



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 90775 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)
A61K039/395 A

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.06.07	(73) <i>Titular(es):</i> THE ROCKFELLER UNIVERSITY 1230 YORK AVENUE NEW YORK, NEW YORK 10021-6399 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.06.07 US 204037 1989.03.13 US 331450	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1989.12.29	(72) <i>Inventor(es):</i> SAMUEL D. WRIGHT US ELAINE I. TUOMANEN US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 05/94 1994.05.18	(74) <i>Mandatário(s):</i> ANTÓNIO LUÍS LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DE MIGUEL LUPI 16 R/C 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* MÉTODO PARA INIBIR O AFLUXO DE LEUCÓCITOS EM ÓRGÃOS DURANTE A SÉPSIA E OUTROS TRAMAS MEDIANTE UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CD18

(57) *Resumo:*

[Fig.]

13.9.2000.975

4.

THE ROCKEFELLER UNIVERSITY

"Método para inibir o afluxo de leucócitos em órgãos durante a sépsia e outros traumas mediante utilização de anticorpos anti-CD18"

A invenção aqui descrita foi realizada, em parte, ao abrigo dos contratos de investigação ("Research Grants") AI22003 e HL32418 do National Institutes of Health, USPHS.

Antecedentes da invenção

Os leucócitos, em especial os leucócitos polimorfonucleares (PMN), circulam no sangue e não aderem ao endotélio (revestimento celular dos vasos). Após a introdução de um agente infeccioso, os fragmentos que resultam da morte de um agente infeccioso ou de outra substância inflamatória nos tecidos circundantes, de leucócitos, especialmente dos PMN, são induzidos a ligarem-se com o endotélio e em seguida a migrarem para os tecidos. Uma vez que os PMN podem reconhecer e matar muitos agentes infecciosos, isto constitui um mecanismo de proteção, contudo, em muitas circunstâncias de doença, tais como a sépsia e o trauma, os PMN reagem de um modo exagerado e nocivo. Podem ligar-se tão avidamente ao en

dotélio que obstruem a corrente sanguínea. Uma vez nos tecidos, segregam proteases, moléculas intermédias do oxigénio reactivo e outras moléculas tóxicas que não somente exterminam os infecciosos, mas também podem provocar um dano considerável no tecido. Além disso, libertam mediadores inflamatórios que alteram o tónus vascular e a permeabilidade e fazem convergir outros leucócitos para o local, mantendo, assim, a inflamação.

Duas doenças em que os danos induzidos pelos PMN contribuem para a morbidez e mortalidade são o choque endotóxico e a síndrome de dificuldade respiratória do adulto. Em ambos os casos, o pulmão é o órgão preferido para a emigração dos PMN e o dano causado no pulmão pode ser suficientemente grave para provocar a morte.

A síndrome de dificuldade respiratória do adulto (ARDS) pode resultar de causas infecciosas ou não infecciosas; quais quer das quais provoca uma patologia idêntica como uma consequência da emigração dos PMN. No choque endotóxico associado com a infecção os antibióticos amplificam os efeitos nocivos da inflamação o que é devido ao mecanismo através do qual estes agentes exercem os seus efeitos anti-infecciosos. Por exemplo, após a administração de um antibiótico beta-lactâmico (ou outro antibiótico que se dirige à parede celular) as bactérias desagregam-se devido à lise provocada pelo agente anti-infecção. Os fragmentos resultantes das bactérias iniciam uma resposta inflamatória dramaticamente reforçada. Consultar Tuomanen et al., Am. Rev. Respir. Dis, 135, 1987, pp.

869-874. A investigação anterior indicou que a inibição desta inflamação induzida pelo antibiótico se correlaciona com o aumento da morbidez e mortalidade nas situações de meningite; Tuamanen et al., J. Infect. Dis. 155, 1985, pp, 985-990 e Kadurugamuwa, Program and Abstracts of the 27 th ICAA Meeting, p. 205 (1987). Na meningite pneumocócica, por exemplo, a mortalidade pode correlacionar-se directamente com a extensão da inflamação das meninges; McAllister et al., J. Infect. Dis., 132, 1975, pp, 355-360. Portanto, será vantajoso um método para diminuir a inflamação durante o decurso da terapêutica com um antibiótico no tratamento de infecções, particularmente no choque endotóxico e na ARDS associada com a infecção.

De um modo idêntico, será útil provavelmente, um método para diminuir a inflamação associada com ARDS de origem não infecciosa como instrumento terapêutico para os médicos.

Recentemente, foi definida uma molécula na superfície dos PMN que media a adesão ao endotélio. Esta molécula, CD18, é considerada como mediadora da adesão porque (a) os anticorpos monoclonais contra CD18 inibem a ligação dos PMN ao endotélio in vitro, (b) a infecção de anticorpos monoclonais contra CD18, em coelhos, impede a emigração normal dos PMN como resposta a um estímulo inflamatório, (c) os PMN de doentes com uma deficiência genética na expressão de CD18 não conseguem ligar-se às células endoteliais in vitro e (d) os doentes deficientes não conseguem recrutar PMN para os sítios da infecção.

A molécula CD18 tinha sido descrita anteriormente como um receptor para o terceiro componente de complemento, C3bi (Wright et al., PNAS, 80, 1983, pp, 5699-5703. Portanto, um único receptor funciona com duas capacidades, isto é, media a ligação de leucócitos polimorfonucleares (PMN) a células endoteliais a células revestidas C3bi .

Constitui, portanto, um objecto da presente invenção proporcionar um método de inibição do afluxo de leucócitos e particularmente dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) ao pulmão e a outros órgãos durante a sépsia e outros traumas infecciosos ou não infecciosos que consiste na administração de uma quantidade terapêutica de um anticorpo monoclonal anti-CD18 ou do seu fragmento activo, a um doente necessitado desta terapêutica.

Constitui ainda um objectivo desta invenção tratar a inflamação do pulmão e de outros órgãos em doentes com uma inflamação provocada por sépsia ou outros traumas infecciosos ou não infecciosos mediante administração de uma quantidade terapêutica de um anticorpo monoclonal anti-CD18 ou do seu fragmento activo, a um doente necessitado dessa terapêutica.

Outro objectivo da presente invenção é proporcionar um método de tratamento de um doente que sofra de choque endotóxico ou de síndrome de dificuldade respiratória do adulto mediante administração de uma quantidade terapêutica de um anticorpo monoclonal anti-CD18, em que a quantidade de afluxo de PMN ao pulmão é eliminada ou grandemente reduzida.

Ainda um objectivo desta invenção é eliminar ou reduzir o afluxo de leucócitos, particularmente de leucócitos polimorfonucleares (PMN), ao pulmão e a outros órgãos de um doente que está sob administração de uma gente anti-infeccioso para uma doença infecciosa, mediante a administração de uma quantidade terapêutica de um anticorpo monoclonal anti-CD18 ou do seu fragmento activo antes de, simultaneamente ou após a administração de um agente anti-infeccioso, portanto para reduzir ou eliminar a inflamação.

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a um método e a agentes associados e composições para inibir o afluxo de leucócitos ao pulmão e a outros órgãos durante a sépsia ou durante outros traumas infecciosos ou não infecciosos, método que consiste na administração de uma quantidade terapêutica de um agente ou de uma composição que contém um anticorpo anti-CD18 ou que contém um seu fragmento.

É grandemente preferido que os anticorpos anti-CD18 sejam anticorpos monoclonais escolhidos no grupo constituído por anti-CD18 mAb IB4 (designado a seguir por IB4) e anti-CD18 mAb 60.3 (designado a seguir por 60.3) e /ou os seus fragmentos activos. Além disso, a presente invenção diz respeito a um método e a substâncias associadas para inibir a penetração de leucócitos no pulmão ou noutros órgãos nos doentes com choque endotóxico ou com síndrome de dificuldade respiratória do adulto de qualquer etologia,



mediante administração de uma quantidade terapêutica de um anticorpo anti-CD18 ou de um seu fragmento a um doente necessitado desta terapêutica. Os anticorpos mais preferidos são os anti-CD18, também escolhidos no grupo constituído por IB4 e 60.3 e pelos seus fragmentos activos.

A presente invenção também diz respeito a um método e a substâncias associadas para a eliminação e redução da inflamação num doente sob administração de um agente anti-infeccioso para uma doença infecciosa, o qual consiste na administração antes, durante ou após o agente anti-infeccioso de uma quantidade terapêutica de um anticorpo anti-CD18 ou de um seu fragmento. Anticorpos anti-CD18 preferidos são escolhidos no grupo constituído por IB4 e 60.3 e os seus fragmentos. Também se descrevem, formas posológicas que associam um agente anti-infeccioso e uma quantidade terapêutica de um anticorpo monoclonal ou de um seu fragmento.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é um gráfico que representa a percentagem de radioactividade de neutrófilos injectados no pulmão em função do tempo.

A Figura 2 é um gráfico que representa a radioactividade de neutrófilos no sangue em função do tempo. A radioactividade circulante está expressa sob a forma de uma percentagem da radioactividade total injectada.

A figura 3 é um gráfico que representa a radioactividade dos neutrófilos no sangue em função do tempo. Radioactividade circulante está expressa como uma relação do valor ao fim dos 15 minutos iniciais.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA PRESENTE INVENÇÃO

Esta invenção refere-se num primeiro aspecto à inibição do afluxo de leucócitos ao pulmão e a outros órgãos durante a sépsia ou durante outros traumas não infecciosos mediante a administração de uma quantidade terapêutica de um anticorpo anti-CD18 ou de um seu fragmento activo a um doente necessitado dessa terapêutica.

O órgão inflamado que é o alvo da presente invenção, pode resultar de uma variedade de agentes infecciosos, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas assim como vírus, parasitas e fungos ou pode ser de origem não infecciosa, tal como um trauma. Infecções particularmente consideradas são as que são susceptíveis de tratamento com antibióticos beta-lactâmicos tais como Harmophilus influenzae B ; N. meningitides b ; pneumococci, Streptococcus pneumoniae; Escherichia coli; Staphylococcus epidermidis; Staphylococcus aureus; Streptococci do grupo B; Salmonella; Bacillus subtilis; e Pseudomonas aeruginosa.

O órgão inflamado que é o órgão alvo da presente invenção pode ser, correntemente, qualquer órgão susceptível de in-

flamação pelos agentes anteriormente citados. A presente invenção é, contudo, particularmente aplicável ao tratamento do pulmão, do sistema nervoso central, do rim, das articulações, do endocárdio, dos olhos e dos ouvidos, sendo o tratamento do pulmão um aspecto altamente preferido.

Descobriu-se que a presente invenção é utilizável para impedir a penetração de leucócitos no pulmão de memíferos em situação de sépsia. Esta actividade permite que a sua via de administração preferida seja a via endovenosa e que a sua administração seja particularmente útil no tratamento das infecções, incluindo as provenientes de pneumococci, Haemophilus influenzae B, N. meningitides b e Escherichia coli, Streptococcus do grupo B, Staphylococci e Pseudomonas.

Identicamente, a presente invenção também é aplicável à inflamação proveniente de origens não infecciosas, tais como de ARDS provocada por queimaduras, cirurgia, produtos químicos tóxicos, fractura de ossos e outros traumas.

Uma das características dos anticorpos utilizáveis de acordo com a presente invenção consiste na capacidade desses anticorpos para reconhecerem e ligarem-se a um largo espectro de polipeptidos considerados como constituídos por outras proteínas de membrana leucocitária de duas cadeias, de que a cadeia que comporta o receptor CD18 é apenas uma parte. Assim, considera-se que este espectro mais amplo de afinidade possuído pelos anticorpos anti-CD18 da presente invenção é o promotor do seu nível melho

rado e do correspondente espectro de actuação e aplicação.

Os anticorpos anti-CD18 particulares utilizáveis para a prática dos métodos da presente invenção podem ser preparados por técnicas convencionais. O anticorpo IB4 monoclonal preferido está descrito por Wright et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1983, pp. 5699-5703. O anticorpo monoclonal 60.3, outro, anticorpo preferido está descrito por Beatty, et al., J. Immunology, 131, 1983, pp. 2913-2918.

Outros anticorpos monoclonais anti-CD18, assim como os seus métodos de preparação, estão descritos em Leukocyte Typing III, New York, Springer-Verlag 1988.

Em certos doentes, pode existir um problema potencial com a utilização do anticorpo monoclonal murino, tal como IB4 ou 60.3, uma vez que o paciente pode gerar uma resposta imunológica contra o anticorpo monoclonal murino. Este efeito pode ser melhorado ou evitado pela utilização dos fragmentos activos do anticorpo monoclonal de modo a minimizar a quantidade de proteína estranha injectada. Outra alternativa é utilizar técnicas de engenharia genética para preparar um anticorpo quimérico em cuja região de ligação do anticorpo murino IB4 ou 60.3, está ligada com regiões constantes de imunoglobulina humana.

Um outro aspecto da presente invenção é a redução ou eliminação do afluxo de leucócitos ao pulmão, no choque endotóxico ou na síndrome de dificuldade respiratória do adulto associada com a administração de uma agente anti-infeccioso. O método con-

siste na administração, antes, durante ou após o agente infeccioso de uma quantidade terapêutica de um anticorpo monoclonal anti-CD18 ou de um seu fragmento activo, a um doente necessitado desta terapêutica. Anticorpos monoclonais anti-CD18 preferidos são os anticorpos IB4 e 60.3. Devido a um mecanismo da sua actividade terapêutica, os agentes anti-infecciosos e particularmente os antibióticos beta-lactâmicos, provocam inflamação adicional como resultado do seu efeito terapêutico. Ainda que estes agentes anti-infecciosos esterilizem uma dada infecção, eles provocam a libertação de produtos tóxicos, por exemplo, endotoxinas de parede celular e/ou do agente infeccioso. Estes componentes bacterianos iniciam uma resposta inflamatória, frequentemente altamente aguda no pulmão. É esta inflamação que contribui de um modo significativo para a lesão pulmonar que é a consequência a longo prazo de muitas infecções.

Nas doenças inflamatórias, a redução ou eliminação da inflamação, particularmente no choque endotóxico e na síndrome de dificuldade respiratória do adulto, resulta numa diminuição da lesão do órgão que usualmente acompanha estas situações de doença. Uma vez que os anticorpos monoclonais IB4 e 60.3 possuem uma capacidade ímpar de bloquear o deslocamento de leucócitos para o pulmão ou para outros órgãos eles são incomparavelmente apropriados para tratar situações tanto de origens não infecciosas como infecciosas. Agentes infecciosos causadores são, por exemplo, Haemophilus influenza B,N. meningitides b, E. coli, Staphylococci ou a pneumococci tal como Streptococcus pneumoniae. Estas infecções são



geralmente tratadas com um antibiótico aminoglicosídico tal como a gentamicina ou um antibiótico beta-lactâmico como a penicilina ou a cefalosporina. Os aminoglicósidos, penicilinas e cefalosporina tipicamente utilizados no tratamento destas infecções são a cefalotina, a cefaloridina, carbenicilina, ampicilina, nafcilina sódica, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina, metecilina sódica, fenoximetil-penicilina, penicilina procaína G, penicilina benzatina G, penicilina G, cefacetrilo sódico, cefalexina, cefapirina sódica, cefradina, penicilina V, gentamicina, canamicina, cloranfenilcol, cefatoxima, ceftriaxiona, vancomicina e imipenem.

Devido à capacidade dos anticorpos monoclonais anti-CD18 reduzirem ou eliminarem o afluxo de leucócitos ao pulmão e a outros órgãos, nas doenças infecciosas provocadas pela administração de um agente anti-infeccioso, pode associar-se o anticorpo monoclonal anti-CD18 ou um seu fragmento activo numa forma de dosagem unitária única, com o agente anti-infeccioso, por conveniência de administração. Esta forma de dosagem é, de um modo mais preferido, uma forma de dosagem endovenosa, uma vez que a maior parte dos agentes anti-infecciosos, particularmente os antibióticos beta-lactâmicos, são comercializados sob uma forma química apropriada para administração por via endovenosa. Esta é também a via de administração preferida para os anticorpos monoclonais, tais como IB4 e 60.3. Tipicamente, um agente anti-infeccioso e um anticorpo monoclonal podem associar-se numa solução de ampola única. Quando isto não é possível, o agente anti-infeccioso e o anticorpo monoclonal podem ser acondicionadas separadamente e misturados imediatamente

L

antes da infecção. A administração pode ser correntemente através de uma mistura com uma solução endovenosa convencional qualquer, isto é, uma solução de cloreto de sódio normal.

A quantidade de agente anti-infeccioso na forma de dosagem está dependente do agente anti-infeccioso particular utilizado e da infecção a tratar. A quantidade de anticorpo monoclonal a utilizar numa forma de dosagem pode variar entre cerca de 1 e cerca de 1.000 mg, com grande preferência entre 10 e 100 mg por unidade de dosagem. Podem-se administrar as doses uma a quatro vezes por dia, mantendo a terapêutica enquanto persistir a infecção.

O método de administração da forma de dosagem unitária pode, evidentemente, ser alterada pelo médico assistente atendendo à condição do doente e à gravidade da doença infecciosa a tratar.

Os exemplos que seguem ilustram os métodos e composições da presente invenção.

EXEMPLO 1

INIBIÇÃO DE LEUCOCITOS NO PULMÃO

Isolamento de neutrófilos de coelho

A coelhos brancos da Nova Zelândia com (2 a 3 Kg) administrou-se 60 mg/Kg de pentobarbital sódico. Através de uma punção cardíaca retiraram-se 60 ml de sangue com uma seringa heparinizada.

4

zada. centrifugou-se o sangue a 400 x g durante 20 minutos e retirou-se o plasma rico em plaquetas. Este centrifugou-se a 2500 x g durante 15 minutos para fornecer uma fonte de plasma pobre em plaquetas autólogas. Adicionaram-se 8 ml de dextrano 500 a 6% em solução de cloreto de sódio ao aglomerado de glóbulos vermelhos e solução de cloreto de sódio normal para se completar o volume a 50 ml. Deixaram-se sedimentar os glóbulos vermelhos durante 30 a 60 minutos e aspirou-se o plasma rico em leucócitos. Separaram-se os neutrófilos dos leucócitos por centrifugação com gradientes de Percoll-plasma descontínuos (43% a 53%). Aglomeraram-se os neutrófilos e retiraram-se os glóbulos vermelhos restantes por meio de lise com água destilada. Testaram-se todos os reagentes utilizados no processo de isolamento dos neutrófilos relativamente à presença de endotoxina, utilizando-se um ensaio de lisados de limulus e não se usaram quando se observou qualquer contaminação. Identicamente, todo o material de laboratório utilizado estava isento de endotoxina.

Preparação do anticorpo IB4

Preparou-se um anticorpo para o receptor CD11b/CD18 pelo método descrito em Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1983, pp. 5699-5703. Obteve-se o anticorpo a partir de líquido ascético de murganho e purificou-se por cromatografia de afinidade para eliminar todas as proteínas não imunoglobulínicas.

Marcação dos neutrófilos:

Marcaram-se neutrófilos com ^{111}In . Adicionou-se tropolone (4mM em solução de cloreto de sódio normal), em igual volume de cloreto de ^{111}In (Amersham). Adicionou-se ^{111}In -tropolone, gota a gota, aos neutrófilos suspensos no plasma autólogo. Deixaram-se os neutrófilos a incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente e em seguida lavaram-se com plasma autólogo. Com esta técnica, marcaram-se neutrófilos em geral com uma eficiência de marcação superior a 60%. Os neutrófilos isolados e marcados foram ensaiados para quimiotaxia em relação a zimosan opsonizado e para a aderência a monocamadas endoteliais de artéria pulmonar de bovino induzidas por miristatoacetato de forbol. Os neutrófilos mostraram quimiotaxia e aderência normais. Além disso, a aderência induzida por PMA de neutrófilos de coelho para o endotélio vascular de pulmão de bovino pode ser inibida por pré-tratamento com IB4.

Protocolo experimental

Colocaram-se os coelhos em gaiolas de plástico e colocaram-se sob um largo campo de projecção de uma câmara-gama (Dymax, ElScint, Haifa, Israel). A câmara foi equipada com um colimador de orifício paralelo de resolução média de energia média. Colocou-se um tubo endovenoso numa veia marginal da orelha e um tubo arterial na artéria central da orelha do coelho. O coelho re

L

cebeu uma perfusão de neutrófilos marcados e obtiveram-se durante 4 horas imagens dinâmicas da câmara-gama, de 5 minutos. Recolheram-se amostras de sangue arterial de 15 em 15 minutos durante o período de 4 horas. Aos coelhos de controlo não se administrou qualquer pré-tratamento. Quatro horas antes das imagens, tratou-se um grupo de coelhos com endotoxina de E.Coli (100 µg). Tratou-se outro grupo com endotoxina, 24 horas antes das imagens e administrou-se-lhe anticorpo IB4 (0,5 mg/Kg) 20 minutos antes das imagens. Outro grupo de animais não recebeu tratamento com endotoxina, mas foi tratado, 20 minutos antes das imagens, com anticorpo IB4.

Resultados analíticos

Retiraram-se as regiões com interesse em volta dos pulmões, fígado e baço do corpo dos coelhos. Adicionaram-se as contagens destas regiões com interesse, para se obterem curvas do somatório de actividade. As contagens do pulmão, fígado e baço estão expressas como fracções de actividade relativamente ao corpo completo dos coelhos. A actividade das amostras de sangue está expressa como contagens por minuto/grama de sangue e também como a fracção da actividade circulante relativa à actividade total injectada. A significância das diferenças entre grupos foi determinada por análise de variância e pelo teste T de Student, quando apropriado. Os dados do pulmão foram modelados por uma equação de rejeição exponencial de dois compartimentos.

Resultados

A fracção de radioactividade de neutrófilos injectados no pulmão em função do tempo representa-se na Figura 1. Os animais de controlo demonstraram uma rejeição rápida do pulmão com actividade de isótopo no pulmão alcançando 13% após cerca de 90 minutos. A quantidade máxima de actividade nos pulmões dos coelhos de controlo foi de 31%. Nos animais tratados com endotoxina, 4 horas antes do estudo, a quantidade máxima de actividade nos pulmões foi de 41% e a rejeição dos pulmões menor, com 16% de radioactividade de neutrófilos permanecendo no pulmão aos 90 minutos. Com pré-tratamento de 24 horas com endotoxina, observou-se uma resposta ainda superior com cerca de 44% de neutrófilos inicialmente localizando-se no pulmão e com uma rejeição de 18% aos 90 minutos. Quando os animais se administraram com endotoxina 24 horas antes do estudo e com IB4 20 minutos antes do estudo, a actividade máxima no pulmão (18%) era menor tanto no grupo do controlo como no grupo de tratamento de 24 horas com endotoxina. Aos 90 minutos, a rejeição era mais rápida e permanecia nos pulmões 6% de radioactividade neutrófilo. Estes resultados indicam que IB4 impede a retenção de PMN no pulmão após lesão pulmonar induzida por endotoxina.

Resultados no sangue

A radioactividade no sangue foi expressa como uma relação entre o valor experimental e o valor da linha de base aos 15



minutos (ver Figura 2). O grupo de controlo mostra um pequeno aumento da radioactividade no sangue com o tempo, o que provavelmente representa a rejeição de neutrófilos retidos no pulmão. O grupo com endotoxina de 4 horas também exibiu um ligeiro aumento com o tempo, muito semelhante ao do grupo de controlo. O grupo de endotoxina de 24 horas exibiu um grande aumento da radioactividade no sangue ao longo do tempo. O grupo de endotoxina de 24 horas, que também fora tratado com IB4, mostrou um aumento mais rápido da radioactividade no sangue, que estabilizou após cerca de 80 minutos e que em seguida diminuiu gradualmente. A taxa de absorção no grupo da endotoxina de 24 horas e tratado com IB4 apresentou-se como sendo um pouco mais rápida do que a observada no grupo de tratamento de 24 horas de endotoxina isolada.

Os resultados do sangue expressos como a fracção dos neutrófilos perfundidos que estão em circulação representam-se na Figura 3. Os neutrófilos de controlo mostraram um aumento ligeiro, com o tempo, de cerca de 20 a 30% de neutrófilos circulantes após perfusão.

O grupo de endotoxina de 4 horas também mostrou uma quantidade estável mas com cerca de 3% de neutrófilos circulantes durante este estudo. O grupo de endotoxina de 24 horas também exibiu uma quantidade de radioactividade estável ou aumentando gradualmente, ao longo do tempo, com cerca de 8 a 12% de neutrófilos circulantes durante o estudo. O grupo tratado com 24 horas de endotoxina e em seguida com IB4 mostrou um esquema semelhante ao do grupo de tratamento com endotoxina de 24 horas com uma aumento ini



cial e em seguida um patamar gradual com fracções circulantes compreendidas entre 3 e 8%. Estes resultados indicam que o mecanismo através do qual IB4 inibe a retenção de PMN no pulmão não é devido à depuração dos PMN pelo sistema reticuloendotelial.

EXEMPLO 2

COMPOSIÇÕES

Composição endovenosa I

<u>Ingredientes</u>	<u>mg/ml</u>
cefotaxima	250,0
anticorpo IB4 monoclonal	10,0
dextrose USP	45,0
bissulfito de sódio USP	3,2
edetato de disódio USP	0,10
água para injectáveis q.b.p.	1,00 ml

Composição endovenosa II

<u>Ingrediente</u>	<u>mg/ml</u>
ampicilina	250,0
anticorpo 60.3 monoclonal	10,0
bissulfito de sódio USP	3,2
edetato de disódio USP	0,1
água para injectáveis q.b.p.	1,00 ml



Composição endovenosa III

<u>Ingrediente</u>	<u>mg/ml</u>
gentamicina (sob a forma de sulfato)	40,0
anticorpo IB4 monoclonal	10,0
bissulfito de sódio USP	3,2
edetato de disódio USP	0,1
água para injectáveis q.b.p.	1,00 ml

Composição endovenosa IV

<u>Ingrediente</u>	<u>mg/ml</u>
anticorpo IB4 monoclonal	10,0
dextrose USP	45,0
bissulfito de sódio USP	3,2
edetato de disódio USP	0,10
água para injectáveis q.b.p.	1,00 ml

Composição endovenosa V

<u>Ingrediente</u>	<u>mg/ml</u>
anticorpo 60.3 monoclonal	10,0
bissulfito de sódio USP	3,2
edetato de disódio USP	0,1
água para injectáveis q.b.p.	1,00 ml



Tal como se referiu anteriormente, a presente invenção aplica-se ao tratamento de diversos estados de doenças inflamatórias, incluindo doenças infecciosas em que a infecção activa existe em qualquer local do corpo tal como, por exemplo, no caso da meningite. Também se incluem condições tais como inflamações secundárias, quer agudas quer crónicas, que podem ocorrer num sítio de deposição de antigénio que é secundário relativamente a uma infecção primária num sítio distante do corpo e os exemplos das condições específicas incluem também a meningite, assim como a encefalite, artrite, uvecite colite, como a colite inflamatória do intestino doença de Crohn, glomerulonefrite, dermatite e psoríase. Inclui-se ainda a inflamação que resulta de alterações no movimento leucocitário durante a infecção tal como a síndrome de dificuldade respiratória do adulto associada com sepsia.

As outras doenças inflamatórias incluem alterações imunológicas e condições que envolvem ligação/reconhecimento de células T e/ou macrófagos; tais como hipersensibilidade aguda e retardada, doença do hospedeiro versus enxertos; situações auto-imunológicas primárias tais como a anemia perniciosa; infecção relacionada com condições auto-imunológicas tais como a diabetes, melite do tipo I; erupções durante a artrite reumatóide; doenças em que envolvem a diapedese leucocitária, tais como esclerose múltipla; doenças mediadas pelo complexo antigénio-anticorpo, incluindo certos estados infecciosos secundários referidos anteriormente; imuno-supressão; e rejeição de transplantes. A inflamação resultan



te de choque tóxico ou de trauma tal como a síndrome de dificuldade respiratória do adulto e lesão por reperfusão; e situações provenientes de tumores como a discrasia leucocitária e metástases, também se incluem no âmbito da presente invenção.

Além das condições anteriormente referidas, a presente invenção também se aplica à inibição da ligação endotelial dos leucócitos nas situações que não apresentam doença e, em particular, para fins de diagnóstico e terapêutica; tais como abertura iatrogénica do endotélio para impedir a penetração de leucócitos durante a introdução de um corante ou de um reforçante de imagem no tecido ou para permitir a entrada selectiva de um fármaco nas situações de quimioterapia ou para reforçar a recolha de leucócitos nos doentes.

A presente invenção pode assumir outras formas ou ser realizada por outras vias sem se afastar do seu espírito ou das suas características essenciais. A presente memória descritiva é portanto para ser considerada sob todos os aspectos como ilustrativa e não restritiva, sendo o âmbito da invenção definido pelas reivindicações em anexo e todas as alterações que se encontram abrangidas pelo significado e âmbito de equivalência se entendem como abrangidas por ela.

REIVINDICAÇÕES

1.- Método que utiliza um anticorpo anti-CD18, ou um seu fragmento activo, o qual inibe o fluxo de leucócitos no pulmão e em outros órgãos durante a sépsia ou outras infecções ou traumas não infecciosos; e/ou para tratar a inflamação do pulmão e outros órgãos em pacientes com inflamação provocada por sépsia ou outros traumas infecciosos ou não infecciosos; e/ou para eliminar ou reduzir a inflamação em um doente administrado com um agente anti-infeccioso; e/ou para auxiliar a administração de um fármaco a um doente durante quimioterapia, sendo o referido método caracterizado pelo facto de se administrar o referido anticorpo ou o seu fragmento activo em uma quantidade efectiva de até cerca de 1 000



miligramas por unidade de dosagem.

2.- Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de utilizar um anticorpo anti-CD18 mAb JB4, como anticorpo anti-CD18.

3.- Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de utilizar um anticorpo anti-CD18 mAb 60,3, como anticorpo anti-CD18.

4.- Método de diagnóstico caracterizado pelo facto de incluir a introdução de um material marcador em um tecido, a fase de causar a abertura iatrogénica do endotélio para impedir o ingresso de leucócitos no referido tecido, mediante administração no referido endotélio de uma quantidade inibidora de até 1 000 mg por unidade de dosagem de um anticorpo anti-CD13 ou de um seu fragmento activo.

5.- Método de diagnóstico, caracterizado pelo facto de incluir a colheita de uma quantidade de leucócitos de um indivíduo em ensaio, a fase de administração ao endotélio do referido indivíduo em ensaio, antes da colheita dos referidos leucócitos, de uma quantidade de até 1 000 mg por unidade de dosagem de um anticorpo anti-CD18 ou de um seu fragmento activo, eficaz para impedir a ligação de uma quantidade suficiente dos referidos leucócitos,



para proporcionar uma colheita apropriada, dos referidos leucócitos, para a prática com êxito do referido método de diagnóstico.

6.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas utilizáveis para inibir o afluxo de leucócitos no pulmão ou outros órgãos durante a sépsia ou outros traumas infecciosos ou não-infecciosos e/ou tratar a inflamação do pulmão ou de outros órgãos em doentes com inflamação causada por sépsia ou outros traumas infecciosos ou não-infecciosos e/ou eliminar ou reduzir a inflamação em um doente administrado com um agente anti-infeccioso e/ou auxiliar a administração de um fármaco a um doente durante a quimioterapia, caracterizado pelo facto de se misturar uma quantidade eficaz, compreendida entre cerca de 1 e cerca de 1 000 mg, de um anticorpo anti-CD18 ou um seu fragmento activo, como ingrediente activo com um ou mais veículos aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de utilizar como anticorpo anti-CD18 um anticorpo anti-CD18 mAb JB4.

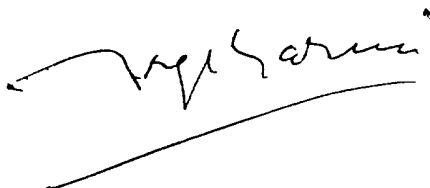
8.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de utilizar como anticorpo anti-CD18 um anticorpo anti-CD18 mAb 60,3.

9.-

4.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de se utilizar um anticorpo monoclonal ou um seu fragmento para ser administrado por via endovenosa,

Lisboa, 23 de Novembro de 1989
O Agente Oficial da Propriedade Industrial



4.

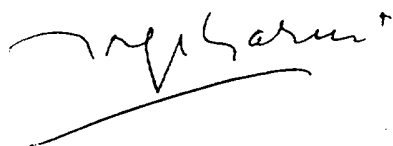
R E S U M O

"Método para inibir o afluxo de leucócitos em órgãos durante a sêpsia e outros traumas mediante utilização de anticorpos anti-CD18"

Refere-se um método para inibir o afluxo de leucócitos no pulmão ou em outros órgãos durante sêpsia ou outros infecciosos ou não infecciosos que utiliza a administração de anti-corpos monoclonais anti-CD18. Esta inibição resulta no impedimento ou na diminuição de danos dos órgãos inflamados e em especial no choque endotóxico ou na síndrome de dificuldade respiratória do adulto.

Também se descreve um processo para a preparação de composições farmacêuticas que contêm como ingrediente activo, os referidos anti-corpos anti-CD18 ou um seu fragmento activo.

Lisboa, 23 de Novembro de 1989
O Agente Único da Propriedade Industrial



1/10

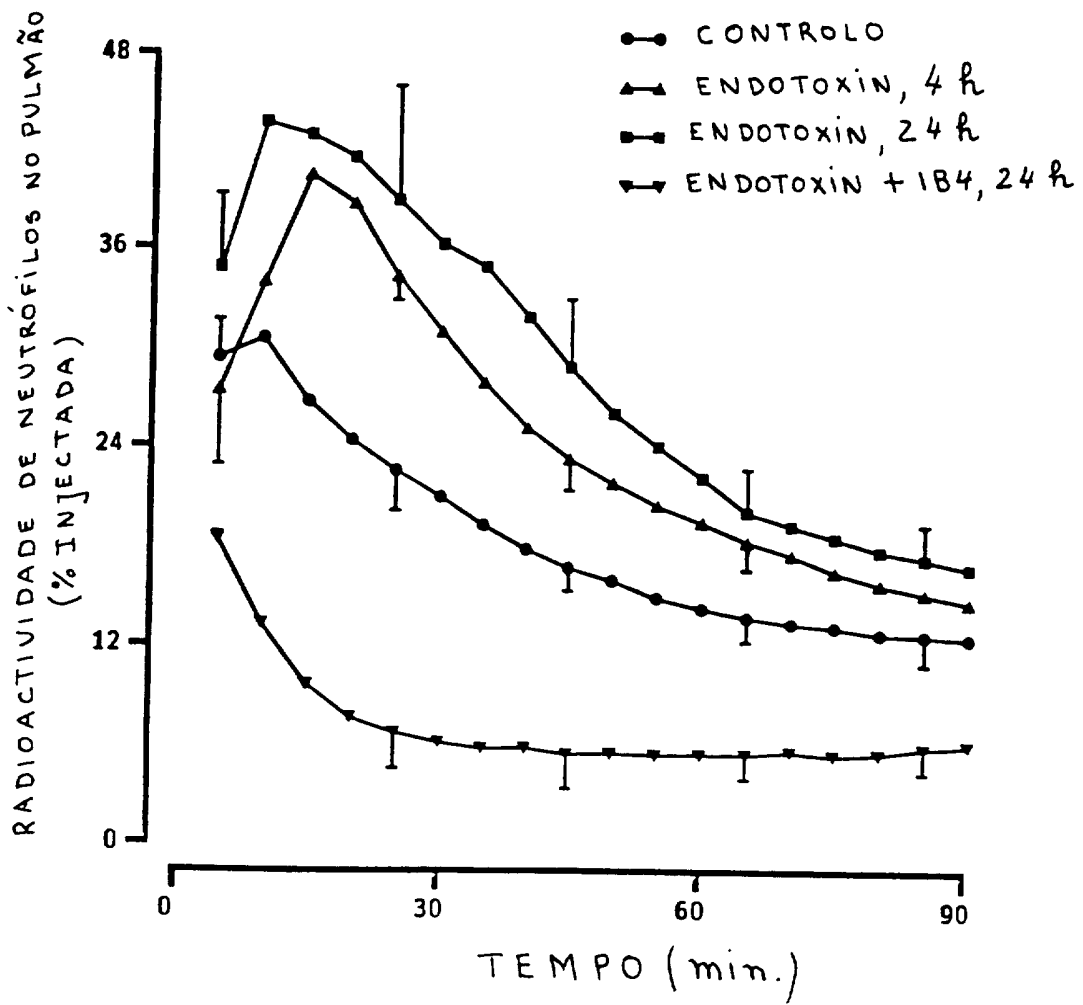


FIG.1

4.

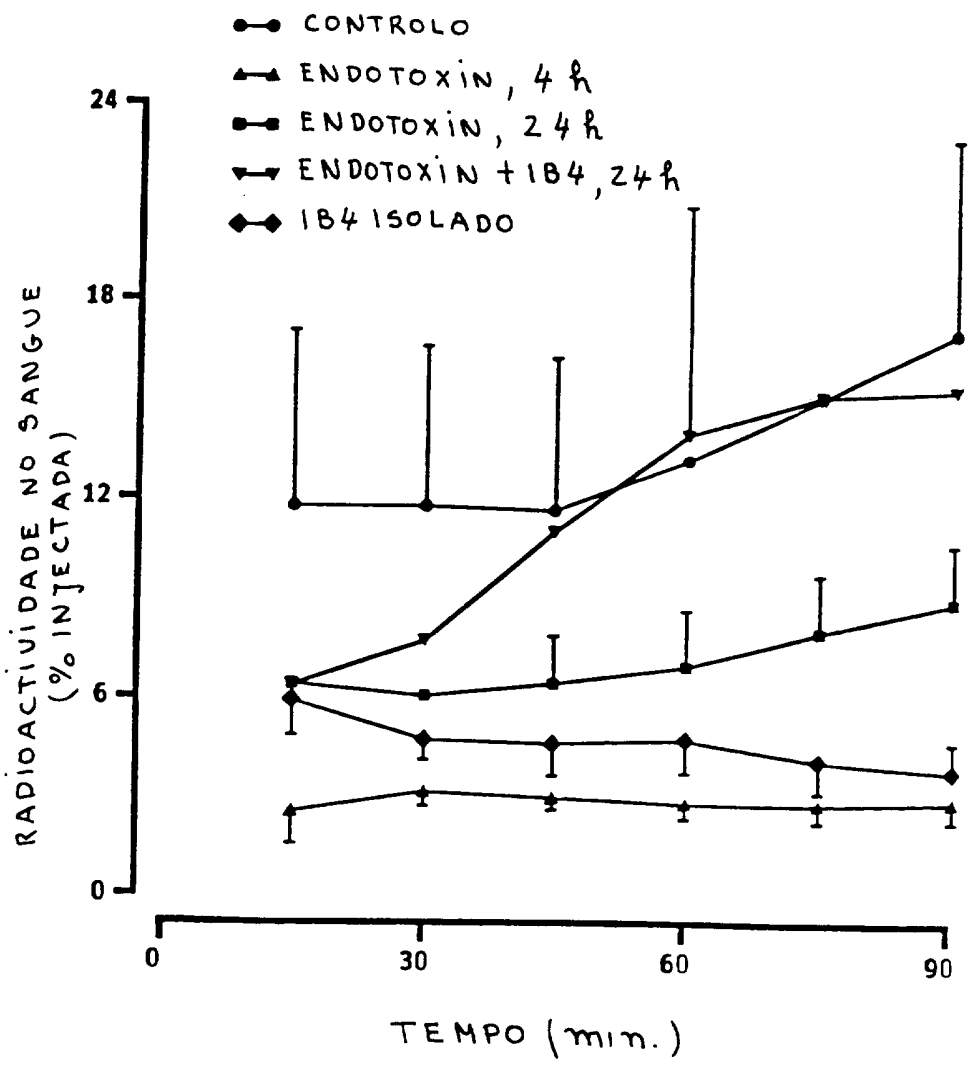


FIG.2

4.

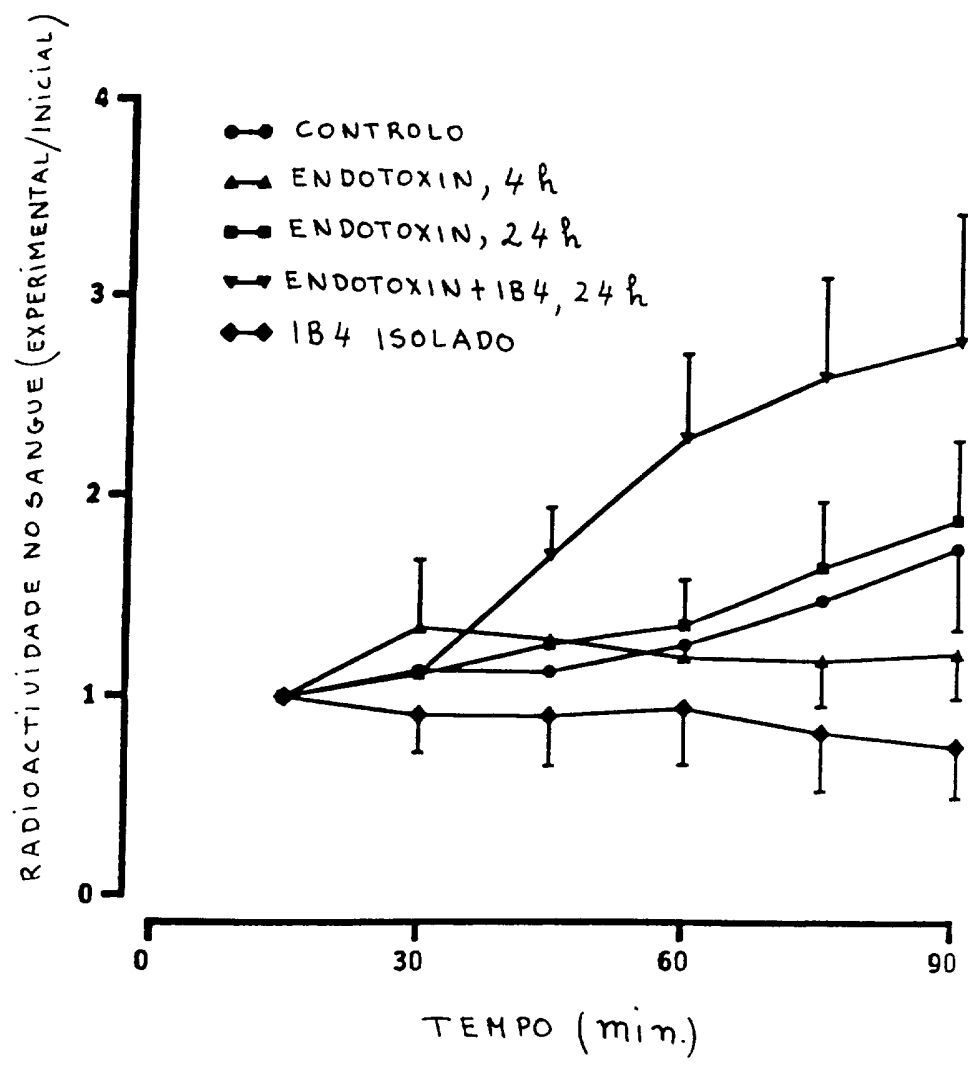


FIG.3