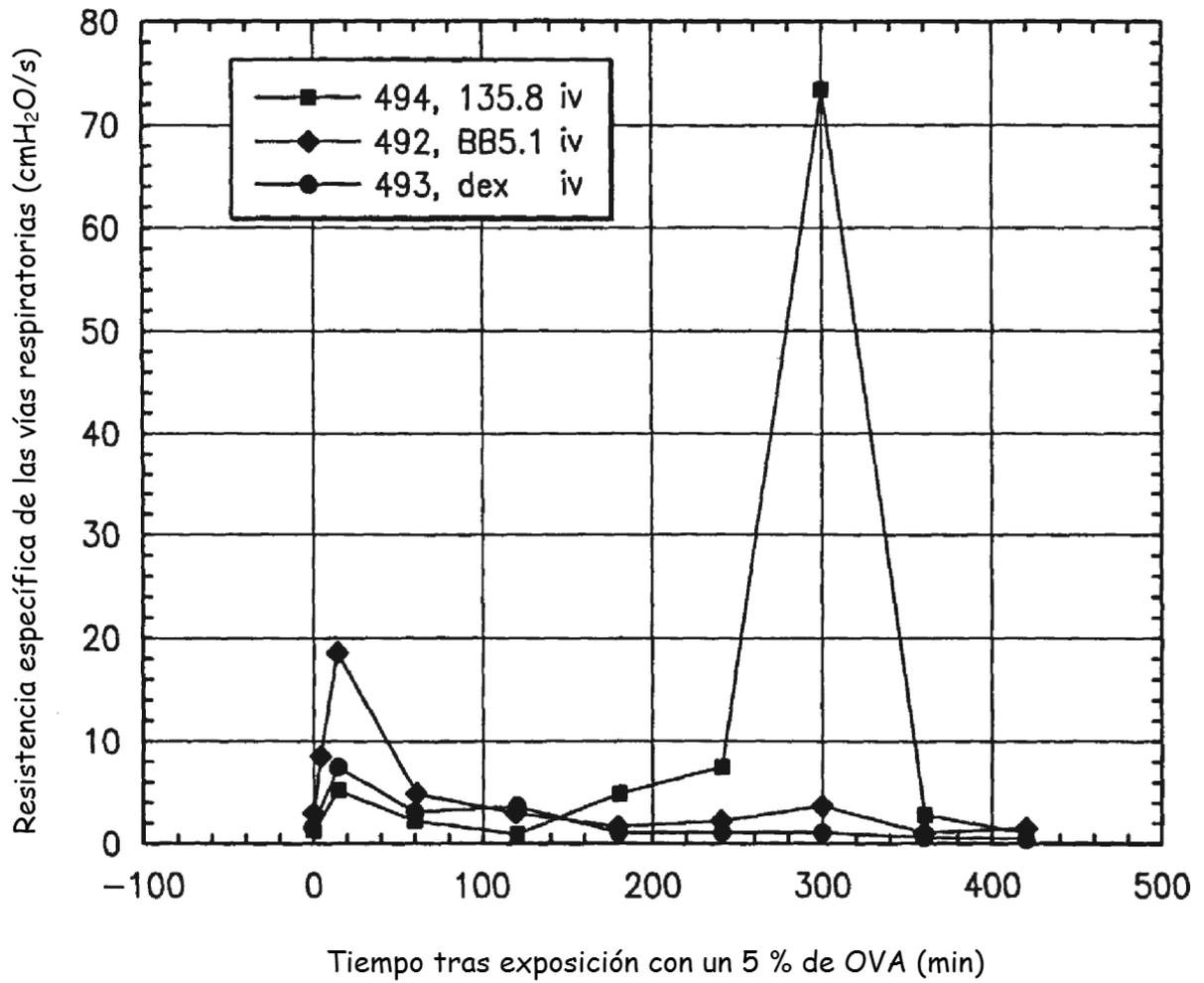


FIG. 6b

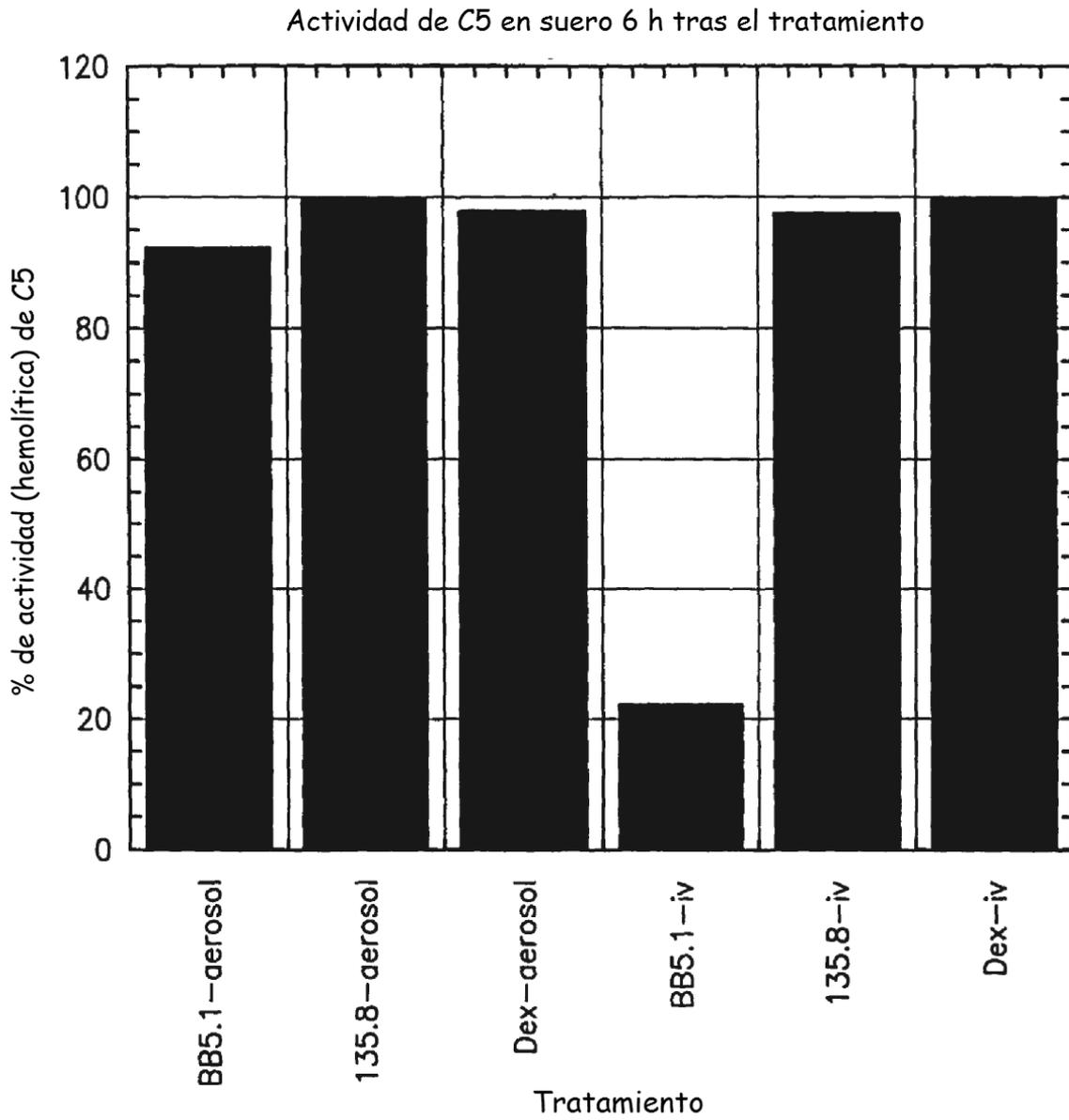


FIG. 7

Efecto de tratamiento con esteroide y anti-C5 sobre el recuento de WBC total de BAL (5 h tras exposición con OVA y tratamiento con Acm)

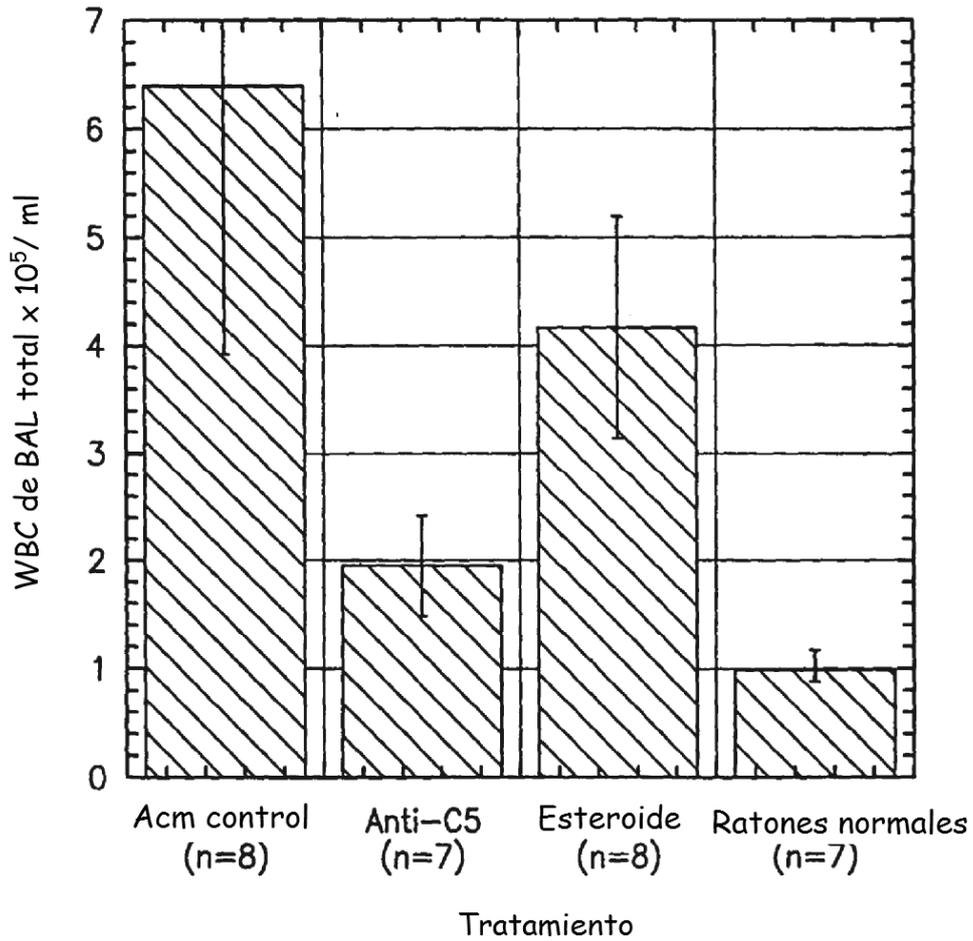
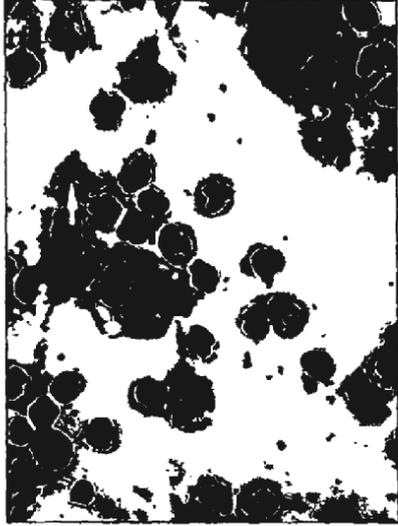


FIG. 8

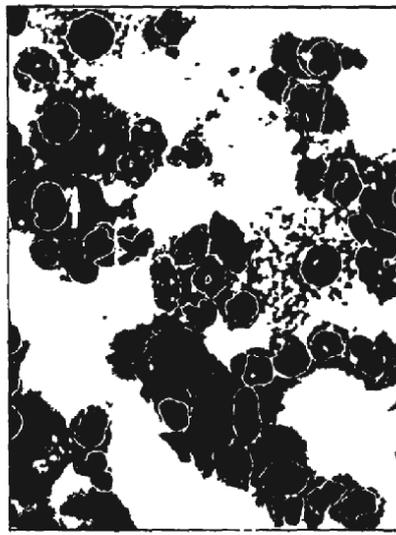
Los eosinófilos son las células inflamatorias predominantes en BAL



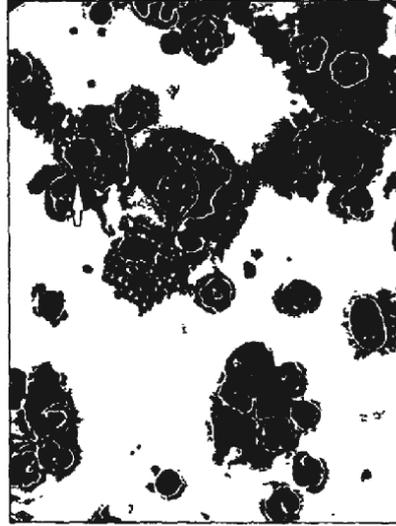
No inmunizado
FIG. 9a



Acm control
FIG. 9b



Esteroides
FIG. 9c



Anti-C5
FIG. 9d

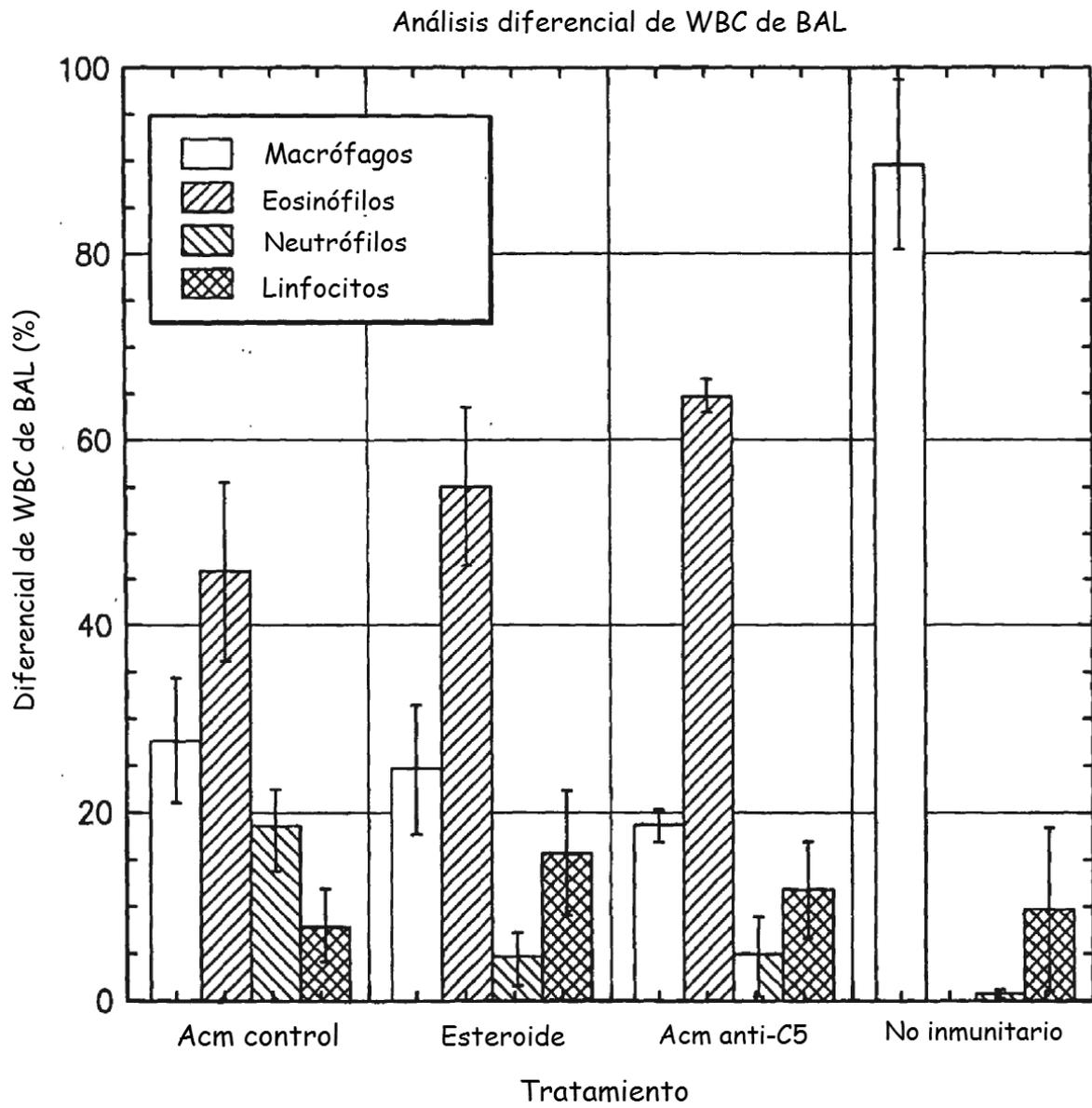


FIG. 10

Efecto de tratamiento con esteroide y anti-C5 sobre el nivel de histamina de BAL
(5 h tras la exposición con OVA y tratamiento con Acm)

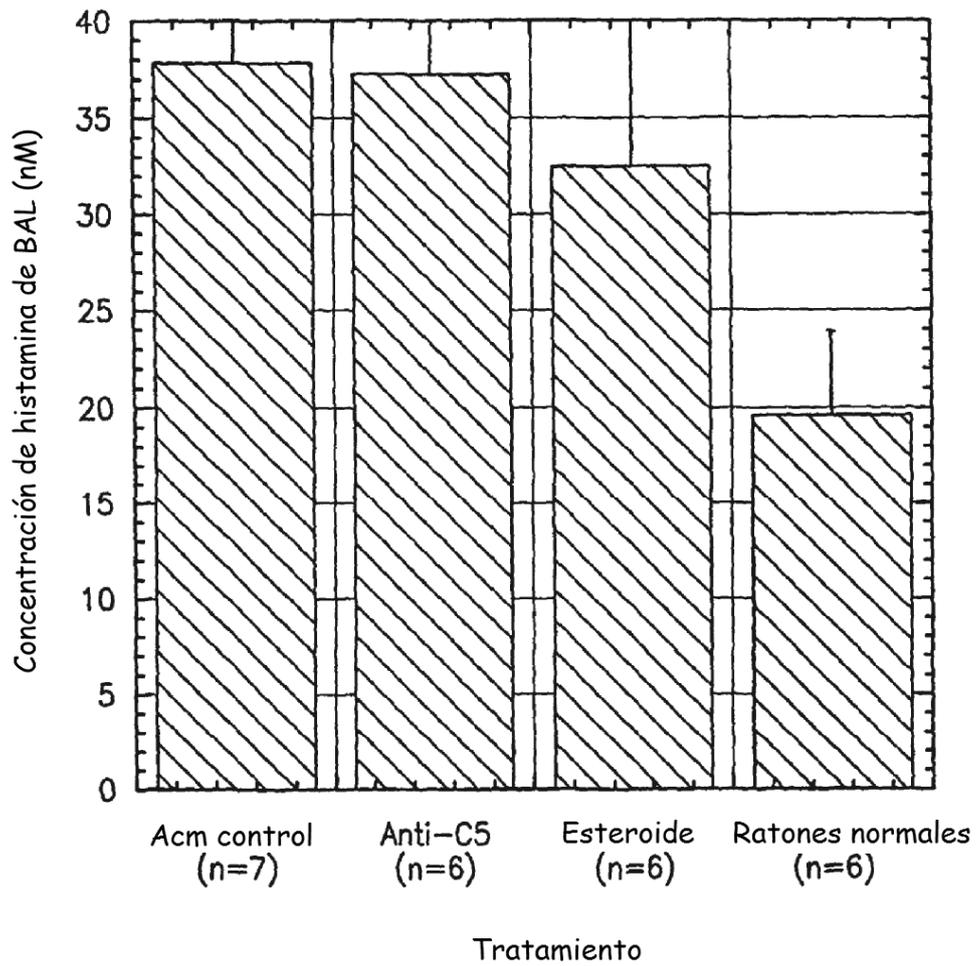


FIG. 11

Nuevos datos: efecto de tratamiento con esteroide y anti-C5 sobre el nivel de MMP-9 de BAL (5 h tras la exposición con OVA y tratamiento con Acm)

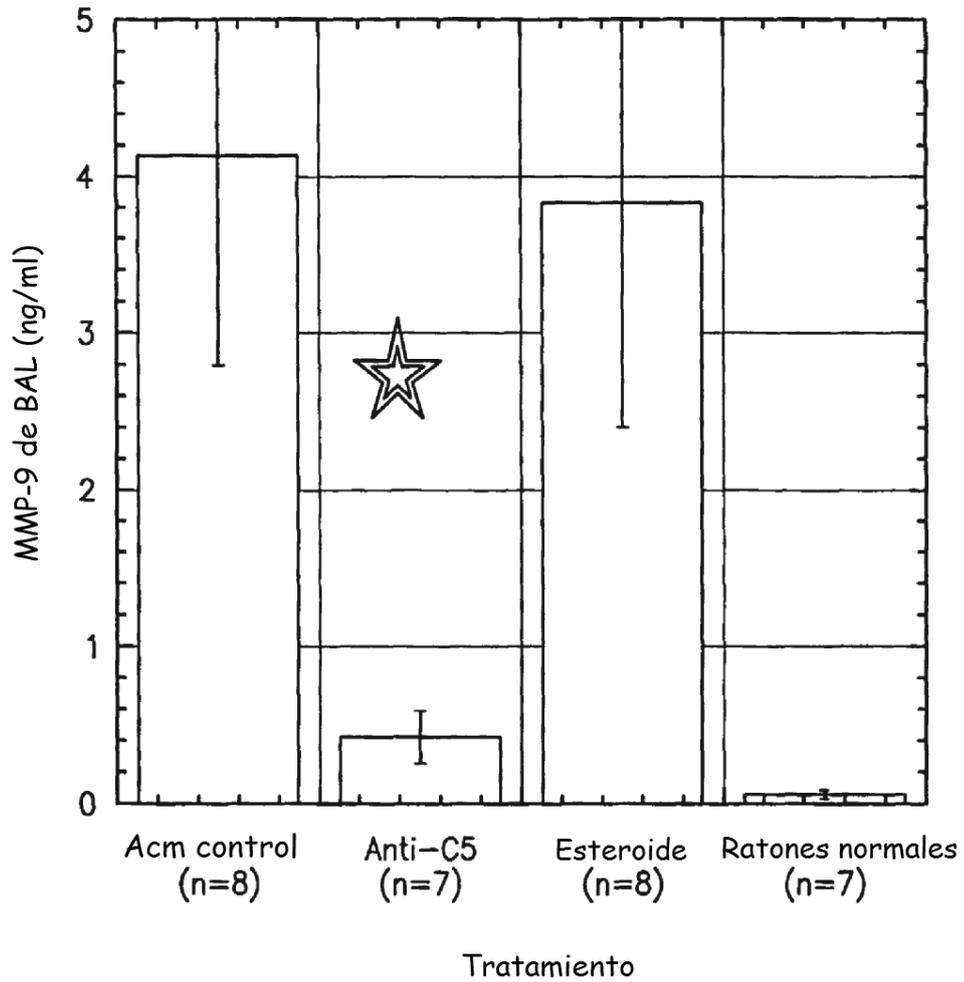


FIG. 12

El tratamiento con esteroide y Acm anti-C5 bloquea la producción de TGF-beta durante ataque asmático

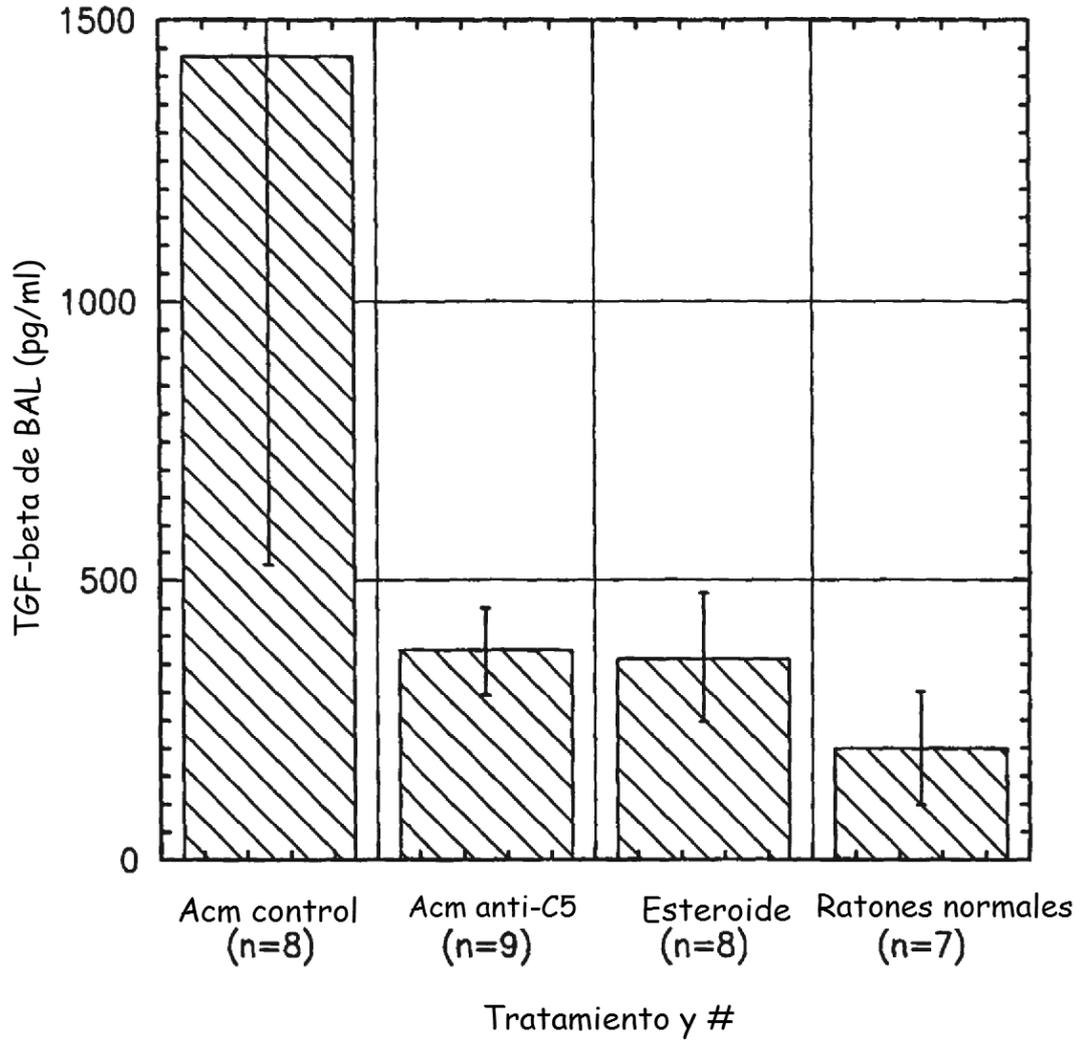


FIG. 13

Ensayo del efecto de dilatación bronquial directo e inmediato de inhibidor de C5
o en combinación con salbutamol durante respiración sibilante

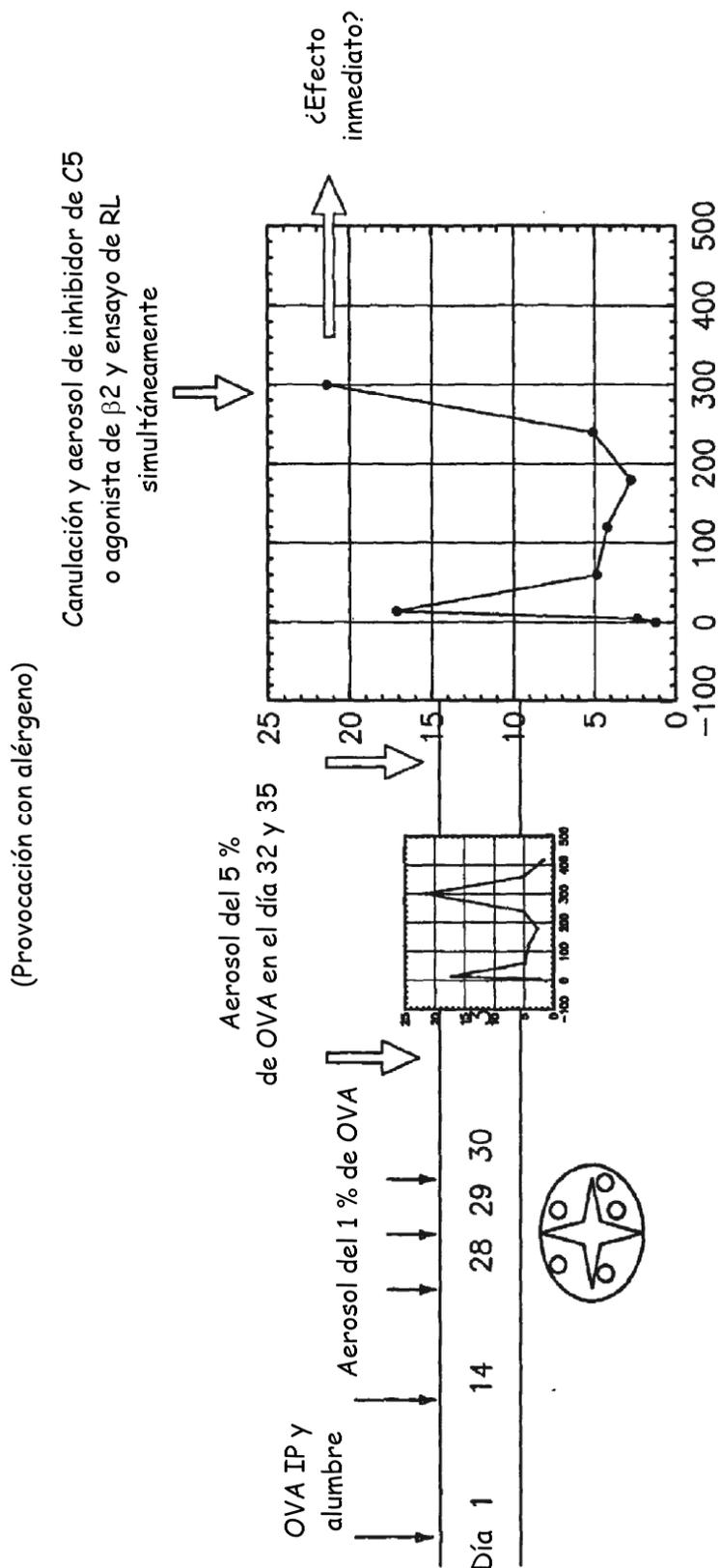


FIG. 14

Ensayo del efecto de dilatación bronquial directo e inmediato de inhibidor de C5 o en combinación con salbutamol durante respiración sibilante

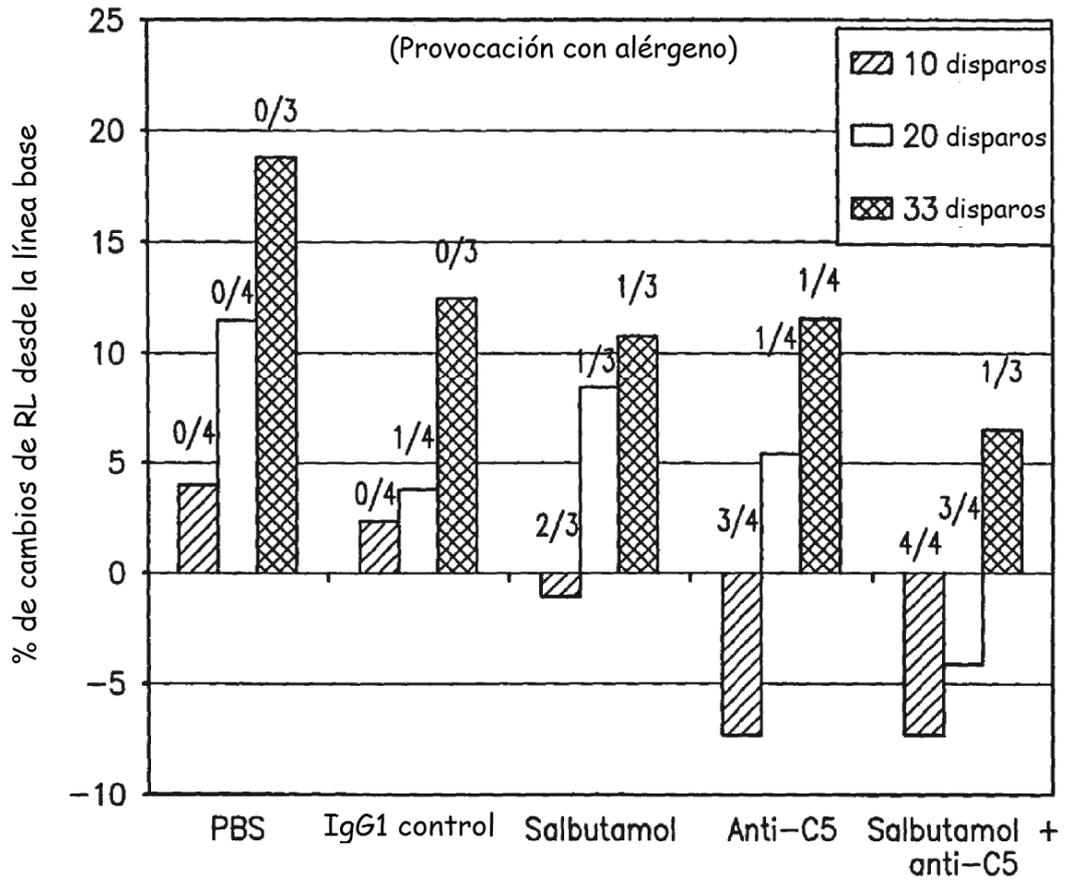


FIG. 15