

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 522**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**C12N 5/20** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2005** **E 11180077 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018** **EP 2394662**

54 Título: **Métodos y composiciones para tratar y prevenir una enfermedad asociada con la integrina alfa V beta 5**

30 Prioridad:

**02.04.2004 US 559175 P**

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

**06.06.2018**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)  
Office of Technology Transfer, 1111 Franklin Street, 5th floor  
Oakland, CA 94607-5200**

72 Inventor/es:

**SHEPPARD, DEAN y  
ATAKILIT, AMHA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 671 522 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para tratar y prevenir una enfermedad asociada con la integrina alfa V beta 5

5 **Antecedentes de la invención**

El edema pulmonar ("EP") afecta a millones de personas cada año, provocando una considerable morbilidad y mortalidad. En pacientes con EP, los alvéolos se llenan de líquido de los capilares pulmonares lo que compromete la transferencia de oxígeno a la circulación sistémica (Hall, et al. en CURRENT THERAPY IN RESPIRATORY MEDICINE (R. Chemiack, Ed., 1986), páginas 222-227). Esta secuencia de acontecimientos da como resultado hipoxemia, hipercapnia y muerte si no se toman medidas correctivas.

Cualquier afección o agente que altere la homeostasis de líquidos en los pulmones puede dar como resultado EP, que puede dividirse en general en EP cardiogénico y no cardiogénico (véase, por ejemplo, Kakouros y Kakouros, Hellenic J. Cardiol. 44:385-391 (2003)). Por ejemplo, el síndrome de dificultad respiratoria (aguda) o "SDRA" del adulto/lesión pulmonar aguda, que puede desarrollarse como resultado de una lesión pulmonar debida, por ejemplo, a neumonía, choque séptico, traumatismo, aspiración de vómito o inhalación química, se asocia con frecuencia con el EP no cardiogénico. El EP no cardiogénico se caracteriza por un cambio en la permeabilidad vascular del tejido pulmonar que conduce a un aumento de los niveles de fluido en los pulmones. El EP cardiogénico se debe con frecuencia a insuficiencia cardíaca del lado izquierdo y puede ser una complicación de infarto, filtración o de válvulas cardíacas estrechadas (válvulas mitrales o aórticas), o cualquier enfermedad del corazón que da como resultado debilitamiento y/o rigidez del músculo cardíaco (miocardiopatía). El corazón con insuficiencia transmite su presión aumentada a las venas pulmonares. A medida que aumenta la presión en las venas pulmonares, el fluido se impulsa hacia los espacios aéreos (alvéolos). Este fluido se convierte después en una barrera al intercambio de oxígeno normal, dando como resultado apnea. El EP cardiogénico se caracteriza por presión hidrostática capilar aumentada que conduce a un aumento de los niveles de fluido en los pulmones.

El EP está provocado, por ejemplo, por permeabilidad capilar alterada; infección; toxinas inhaladas o circulantes; sustancias vasoactivas (por ejemplo, histamina, quininas); coagulación intravascular diseminada; reacciones inmunológicas; neumonía asociada con radiación; uremia; principio de ahogamiento; inhalación de humo; y síndrome de dificultad respiratoria aguda; insuficiencia ventricular izquierda; estenosis mitral, endocarditis bacteriana; fibrosis venosa pulmonar; estenosis congénita del origen de las venas pulmonares, enfermedad venooclusiva pulmonar; sobreinfusión de fluidos; hipoalbuminemia (por ejemplo, de enteropatía renal, hepática, nutricional o de pérdida de proteínas); altitud elevada; sobredosis de fármacos, traumatismo del SNC, hemorragia subaracnoidea, embolia pulmonar, enfermedad parenquimal pulmonar, eclampsia, anestesia y operaciones de derivación cardiopulmonar.

Los síntomas del EP pueden incluir, por ejemplo, apnea, respiración rápida y/o laboriosa, taquicardia, hipertensión, presión torácica, extremidades frías acompañado o no de cianosis, tos con esputo espumoso o rosado, uso extensivo de músculos de respiración accesorios, crepitaciones húmedas con o sin sibilancia y combinaciones de los mismos. Las pruebas para diagnosticar el EP incluyen análisis de sangre tales como hemograma completo (CBC), nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina y proteínas en suero. Se usan análisis de orina, gases sanguíneos arteriales (ABG), radiografía torácica y electrocardiograma (ECG) para facilitar al médico a delimitar el diagnóstico a EP.

El tratamiento del EP cardiogénico implica generalmente situar al paciente bajo administración de 100 % de oxígeno, morfina para calmar la ansiedad y proporcionar algunos efectos cardíacos beneficiosos, furosemida para la diuresis, vasodilatadores para reducir el trabajo frente al que el miocardio debe bombear, y fármacos inotrópicos tales como doputamina para aumentar la contractilidad cardíaca. Otras medidas que se han usado son torniquetes rotatorios en tres de las cuatro extremidades y reducir el volumen sanguíneo en 500 ml.

El documento WO 98/30542 A describe antagonistas del receptor de vitronectina, particularmente inhibidores de las integrinas  $\alpha\beta 3$  y  $\alpha\beta 5$ , y su uso para el tratamiento de la inflamación, el cáncer y los trastornos cardiovasculares y enfermedades en las que la resorción ósea es un factor. El documento WO 02/12501 A describe anticuerpos anti-doble integrina aislados y su uso en métodos de tratamiento, y composiciones farmacéuticas que comprenden opcionalmente agentes terapéuticos adicionales. El documento WO 2004/020435 A describe compuestos de piperidinilo que se unen selectivamente a receptores de integrina y métodos para tratar trastornos mediados por integrina. El documento DE 41 42366 A1 describe antagonistas de la angiotensina, útiles en el tratamiento de trastornos pulmonares

Desgraciadamente, no existe ningún tratamiento específico o satisfactorio eficaz para el EP. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de terapias más eficaces y específicas para el EP. La presente invención aborda éste y otros problemas.

65

**Breve resumen de la invención**

La presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a la subunidad  $\beta 5$  de la integrina  $\alpha\beta 5$  para su uso en el tratamiento o prevención del edema pulmonar o en el tratamiento o prevención de la lesión pulmonar aguda, en el que dicho anticuerpo es un antagonista de  $\alpha\beta 5$ .

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento o prevención del edema pulmonar o en el tratamiento o prevención de la lesión pulmonar aguda que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo que se une específicamente a la subunidad  $\beta 5$  de la integrina  $\alpha\beta 5$ , en el que dicho anticuerpo es un antagonista de la integrina  $\alpha\beta 5$ .

La invención también proporciona métodos para identificar un agente para tratar el edema pulmonar. Los métodos comprenden poner en contacto una pluralidad de agentes con integrina  $\alpha\beta 5$ , seleccionando un agente que compite por la unión a la integrina  $\alpha\beta 5$  con un anticuerpo que se une específicamente a la subunidad  $\beta 5$  de la integrina  $\alpha\beta 5$ , en el que dicho anticuerpo es un antagonista de la integrina  $\alpha\beta 5$  o un ligando de la integrina  $\alpha\beta 5$ ; y determinar si el agente seleccionado tiene un efecto sobre el edema pulmonar, identificando de ese modo un agente para tratar el edema pulmonar.

La invención también proporciona kits para su uso en el tratamiento o prevención del edema pulmonar o la lesión pulmonar aguda. Los kits comprenden un anticuerpo que se une específicamente a la subunidad  $\beta 5$  de la integrina  $\alpha\beta 5$ , en el que dicho anticuerpo es un antagonista de la integrina  $\alpha\beta 5$ , y un segundo agente terapéutico para tratar o prevenir el edema pulmonar o la lesión pulmonar aguda. El segundo agente terapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en: un inhibidor de la ruta del TGF $\beta$ , proteína C activada, un esteroide, GM-CSF, un inhibidor de plaquetas, un agente diurético; un agente broncodilatador, un anticuerpo que se une a la integrina  $\alpha\beta 5$ , un anticuerpo que se une a  $\beta 5$ , un segundo antagonista de la integrina  $\alpha\beta 5$ , un antagonista de la integrina  $\alpha\beta 6$ , un agonista  $\beta$ -2 y un tensoactivo.

Estas y otras realizaciones de la invención se ilustran adicionalmente mediante la descripción detallada que sigue.

**Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 ilustra los resultados de experimentos *in vivo* que demuestran que los ratones  $\beta 5^{-/-}$  están protegidos frente al EP inducido por lesión pulmonar.

La Figura 2 ilustra los resultados de experimentos *in vivo* que demuestran que un anticuerpo que se une específicamente a  $\beta 5$  (es decir, ALULA) reduce la gravedad del EP inducido por reperfusión por isquemia.

La Figura 3 ilustra los resultados de experimentos *in vivo* que demuestran que un anticuerpo que se une específicamente a  $\beta 5$  (es decir, ALULA) reduce la gravedad del EP inducido por lesión pulmonar por ventilación de volumen corriente alto.

La Figura 4 ilustra los resultados de experimentos *in vitro* que demuestran que un anticuerpo que se une específicamente a  $\beta 5$  (es decir, ALULA) bloquea la adhesión de células que expresan integrina  $\alpha\beta 5$  a placas recubiertas con un intervalo de concentraciones del ligando de la integrina  $\alpha\beta 5$ , vitronectina.

**Descripción detallada de la invención****I. Introducción**

La presente invención se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de que el tratamiento de animales con agentes que se unen a integrinas  $\alpha\beta 5$  reduce los síntomas de EP. Más particularmente, el bloqueo de la unión de ligandos con integrina  $\alpha\beta 5$  puede reducir la gravedad del EP. Los inventores han demostrado que un anticuerpo que se une a la integrina  $\alpha\beta 5$  bloquea la unión de vitronectina, un ligando de la integrina  $\alpha\beta 5$ , con integrina  $\alpha\beta 5$ . Los inventores han demostrado además que la administración de un anticuerpo que se une a la integrina  $\alpha\beta 5$  reduce la gravedad del EP. Por consiguiente, la invención se refiere al tratamiento o prevención del EP en un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de  $\alpha\beta 5$  al sujeto.

El anticuerpo divulgado se designa "ALULA". Los anticuerpos de la invención pueden competir con el anticuerpo divulgado denominado "ALULA". Como se describe más detalladamente más adelante en los Ejemplos, ALULA se une a la integrina  $\alpha\beta 5$  y la administración de ALULA a un sujeto mamífero reduce la gravedad de EP en el sujeto.

La invención también proporciona métodos para identificar nuevos agentes para el tratamiento del EP mediante la identificación de agentes que compiten con un anticuerpo de la invención o un ligando de  $\alpha\beta 5$  por la unión a integrinas  $\alpha\beta 5$  y probar su capacidad para tratar el EP.

**Definiciones**

Un "antagonista de  $\alpha\beta 5$ " es cualquier agente que compita con un ligando de  $\alpha\beta 5$  por los sitios de unión al ligando disponibles en las integrinas  $\alpha\beta 5$ . Los antagonistas de  $\alpha\beta 5$  incluyen agentes que se unen específicamente a  $\alpha\beta 5$ ,

$\beta 5$ , así como un agente que se une a  $\alpha\beta 5$  o  $\beta 5$  y al menos otra integrina tal como, por ejemplo,  $\alpha\beta 3$  o  $\alpha\beta 6$ .

Una integrina  $\alpha\beta 5$  es un miembro de una familia de moléculas de adhesión que comprende heterodímeros  $\alpha/\beta$  asociados de forma no covalente que median, entre otros, en las interacciones célula-célula, las interacciones de matriz extracelular-célula y las interacciones célula-patógeno.  $\alpha\beta 5$  es la única integrina que contiene la subunidad  $\beta 5$ .  $\alpha\beta 5$  reconoce la secuencia peptídica RGD y se une a la vitronectina (véase, por ejemplo, Hynes, Cell 69:11-25 (1992)) y se ha implicado en múltiples trastornos incluyendo ictus, infarto de miocardio, cáncer (es decir, angiogénesis) y enfermedad de neovascularización ocular (véase, por ejemplo, Friedlander et al., Science 270(5241):1500-2 (1995); Friedlander et al., PNAS USA 93(18):9764-9 (1996); Elicieri et al., J. Cell Biol. 157 (10):149-159 (2002); Heba et al., J. Vasc. Res. 38(3):288-300 (2001); Soeki et al., Cardiology 93(3):168-74 (2000); y Li et al., Am. J. Physiol. 270 (5 Pt 2):H1803-11 (1996)). Tanto  $\alpha\beta 5$  como  $\beta 5$  se han secuenciado y caracterizado (véase, por ejemplo, Hynes, 1992 *supra* y patente US-5.527.679, respectivamente).

Una "dosis terapéutica" o "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" de un antagonista de la integrina  $\alpha\beta 5$  es una cantidad del antagonista que evita, alivia, disminuye o reduce la gravedad de los síntomas de una enfermedad asociada con la integrina  $\alpha\beta 5$  incluyendo, por ejemplo, ictus, infarto de miocardio, cáncer (es decir, angiogénesis), enfermedad de neovascularización ocular y EP (por ejemplo, acumulación de líquido en los pulmones, aumento de la presión hidrostática capilar pulmonar o apnea) en un paciente.

El término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido codificado por un gen de inmunoglobulina o fragmentos funcionales del mismo que se unen específicamente a y reconocen un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon, y mu, así como los múltiples genes de la región variable de la inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, las cuales a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Un ejemplo de unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Por lo tanto, las expresiones "cadena pesada variable" " $V_H$ " o " $VH$ " se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo un Fv, scFv, dsFv o Fab; mientras que las expresiones "cadena ligera variable", " $V_L$ " o " $VL$ " se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, incluyendo de un Fv, scFv, dsFv o Fab.

Los ejemplos de fragmentos funcionales de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, moléculas de anticuerpo completo, fragmentos de anticuerpo, tales como Fv, Fv de cadena sencilla (scFv), regiones determinantes de la complementariedad (CDR), VL (región variable de la cadena ligera), VH (región variable de la cadena pesada), Fab, F(ab)<sub>2</sub>' y cualquier combinación de estas o cualquier otra parte funcional de un péptido de inmunoglobulina capaz de unirse a un antígeno diana (véase, por ejemplo, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 4<sup>a</sup> ed. 2001)). Como apreciará un experto en la materia, pueden obtenerse diversos fragmentos de anticuerpo mediante diversos métodos, por ejemplo, digestión de un anticuerpo intacto con una enzima, tal como pepsina; o síntesis de novo. Los fragmentos de anticuerpo se sintetizan con frecuencia de novo de forma química o usando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se usa en la presente memoria, incluye fragmentos de anticuerpo producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o los sintetizados de novo usando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena sencilla) o los identificados usando bibliotecas de presentación de fagos (véase, por ejemplo, McCafferty et al., (1990) Nature 348:552). El término "anticuerpo" también incluye moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Se describen moléculas bivalentes y biespecíficas en, por ejemplo, Kostelny et al. (1992) J. Immunol. 148:1547, Pack y Pluckthun (1992) Biochemistry 31:1579, Hollinger et al. (1993), PNAS. USA. 90:6444, Gruber et al. (1994) J Immunol. :5.368, Zhu et al. (1997) Protein Sci. 6:781, Hu et al. (1996) Cancer Res. 56:3055, Adams et al. (1993) Cancer Res. 53:4026, y McCartney, et al. (1995) Protein Eng. 8:301.

Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo que conserva la reactividad de un anticuerpo no humano siendo a la vez menos inmunogénico en seres humanos. Esto puede conseguirse, por ejemplo, conservando las regiones CDR no humanas y sustituyendo las partes restantes del anticuerpo con sus homólogos humanos. Véase, por ejemplo, Morrison et al., PNAS USA, 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31(3):169-217 (1994).

"Fv de cadena sencilla (scFv)" o "anticuerpos de cadena sencilla" se refiere a una proteína en la que las regiones  $V_H$  y  $V_L$  de un anticuerpo scFv comprenden una cadena sencilla que se pliega para crear un sitio de unión al antígeno similar al existente en anticuerpos de dos cadenas. Se han descrito métodos para preparar anticuerpos scFv en, por ejemplo, Ward et al. Exp. Hematol (5):660-4 (1993); y Vaughan et al., Nat. Biotechnol. 14(3):309-14 (1996). Los anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv) incluyen opcionalmente un enlazador peptídico de no más de 50 aminoácidos, generalmente no más de 40 aminoácidos, preferiblemente no más de 30 aminoácidos y más

preferiblemente no más de 20 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el enlazador peptídico es un concatémero de la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6 de dichas secuencias. Sin embargo, debe apreciarse que pueden realizarse algunas sustituciones de aminoácidos dentro del enlazador. Por ejemplo, una valina puede sustituirse por una glicina. Se conocen bien en la técnica enlazadores peptídicos adicionales y su uso. Véase, por ejemplo, Huston et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 8:5879 (1988); Bird et al., Science 242:4236 (1988); Glockshuber et al., Biochemistry 29:1362 (1990); patente US-4.946.778, patente US-5.132.405 y Stemmer et al., Biotechniques 14:256-265 (1993).

La frase "se une específicamente (o selectivamente) a un anticuerpo" cuando se hace referencia a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en presencia de una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. Por lo tanto, en condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos específicos se unen a una proteína particular (por ejemplo, integrina  $\alpha\beta 5$ ,  $\beta 5$ , o partes de la misma) y no se unen en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo en dichas condiciones puede requerir que se seleccione un anticuerpo por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos contra una integrina  $\alpha\beta 5$  o un polipéptido  $\beta 5$  para obtener anticuerpos específicamente inmunorreactivos con esa proteína y no con otras proteínas, excepto para variantes polimórficas, por ejemplo, proteínas al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % idénticas a una secuencia de interés. Puede usarse una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan de forma rutinaria inmunoensayos de ELISA, de fase sólida, transferencias de Western o inmunohistoquímica para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase, Harlow and Lane, Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, NY (1988) para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden usarse para determinar la inmunoreactividad específica. Generalmente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal de fondo o ruido y más generalmente más de 10 a 100 veces el fondo.

Un agente que "compite específicamente" por la unión reduce la unión específica de un anticuerpo a un polipéptido. Se considera que un primer anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión de un segundo anticuerpo si la unión del segundo anticuerpo con el antígeno se reduce en al menos 30 %, habitualmente al menos aproximadamente 40 %, 50 %, 60 % o 75 % y con frecuencia al menos aproximadamente 90 %, en presencia del primer anticuerpo usando cualquiera de los ensayos de unión competitiva conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow and Lane, *supra*).

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable en la presente memoria para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. Como se usa en la presente memoria, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa (es decir, antígenos), en las que los restos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que actúan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono  $\alpha$  que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. "Imitadores de aminoácidos" se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que actúan de una manera similar a un aminoácido de origen natural.

Los aminoácidos pueden denominarse en la presente memoria por sus símbolos de tres letras habitualmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Los nucleótidos, de modo similar, pueden denominarse por sus códigos de una letra habitualmente aceptados.

Como se usa en la presente memoria, las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan de forma intercambiable. El uso del término "polinucleótido" incluye oligonucleótidos (es decir, polinucleótidos cortos). Este término también se refiere a desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y variantes de origen natural, y también puede referirse a ácidos nucleicos sintéticos y/o de origen no natural (es decir, que comprende análogos de ácidos nucleicos o restos o enlaces de cadena principal modificados), tales como, por ejemplo y sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metil fosfonatos, metil fosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos peptidonucleicos (PNA) y similares. A no ser que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca de forma implícita variantes modificadas de forma conservativa de los mismos (por ejemplo, sustituciones de codones degradados) y secuencias complementarias así como la secuencia indicada de

forma explícita. Específicamente, pueden conseguirse sustituciones de codones degradados generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con restos de base mixta y/o de desoxiinosina (véase, por ejemplo, Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985), y Cassol et al., (1992); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

### Inhibición de $\alpha\beta 5$

La presente invención se refiere al tratamiento o prevención del EP o la lesión pulmonar aguda inhibiendo la unión de ligandos a la integrina  $\alpha\beta 5$ . Se usan anticuerpos que se unen específicamente a la subunidad  $\beta 5$  de la integrina  $\alpha\beta 5$ . En algunas realizaciones, la enfermedad es el EP (incluyendo, por ejemplo, EP cardiogénico y no cardiogénico). En algunas realizaciones, el tratamiento del EP también trata o previene trastornos aguas abajo tales como, por ejemplo, la fibrosis pulmonar.

### Anticuerpos

De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos que se unen específicamente a la subunidad  $\beta 5$  de la integrina  $\alpha\beta 5$ , se usan para tratar o prevenir el EP o la lesión pulmonar aguda. Los anticuerpos también pueden competir con otros ligandos por la unión a la integrina  $\alpha\beta 5$  o a la subunidad  $\beta 5$  de la integrina  $\alpha\beta 5$ . Los anticuerpos adecuados incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados y fragmentos de anticuerpo (es decir, Fv, Fab, (Fab)<sub>2</sub> o scFv).

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal ALULA (N° de depósito de ATCC PTA-5817, realizado el 13 de febrero de 2004, en la ATCC, 10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209) que se une a la subunidad  $\beta 5$  de la integrina  $\alpha\beta 5$ , se usa para tratar o prevenir el EP o la lesión pulmonar aguda. Sin quedar ligado por la teoría, se postula que ALULA actúa bloqueando los cambios mediados por la integrina  $\alpha\beta 5$  en la permeabilidad vascular de los pulmones. En algunas realizaciones, se usan ALULA humanizados, fragmentos de ALULA o un anticuerpo monoclonal que compite con ALULA por la unión a la integrina  $\alpha\beta 5$  o a la subunidad  $\beta 5$  de la integrina  $\alpha\beta 5$ .

Los anticuerpos monoclonales se obtienen por diversas técnicas familiares para los expertos en la materia. Brevemente, se immortalizan células del bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado, habitualmente mediante fusión con una célula de mieloma (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519 (1976)). Los métodos alternativos de immortalización incluyen transformación con virus de Epstein Barr, oncogenes, o retrovirus, u otros métodos bien conocidos en la técnica. Se seleccionan colonias que surgen de células inmortalizadas sencillas para producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad por el antígeno deseado, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por dichas células puede potenciarse por diversas técnicas, incluyendo inyección en la cavidad peritoneal de un hospedador vertebrado. Como alternativa, se pueden aislar secuencias de ADN que codifiquen un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo seleccionando una biblioteca de ADN de linfocitos B humanos de acuerdo con el protocolo general descrito por Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989).

Los anticuerpos monoclonales se recogen y se titulan frente al inmunógeno en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo de fase sólida con el inmunógeno inmovilizado en un soporte sólido. Los anticuerpos monoclonales habitualmente se unirá con una  $K_d$  de al menos aproximadamente 0,1 mM, más habitualmente al menos aproximadamente 1  $\mu$ M, preferiblemente al menos aproximadamente 0,1  $\mu$ M o mejor, y lo más preferiblemente, 0,01  $\mu$ M o mejor.

En un ejemplo ilustrativo, un animal, tal como un conejo o ratón se inmuniza con polipéptido  $\alpha\beta 5$ , o una construcción de ácido nucleico que codifique dicho polipéptido. Los anticuerpos producidos como resultado de la inmunización pueden aislarse usando métodos convencionales.

Las inmunoglobulinas, incluyendo fragmentos de unión y otros derivados de los mismos, de la presente invención pueden producirse fácilmente por una diversidad de técnicas de ADN recombinante, incluyendo por expresión en células transfectadas (por ejemplo células eucariotas inmortalizadas, tales como células de mieloma o hibridoma) o en ratones, ratas, conejos u otros vertebrados capaces de producir anticuerpos por métodos bien conocidos. Pueden obtenerse células fuente adecuadas para las secuencias de ADN y células hospedadoras para expresión y secreción de inmunoglobulina de varias fuentes, tales como de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Catálogo de líneas celulares e hibridomas, 5ª edición (1985) Rockville, Md.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, es decir, un anticuerpo que conserva la reactividad de un anticuerpo no humano pero siendo a la vez menos inmunogénico en seres humanos. Esto puede conseguirse, por ejemplo, conservando las regiones CDR no humanas y sustituyendo las partes restantes del anticuerpo con sus homólogos humanos. Véase, por ejemplo Morrison et al., *PNAS USA*, 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994). Se conocen bien en el campo técnicas para humanización de anticuerpos y se describen en, por ejemplo, las patentes US-4.816.567; US-5.530.101; US-5.859.205; US-5.585.089; US-5.693.761; US-5.693.762; US-5.777.085; US-6.180.370; US-6.210.671; y US-

6.329.511; documento WO 87/02671; Solicitud de patente EP 0173494; Jones et al. (1986) Nature 321:522; y Verhoyen et al. (1988) Science 239:1534. Se describen también anticuerpos humanizados en, por ejemplo, Winter and Milstein (1991) Nature 349:293. Por ejemplo, pueden producirse polinucleótidos que comprenden una primera secuencia que codifica regiones marco conservadas de inmunoglobulina humanizada y un segundo conjunto de secuencias que codifican las regiones determinantes de complementariedad de inmunoglobulina deseadas de forma sintética o combinando segmentos de ADNc y ADN genómico apropiados. Pueden aislarse secuencias de ADN de la región constante humana de acuerdo con procedimientos bien conocidos de una diversidad de células humanas. Las CDR para producir las inmunoglobulinas de la presente invención se derivarán de forma similar de anticuerpos monoclonales capaces de unirse específicamente a la subunidad  $\beta 5$  de la integrina  $\alpha\beta 5$  (por ej., ALULA o anticuerpos que compiten con ALULA por la unión específica a la integrina  $\alpha\beta 5$ ).

En algunos casos, la transferencia de una CDR a un marco humano conduce a una pérdida de especificidad por el anticuerpo humanizado. En estos casos, puede introducirse retromutación en las regiones marco conservadas de la parte humana del anticuerpo. Se conocen bien en la técnica métodos para realizar retromutaciones y se describen en, por ejemplo, Co et al., PNAS USA 88; 2269-2273 (1991) y en el documento WO 90/07861.

En algunas realizaciones, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpo tales como Fab,  $F(ab')_2$ , Fv o scFv. Los fragmentos de anticuerpo pueden generarse usando cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo digestión química (por ejemplo, papaína o pepsina) y métodos recombinantes. Los expertos en la materia conocen métodos para aislar y preparar ácidos nucleicos recombinantes (véase, Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual (2ª ed. 1989); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995)). Los anticuerpos pueden expresarse en diversas células hospedadoras, incluyendo *E. coli*, otros hospedadores bacterianos, levadura y diversas células eucariotas superiores tales como las líneas celulares COS, CHO y HeLa y líneas celulares de mieloma.

En la presente memoria se describen métodos para identificar anticuerpos que compiten con ALULA por la unión específica a la integrina  $\alpha\beta 5$ .

Los ensayos de unión competitiva se pueden usar para identificar anticuerpos que compiten con ALULA por la unión específica a la integrina  $\alpha\beta 5$ . Se puede usar cualquiera de una serie de ensayos de unión competitiva conocidos en la técnica para medir la competencia entre dos anticuerpos frente al mismo antígeno. Brevemente, se prueba la capacidad de diferentes anticuerpos para inhibir la unión de otro anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden diferenciar por el epítipo al que se unen usando un ensayo de ELISA sándwich. Esto se lleva a cabo utilizando un anticuerpo de captura para recubrir la superficie de un pocillo. A continuación se añade una concentración subsaturante de antígeno marcado a la superficie de captura. Esta proteína se unirá al anticuerpo a través de un anticuerpo específico: interacción con el epítipo. Después de lavar un segundo anticuerpo, que se ha unido covalentemente a un resto detectable (p.ej., HRP, definiéndose el anticuerpo marcado como el anticuerpo de detección) se añade al ELISA. Si este anticuerpo reconoce el mismo epítipo que el anticuerpo de captura, no podrá unirse a la proteína diana ya que ese epítipo particular ya no estará disponible para la unión. Sin embargo, si este segundo anticuerpo reconoce un epítipo diferente en la proteína diana, será capaz de unirse y esta unión puede detectarse cuantificando el nivel de actividad (y, por lo tanto, de unión al anticuerpo) usando un sustrato relevante. El fondo se define usando un único anticuerpo como anticuerpo de captura y detección, mientras que la señal máxima se puede establecer capturando con un anticuerpo específico de antígeno y detectando con un anticuerpo contra la etiqueta del antígeno. Utilizando las señales de fondo y máximas como referencias, los anticuerpos pueden evaluarse por pares para determinar la especificidad del epítipo.

Se considera que un primer anticuerpo inhibe competitivamente la unión de un segundo anticuerpo, si la unión del segundo anticuerpo al antígeno se reduce al menos en un 30 %, habitualmente al menos aproximadamente el 40 %, 50 %, 60 % o 75 %, y con frecuencia en al menos aproximadamente 90 %, en presencia del primer anticuerpo usando cualquiera de los ensayos descritos anteriormente.

### Tratamiento terapéutico

Como se ha descrito anteriormente, la invención también proporciona composiciones que comprenden los anticuerpos de la invención para uso para tratar o prevenir el EP o la lesión pulmonar aguda.

En una realización, las composiciones de la invención (por ejemplo, composiciones que comprenden ALULA, ALULA humanizado o fragmentos de ALULA) pueden proporcionarse para tratar o prevenir el EP en sujetos con EP o en riesgo de desarrollar EP. Por ejemplo, un sujeto que haya tenido exposición a un inhalante tóxico probablemente se trataría después de dicha exposición, mientras que un paciente en riesgo de EP puede tratarse de forma profiláctica y/o terapéutica. Los ejemplos de pacientes con riesgo de EP incluyen pacientes con aspiración aguda, pacientes que muestren síntomas de sepsis bacteriana, pacientes cuyos cultivos sanguíneos sean positivos para bacterias gram positivas o gram negativas, pacientes con pancreatitis o pacientes en choque hemorrágico.

Las composiciones de la invención pueden administrarse de forma regular (por ejemplo, diariamente) durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 días o 1-3 semanas o más).

Las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto mamífero para bloquear la unión de  $\alpha\beta 5$  usando cualquier vía conocida de la técnica, incluyendo por ejemplo, mediante inyección (por ejemplo intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o intradérmica), inhalación, aplicación transdérmica, administración rectal o administración oral.

5 Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administre, así como por el método particular usado para administrar la composición. En consecuencia, hay una amplia diversidad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>a</sup> ed., 1989).

10 Las composiciones de la invención, solas o en combinación con otros componentes adecuados, pueden prepararse en formulaciones en aerosol (es decir, pueden "nebulizarse") para administrarse mediante inhalación. Las formulaciones en aerosol pueden incluirse en propelentes aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

15 Las formulaciones adecuadas para administración incluyen soluciones acuosas y no acuosas, soluciones estériles isotónicas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. En la práctica de la presente invención, pueden administrarse composiciones, por ejemplo, por vía oral, vía nasal, vía tópica, vía intravenosa, vía intraperitoneal o vía intratecal. Las formulaciones de compuestos pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, tales como ampollas y frascos. Pueden prepararse soluciones y suspensiones a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito. Los moduladores también pueden administrarse como parte de un fármaco o alimento preparado.

20 Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden comprender: (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del ácido nucleico envasado o suspendido en diluyentes, tales como agua, solución salina o PEG 400; (b) cápsulas, sobrecitos o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo, como líquidos, sólidos, gránulos o gelatina; (c) suspensiones en un líquido apropiado; y (d) emulsiones adecuadas. Las formas de comprimido pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos cálcicos, almidón de maíz, almidón de patata, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, cargas, aglutinantes, diluyentes, agentes tamponantes, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes, agentes disgregantes y vehículos farmacéuticamente compatibles. Las formas de pastilla para chupar pueden comprender el principio activo en un aromatizante, por ejemplo, sacarosa, así como pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y emulsiones de goma arábiga, geles y similares que contienen, además del principio activo, vehículos conocidos en la técnica.

30 La dosis administrada a un paciente en el contexto de la presente invención debería ser suficiente para efectuar una respuesta beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo, por ejemplo, una reducción de la presión hidrostática capilar pulmonar, una reducción del fluido en los pulmones, una reducción de la tasa de acumulación de fluido en los pulmones, o una combinación de los mismos. El nivel de dosis óptimo para cualquier paciente dependerá de una diversidad de factores incluyendo la eficacia del modulador específico empleado, la edad, peso corporal, actividad física y dieta del paciente, en una posible combinación con otros fármacos, y de la gravedad del EP. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, naturaleza y magnitud de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la administración de un compuesto o vector particular en un sujeto particular.

40 A la hora de determinar la cantidad eficaz de anticuerpos de la invención para administrar, un médico puede evaluar los niveles plasmáticos circulantes de los anticuerpos. En general, la dosis equivalente es de aproximadamente 1 ng/kg a 10 mg/kg para un sujeto típico.

45 Para la administración, los anticuerpos pueden administrarse a una tasa determinada por la DL<sub>50</sub>, y los efectos secundarios a diversas concentraciones, según se aplique a la masa y salud general del sujeto. La administración puede conseguirse mediante dosis individuales o divididas.

### 55 **Terapia de combinación**

60 En algunos aspectos de la divulgación, los anticuerpos de la invención se administran junto con un segundo agente terapéutico para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con la integrina  $\alpha\beta 5$  (por ej., ictus, infarto de miocardio y cáncer (es decir, angiogénesis). Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden administrarse junto con un segundo agente terapéutico para tratar o prevenir la lesión pulmonar aguda y/o el SDRA o EP. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención (por ej., ALULA, ALULA humanizado o fragmentos de ALULA) se pueden administrar junto con cualquiera de los tratamientos convencionales para el EP incluyendo, por ejemplo, agentes diuréticos, agentes broncodilatadores, narcóticos, oxígeno y aplicación de torniquete selectivo. Además, los anticuerpos de la invención pueden administrarse junto con agentes que se dirigen a rutas metabólicas que están implicadas en la



lesión pulmonar aguda y/o EP. Por ejemplo, los anticuerpos pueden administrarse junto con inhibidores de la ruta del TGF $\beta$ , proteína C activada, esteroides, GM-CSF, inhibidores de plaquetas, agonistas de  $\beta$ -2, tensioactivos, anticuerpos que se unen específicamente a la integrina  $\alpha\beta$ 5, un segundo antagonista de la integrina  $\alpha\beta$ 5, anticuerpos que se unen específicamente a una integrina  $\alpha\beta$ 6, antagonistas del receptor de trombina, agentes anti-trombina, inhibidores de la rho quinasa y ácidos nucleicos que inhiben la expresión de la integrina  $\alpha\beta$ 5 incluyendo, por ejemplo, los oligonucleótidos anti-sentido y ARNs descritos en la presente memoria. Los inhibidores de la ruta del TGF $\beta$  adecuados incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-TGF- $\beta$  (incluyendo los que se bloquean específicamente TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 o cualquier combinación de los mismos) como se describe, por ejemplo, en Ling et al., J. Amer. Soc. Nephrol. 14:377-388 (2003), McCormick et al., J. Immunol. 163:5693-5699 (1999), y Cordeiro, Curr. Opin. Mol. Ther. 5(2):199-203 (2003); inhibidores del receptor TGF- $\beta$  de tipo II o inhibidores del receptor TGF- $\beta$  de tipo quinasa I como se describe en, por ejemplo, DaCosta Bayfield, Mol. Pharmacol. 65(3):744-52 (2004), Laping, Curr. Opin. Pharmacol. 3(2):204-8 (2003), Laping, Mol. Pharmacol. 62(1):58-64 (2002); receptor de TGF- $\beta$  soluble de tipo II como se describe en, por ejemplo, Pittet, J. Clin. Invest. 107:1537-1544 (2001); Wang et al., Exp Lung Res. 28(6):405-17 (2002) y Wang, Thorax 54(9):805-12 (1999); péptidos asociados a latencias solubles como se describe en, por ejemplo, Zhang, J. Invest. Dermatol. 121(4):713-9 (2003); inhibidores de la trombospondina I como se describe en, por ejemplo, Crawford et al., Cell 93:1159-1170 (1998), Riberiro et al., J. Biol. Chem. 274:13586-13593. Se describen antagonistas del receptor de trombina adecuados en, por ejemplo, las patentes US-6.544.982; US-6.515.023; US-6.403.612; US-6.399.581 y US-5.446.131. Los inhibidores de la rho quinasa adecuados incluyen, por ejemplo, Y-27632 como se describe en, por ejemplo, Tasaka et al., Am J Respir Cell Mol Biol. 18 Mar de 2005; [publicado electrónicamente antes de impresión], fasudil como se describe en, por ejemplo, Nishikimi et al., J Hypertens. 22(9):1787-96 (2004), 1-(5-isoquinolinsulfonil)-homopiperazina (HA-1077), (S)-(+)-2-metil-1-[(4-metil-5-isoquinolina)sulfonil]-homopiperazina (H-1152P) como se describe en, por ejemplo, Sasaki et al., Pharmacol Ther. 93(2-3):225-32 (2002), e inhibidores de la rho quinasa adicionales como se describe en, por ejemplo, las patentes US-6.451.825 y US-6.218.410 y en la Publicación de patente los Estados Unidos números 20050014783 y 20030134775.

Además, los anticuerpos pueden administrarse en combinación con un adenovirus que expresa ATPasa como se describe en la Publicación de patente de Estados Unidos N.º 20020192186; con un receptor  $\beta$ 2 adrenérgico como se describe en la Publicación de patente de Estados Unidos N.º 20020004042; con antagonistas de VEGF $\beta$  como se describe en la patente US-6.284.751; con inhibidores de la peroxidación de lípidos como se describe en la patente US-5.231.114; y con inhibidores de molécula pequeña de las integrinas  $\alpha\beta$ 6,  $\alpha\beta$ 5 y  $\alpha\beta$ 3 como se describe en, por ejemplo, las Solicitudes de patente publicadas de Estados Unidos números 2000/40019206, 2004/0019037, 2004/0019035, 2004/0018192, 2004/0010023, 2003/0181440, 2003/0171271, 2003/0139398, 2002/0037889, 2002/0077321, 2002/0072500, patente US-6.683.051 y Goodman et al., J. Med Chem. 45(5):1045-51 (2002).

Los anticuerpos de la invención (por ejemplo, ALULA, ALULA humanizado o fragmentos de ALULA y el segundo agente terapéutico pueden administrarse de forma simultánea o secuencial. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse en primer lugar, seguido del segundo agente terapéutico. Como alternativa, el segundo agente terapéutico puede administrarse en primer lugar, seguido del anticuerpo. En algunos casos, el anticuerpo y el segundo agente terapéutico se administran en la misma formulación. En otros casos el anticuerpo y el segundo agente terapéutico se administran en formulaciones diferentes. Cuando el anticuerpo y el segundo agente terapéutico se administran en formulaciones diferentes, su administración puede ser simultánea o secuencial.

Para la administración, el anticuerpo y el segundo agente terapéutico pueden administrarse a una tasa determinada por la DL<sub>50</sub> combinada del anticuerpo y el segundo agente terapéutico, y los efectos secundarios del anticuerpo y el segundo agente terapéutico a diversas concentraciones, como se aplica a la masa y salud global del sujeto. En algunos casos, el anticuerpo y segundo agente terapéutico se administran cada uno a una dosis subterapéutica o una dosis terapéutica.

## 50 Kits

La presente invención también proporciona kits para tratar o prevenir el EP. Los kits comprenden un anticuerpo antagonista de la invención (por ejemplo, ALULA, ALULA humanizado o fragmentos de ALULA o un anticuerpo que compite con ALULA) y un segundo agente terapéutico para tratamiento del EP. Los segundos agentes terapéuticos adecuados incluyen, por ejemplo, un inhibidor de la ruta del TGF $\beta$ , proteína C activada, un esteroide, GM-SCF, un inhibidor de plaquetas, un agente diurético, un agente broncodilatador, anticuerpos que se unen específicamente a la integrina  $\alpha\beta$ 5 o  $\beta$ 5, un segundo antagonista de la integrina  $\alpha\beta$ 5, anticuerpos que se unen específicamente a una integrina  $\alpha\beta$ 6, antagonistas de la integrina  $\alpha\beta$ 6, agonistas de  $\beta$ -2 y tensioactivos. Los kits también pueden comprender instrucciones escritas (por ejemplo, un manual) para usar el kit.

## 60 Ejemplos

### Ejemplo 1: Materiales v métodos

65 Modelo de EP por lesión pulmonar por isquemia-reperusión en un solo pulmón en roedores: Se somete a ratones o ratas a trasplante de pulmón, derivación cardiopulmonar, tromboendarterectomía pulmonar o choque grave. A

continuación se inducen isquemia y reperfusión durante treinta minutos y tres horas, respectivamente. Para inducir isquemia, se realiza una toracotomía izquierda por bloquel del hilio izquierdo (por ejemplo, con cinta umbilical) durante 30 minutos. Para inducir la reperfusión, los pulmones se vuelven a hinchar con un volumen corriente de 12 ml/kg de aire y después se reanuda la ventilación normal. Los animales se sacrifican después de 3 horas y se evalúa la permeabilidad de cada pulmón, por ejemplo, midiendo la extravasación de albúmina marcada al pulmón, expresada como equivalentes pulmonares extravasculares (EPEV).

Modelo de EP por lesión pulmonar inducida por ventilación mecánica en roedores: Los ratones o ratas se ventilan con volumen corriente normal (6 ml por kg) o alto (20 ml por kg). Se inyectan a los animales albúminas marcadas con <sup>125</sup>I después de 4 horas y después los pulmones se recogen y se determinan los EPEV.

Medición de los Equivalentes pulmonares extravasculares (EPEV): Se midieron los EPEV como se describe, por ejemplo, en Frank et al., J. Biol. Chem., 278 (45):43939-43950 (2003). Brevemente, se inyecta un indicador vascular (por ejemplo, albúmina <sup>125</sup>I) por vía intraperitoneal en ratas dos horas antes de la recogida de pulmón. Se recoge sangre y se extraen los pulmones. Se mide la radiactividad en plasma y pulmón. Se mide la concentración de hemoglobina en el homogeneizado de pulmón y en la sangre. La radiactividad intravascular de pulmón se calcula multiplicando el recuento de radiactividad en plasma por el volumen de sangre en el pulmón.

Anticuerpos: Se generó ALULA como se describe más adelante. Un anticuerpo monoclonal murino W6/32 que se une específicamente a HLA A, B y C se obtuvo de ATCC. CD-1 WT, un anticuerpo monoclonal que se une a CD-1 se obtuvo de ATCC.

### **Ejemplo 2: Generación de ALULA, un anticuerpo monoclonal murino que se une específicamente a la integrina $\alpha\beta 5$**

Se inmunizaron ratones con el gen de  $\alpha\beta 5$  inactivado con células que expresaban un polipéptido que comprendía una secuencia de integrina  $\alpha\beta 5$ . Se identificaron anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la integrina  $\alpha\beta 5$  usando métodos conocidos en la técnica. Más concretamente, se identificó ALULA que se une específicamente a  $\beta 5$ . Se depositó ALULA en la ATCC el 13 de febrero de 2004 con el siguiente N.º de Referencia: PTA-5817.

### **Ejemplo 3: Los ratones $\beta 5^{-/-}$ no desarrollan EP asociado a lesión pulmonar**

Los ratones  $\beta 5^{-/-}$  y los ratones de tipo silvestre se sometieron a ventilación como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior para inducir EP asociado con lesión pulmonar y se determinaron los EPEV. A diferencia de los ratones de tipo silvestre, los ratones  $\beta 5^{-/-}$  no desarrollaron EP después de la ventilación. Estos resultados indican que  $\alpha\beta 5$  está implicada en el EP. Los resultados se muestran en la Figura 1.

### **Ejemplo 4: Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a $\beta 5$ reduce la gravedad del edema pulmonar asociado con reperfusión por isquemia**

Para determinar el papel de  $\beta 5$  en el EP asociado con reperfusión por isquemia, se administraron a las ratas los siguientes tratamientos y se hicieron mediciones de los EPEV:

1. Sin tratamiento.
2. Inyección intraperitoneal (i.p.) de 4  $\mu\text{g}$  por gramo de W6/32.
3. I.p. 4  $\mu\text{g}$  por gramo (i.p.) de ALULA.
4. Se indujo reperfusión por isquemia como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior.
5. Se indujo reperfusión por isquemia y se inyectaron 4  $\mu\text{g}$  por gramo de W6/32 por vía intraperitoneal.
6. Se indujo reperfusión por isquemia y se inyectaron 4  $\mu\text{g}$  por gramo de ALULA por vía intraperitoneal.

En estos experimentos, los anticuerpos se inyectaron antes de la inducción de la reperfusión por isquemia.

Las ratas que recibieron tratamiento con ALULA mostraron EPEV reducido (es decir, permeabilidad de las células pulmonares reducida) en comparación con las ratas de control, lo que indica que un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a  $\beta 5$  puede reducir la gravedad del EP.

Los resultados se muestran en la Figura 2.

### **Ejemplo 5: Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a $\beta 5$ reduce la gravedad del edema pulmonar asociado con lesión pulmonar**

Para determinar el papel de  $\beta 5$  en el EP asociado con lesión pulmonar, se administraron a los ratones los siguientes tratamientos y se hicieron mediciones de los EPEV:

1. Volumen corriente normal e inyección i.p. de 4 µg por gramo de CD-1 WT.
2. Volumen corriente alto e inyección i.p. de 4 µg por gramo de CD-1 WT.
3. Volumen corriente normal e inyección i.p. de 4 µg por gramo de ALULA.
4. Volumen corriente alto e inyección i.p. de 4 µg por gramo de ALULA.

5

En estos experimentos, los anticuerpos se inyectaron antes de los tratamientos de volumen corriente.

Los ratones que recibieron tratamiento con ALULA mostraron EPEV reducidos en comparación con los ratones de control, lo que indica que un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a β5 puede reducir la gravedad del EP.

10

Por lo tanto, ALULA es el primer anticuerpo monoclonal específico para αβ5 que ha demostrado que tiene actividad de bloqueo *in vivo* en mamíferos completos y es el primero que ha demostrado que bloquea la permeabilidad vascular aumentada y el desarrollo de inundación alveolar en modelos de lesión pulmonar aguda (es decir, EP)

15

Los resultados se muestran en la Figura 3.

**Ejemplo 6: El anticuerpo ALULA bloquea la unión del ligando de la integrina αβ5 vitronectina a las células que expresan integrina αβ5**

20

Se ponen en contacto células SW-480 que expresan integrina αβ5 con 0 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,3 µg/ml y 1 µg/ml de vitronectina en presencia de 0 µg/ml, 0,3 µg/ml, 1 µg/ml y 10 µg/ml de ALULA. Se usa un anticuerpo monoclonal (es decir, Y9A2) específico de la integrina α9β1 como un control negativo. ALULA bloquea la unión del ligando de la integrina αβ5, vitronectina, a las células. Los resultados se muestran en la Figura 4

25

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que se une específicamente a la subunidad  $\beta 5$  de la integrina  $\alpha \nu \beta 5$  para su uso en el tratamiento o prevención del edema pulmonar o en el tratamiento o prevención de la lesión pulmonar aguda, en el que dicho anticuerpo es un antagonista de la integrina  $\alpha \nu \beta 5$ .
2. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo compite con el anticuerpo producido por el hibridoma depositado con el N.º de depósito ATCC PTA-5817 para la unión específica a la integrina  $\alpha \nu \beta 5$ .
- 10 3. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
4. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: un scFv, un Fab y un (Fab')<sub>2</sub>.
- 15 5. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo se administra junto con un segundo agente terapéutico para tratar o prevenir el edema pulmonar o la lesión pulmonar aguda.
- 20 6. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 5, en el que el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en: un inhibidor de la ruta del TGF $\beta$ , proteína C activada, un esteroide, GM-CSF, un inhibidor de plaquetas, un agente diurético, un agente broncodilatador, un anticuerpo que se une a la integrina  $\alpha \nu \beta 5$ , un anticuerpo que se une a  $\beta 5$ , un antagonista de la integrina  $\alpha \nu \beta 5$ , un antagonista de la integrina  $\alpha \nu \beta 6$ , un agonista  $\beta$ -2 y un tensioactivo.
- 25 7. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho anticuerpo se administra por vía intravenosa, intranasal o intrabronquial.
8. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención del edema pulmonar o en el tratamiento o prevención de la lesión pulmonar aguda que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo que se une específicamente a la subunidad  $\beta 5$  de la integrina  $\alpha \nu \beta 5$ , en el que dicho anticuerpo es un antagonista de la integrina  $\alpha \nu \beta 5$ .
- 30 9. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 8, en la que:
- 35 (a) el anticuerpo compite con el anticuerpo producido por el hibridoma depositado con el N.º de Depósito ATCC PTA-5817 por la unión específica a la integrina  $\alpha \nu \beta 5$ ;  
(b) el anticuerpo es un anticuerpo humanizado; o  
(c) el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: un scFv, un Fab y un (Fab')<sub>2</sub>.
- 40 10. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 8 o 9, que se administra junto con un segundo agente terapéutico para tratar o prevenir el edema pulmonar o la lesión pulmonar aguda, opcionalmente en el que el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en: un inhibidor de la ruta del TGF $\beta$ , proteína C activada, un esteroide, GM-CSF, un inhibidor de plaquetas, un agente diurético, un agente broncodilatador, un anticuerpo que se une a la integrina  $\alpha \nu \beta 5$ , un anticuerpo que se une a  $\beta 5$ , un antagonista de la integrina  $\alpha \nu \beta 5$ , un antagonista de la integrina  $\alpha \nu \beta 6$ , un agonista  $\beta$ -2 y un tensioactivo.
- 45 11. La composición farmacéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que dicha composición se administra por vía intravenosa, intranasal o intrabronquial.
- 50 12. Un kit para uso en el tratamiento o prevención del edema pulmonar o la lesión pulmonar aguda, que comprende un anticuerpo que se une específicamente a la subunidad  $\beta 5$  de la integrina  $\alpha \nu \beta 5$ , en el que dicho anticuerpo es un antagonista de la integrina  $\alpha \nu \beta 5$  y un segundo agente terapéutico para tratar o prevenir el edema pulmonar o la lesión pulmonar aguda.
- 55 13. El kit para el uso de la reivindicación 12, en el que:
- (a) el anticuerpo compite con el anticuerpo producido por el hibridoma depositado con el N.º de Depósito ATCC PTA-5817 por la unión específica a la integrina  $\alpha \nu \beta 5$ ;  
(b) el anticuerpo es un anticuerpo humanizado; o  
60 (c) el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: un scFv, un Fab y un (Fab')<sub>2</sub>.
14. El kit para el uso de la reivindicación 12 o 13, en el que el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en: un inhibidor de la ruta del TGF $\beta$ , proteína C activada, un esteroide, GM-CSF, un inhibidor de plaquetas, un agente diurético, un agente broncodilatador, un anticuerpo que se une a la integrina  $\alpha \nu \beta 5$ , un anticuerpo que se une a  $\beta 5$ , un antagonista de la integrina  $\alpha \nu \beta 5$ , un antagonista de la integrina  $\alpha \nu \beta 6$ , un agonista  $\beta$ -2 y un tensioactivo.
- 65

- 5 15. Un método para identificar un agente para tratar el edema pulmonar, comprendiendo el método poner en contacto una pluralidad de agentes con la integrina  $\alpha\beta5$ ; seleccionar un agente que compite por la unión a la integrina  $\alpha\beta5$  con un anticuerpo o ligando que se une específicamente a la subunidad  $\beta5$  de la integrina  $\alpha\beta5$ , en el que dicho anticuerpo es un antagonista de la integrina  $\alpha\beta5$ , y determinar si el agente seleccionado tiene un efecto sobre el edema pulmonar, en un animal no humano identificando de este modo un agente para tratar el edema pulmonar.
16. El método de la reivindicación 15, en el que:
- 10 (a) el anticuerpo compite con el anticuerpo producido por el hibridoma depositado con el N.º de Depósito ATCC PTA-5817 por la unión específica a la integrina  $\alpha\beta5$ ;  
(b) el anticuerpo es un anticuerpo humanizado; o  
(c) el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: un scFv, un Fab y un (Fab')<sub>2</sub>.
- 15 17. El método de la reivindicación 15, en el que el ligando se selecciona del grupo que consiste en: vitronectina, fibronectina, osteopontina, tenascina c y base pentónica de adenovirus.

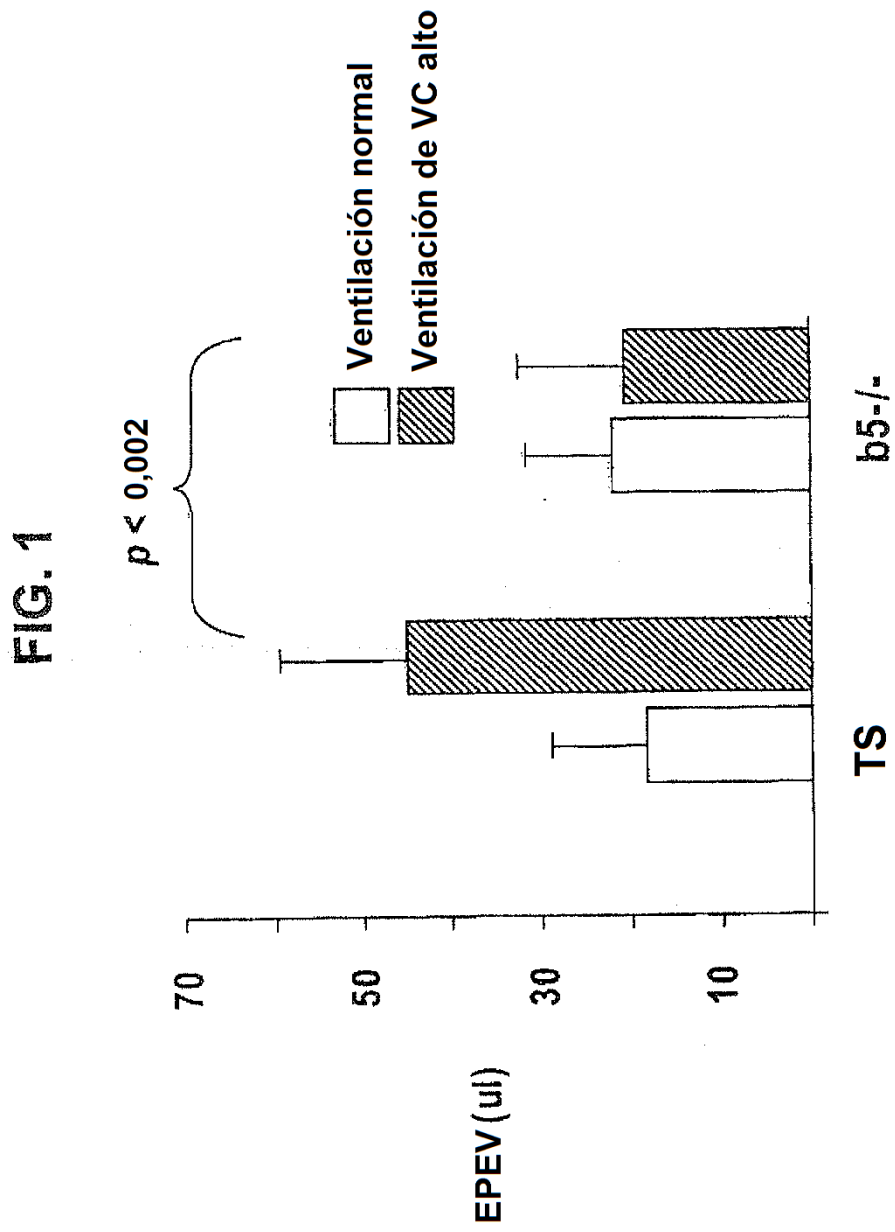


FIG. 2

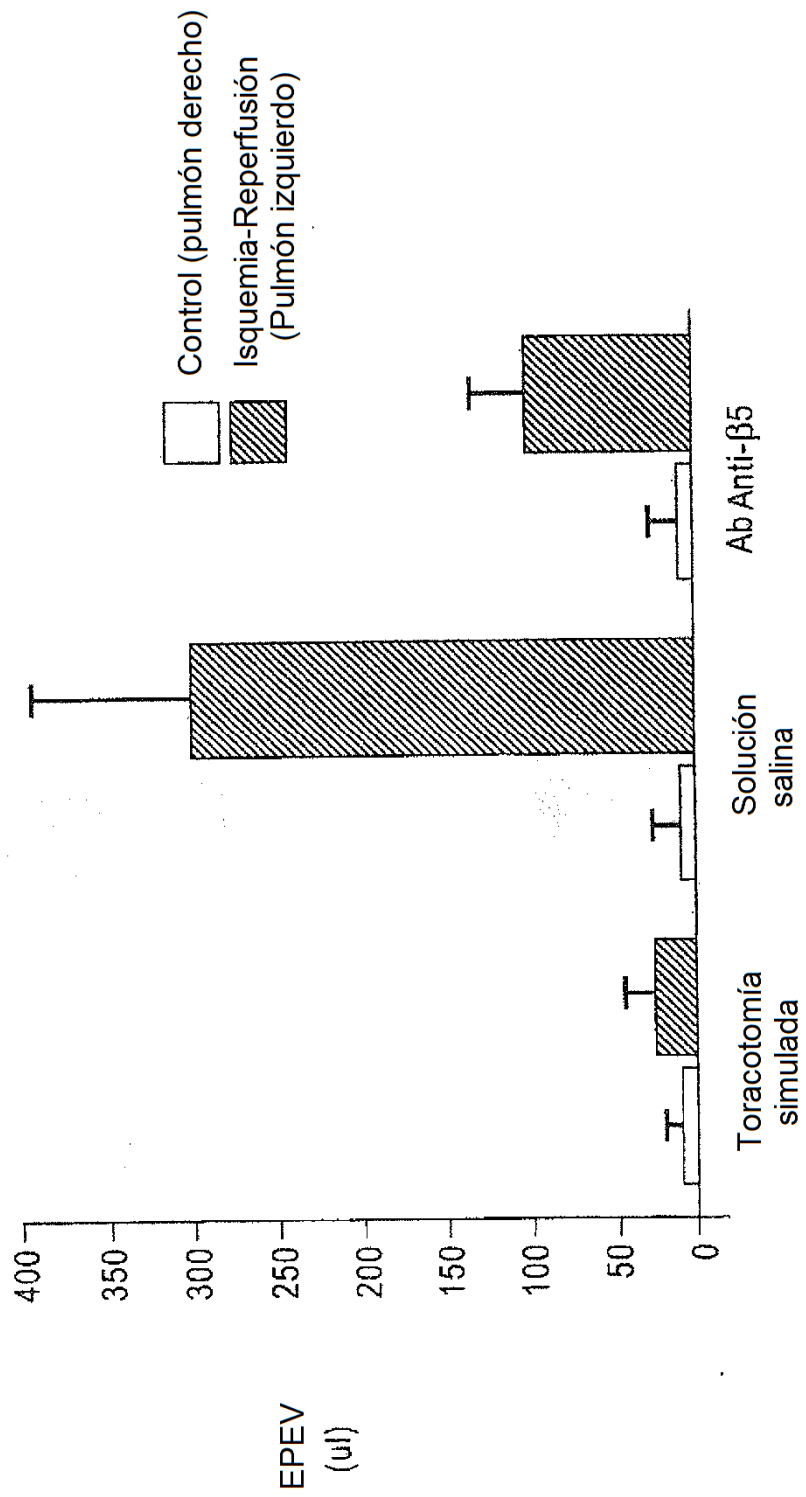
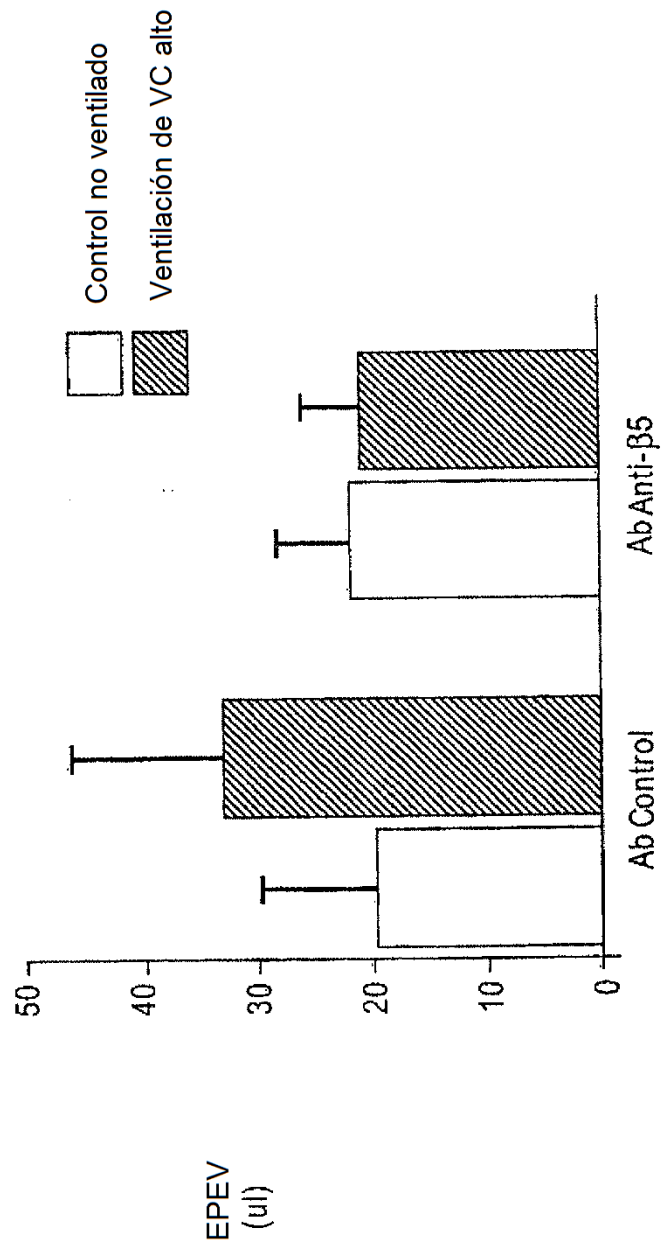


FIG. 3





**FIG. 4**

