



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 118**

51 Int. Cl.:
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00915762 .9**
86 Fecha de presentación : **11.02.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1165110**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2002**

54 Título: **Antagonistas de HMG1 para el tratamiento de condiciones inflamatorias.**

30 Prioridad: **11.02.1999 US 248574**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73 Titular/es:
**The Feinstein Institute for Medical Research
350 Community Drive
Manhasset, New York 11030, US**

72 Inventor/es: **Tracey, Kevin, J. y
Wang, Haichao**

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 269 118 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

Antagonistas de HMG1 para el tratamiento de condiciones inflamatorias.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención proporciona una composición farmacéutica y un método para el tratamiento de las enfermedades caracterizadas por la activación de una cascada inflamatoria de citoquinas, particularmente la sepsis, incluyendo el shock séptico y el síndrome de angustia respiratorio agudo (*por su siglas en inglés*, ARDS), que comprende el administrar una cantidad efectiva de un antagonista de la alta movilidad, proteína del grupo 1 (HMG1). La presente invención proporciona un método de diagnóstico para monitorear la gravedad de la sepsis y las enfermedades relacionadas, que consta en medir la concentración de HMG1 en suero en un paciente que expone los síntomas de una enfermedad caracterizada por la activación de la cascada inflamatoria de citoquinas. Por último, la presente invención proporciona una composición farmacéutica y un método que provoca la pérdida de peso ó el tratamiento de la obesidad, que consta de administrar una cantidad efectiva de la proteína HMG1 o un fragmento activo terapéuticamente del producto gen HMG1.

Antecedentes de la invención

La sepsis es un síndrome clínico a menudo fatal que se desarrolla después de la infección o la lesión. La sepsis es la causa más frecuente de la mortalidad en pacientes hospitalizados. Los modelos experimentales de sepsis gram negativo basados en la administración de endotoxina bacteriana (lipopolisacáridos, LPS) han dado una mejora en la comprensión de los mecanismos de patogenicidad de la sepsis letal y las enfermedades relacionadas con la sepsis en virtud de la activación común de la cascada inflamatoria de citoquinas. Esta cascada de mediadores de respuesta del hospedero incluye TNF, IL - 1, PAF y otros factores derivados de macrófago que han sido estudiados extensamente como mediadores agudos, tempranos de letalidad eventual en endotoxemia graves (*Zhang y Tracey, The Cytokine Handbook, 3rd ed. Ed. Thompson (Academic Press Limited, USA). 515-547,1998*).

Desafortunadamente los enfoques terapéuticos basados en la inhibición de éstos mediadores individuales “Temprano” de la endotoxemia se conocen que han limitado el éxito de ensayos clínicos prospectivos extensivos contra la sepsis en pacientes humanos. Es posible inferir de estos resultados decepcionantes que los factores que aparecen posteriores a la respuesta del hospedero deberían determinar críticamente la patogénesis y/o letalidad en la sepsis y los trastornos relacionados. Por lo tanto, existe una necesidad de descubrir tales mediadores “Retardados” reconocidos necesarios y/o suficientes como parte de todo el multisistema de la patogénesis extensiva, o de la letalidad de endotoxemia grave, particularmente cuando la endotoxemia esta representada por la sepsis clínica y trastornos clínicos relacionados.

HMG1 es una nucleoproteína cromosomal de 30 kDa que pertenece al grupo de movilidad alta (HMG) de proteínas asociadas por cromatina no histona. Como un grupo, las proteínas HMG se reconocen con estructuras de ADN únicas y han sido implicadas en diversas funciones celulares, incluyendo la determinación de la estructura de nucleosoma y la estabilidad, tanto en la transcripción y/o replicación. Las proteínas HMG fueron caracterizadas por *Johns y Goodwin* primero como componentes de la cromatina con una alta movilidad electroforética en geles de poliacrilamida (ver *The HMG Chromosomal Proteins, E.W. Johns, Academic Press, London, 1982*). Eucariotas superiores presentan tres familias de proteínas HMG: la familia HMG -1/-2, la familia HMG -14/-17 y la familia HMG -I/-Y. Aunque las familias se distinguen por el tamaño y propiedades del ADN - enlazado, son similares en sus propiedades físicas. Las proteínas especies HMG altamente conservadas de un lado al otro lado, ubicuamente distribuido y muy abundante, que se extraen de la cromatina en NaCl 0,35 M y son soluble en 5% de ácido perclórico o tricloroacético. En general, las proteínas HMG se piensan que doblan su ADN y facilitan la unión de varios factores de transcripción y sus secuencias parecidas, incluyendo por ejemplo, el receptor de progesterona, el receptor de estrógeno, las proteínas HOX, Oct1, Oct2 y Oct6. Recientemente, se han puesto en evidencia que un grupo grande y muy diverso de proteínas, incluyendo algunos factores de transcripción y otras proteínas ADN interactuando, contienen una o más regiones similares a HMG1, esta característica ha llegado a ser conocida como contenedor HMG1 o el dominio HMG1. El ADNCs que codifica para HMG1 ha sido clonado desde humanos, rata, truchas, hámster, cerdo y células de ternero, y HMG1 se cree esta abundante en todos los núcleos de células de vertebrados. La proteína esta muy conservada y las secuencias de identidad interespecies en un rango del 80%. En cromatina, HMG1 une las estructuras de ADN enlazante entre nucleosomas y una variedad de estructuras de ADN no- β tales como palíndromos, cruciformas y estructura de lazo, tanto como ADN modificado por cisplatino. El ADN enlazado por HMG1 generalmente se cree una secuencia insensible. HMG1 es preparado más frecuentemente desde núcleos lavados o cromatina, pero la proteína también ha sido detectada en el citoplasma. (*Reviewed in Landsman and Bustin, BioEssays 15: 539-546, 1993; Baxevanis and Landsman, Nucleic Acids Research 23:514-523, 1995*). Hasta la fecha, ningún enlace ha sido establecido entre las proteínas HMG y cualquier estado clínico.

La proteína HMG1 ha sido identificado por otra parte como una proteína unida a heparina expresada abundantemente al desarrollarse el cerebro y doble “Amfoterismo” para su secuencia dipolar, que consta de dos dominios cargados positivamente repetidos en el interior de aproximadamente 80 aminoácidos (HMG1) y un dominio ácido en el C-terminal que contiene un tramo de aproximadamente de 30 residuos de ácido glutámico o aspártico ininterrumpidamente. HMG1/Anfoterina ha sido localizado en la superficie exterior de plasma y en las membranas epitelial, y especialmente en las células neuronales, donde han sido localizada específicamente la filipodia de células neurales.

ES 2 269 118 T3

Los estudios de inhibición han sugerido que HMG1/anfoterina es requerido para la extensión del proceso (neurita) y HMG1/anfoterina puede estar también involucrado en las interacciones de neuronaglia (Merenmies y col., *J. Biol. Chem.* **266**:16722-16729, **1991**; Merenmies y col., *J. Biol. Chem.* **266**:16722-16729, **1991**; Milev y col., *J. Biol. Chem.* **273**: 6998-7005, **1998**; y Salmivirta y col., *Exp. Células Res.* **200**: 444-451, **1992**). HMG1/Anphoterin puede ser desde suero murino, células de eritroleucemia después de la estimulación con el inductor químico hexametenobisacetamida (Melloni y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**:82-89, **1995**). **273**: 6998-7005, **1998**; y Salmivirta y col., *Resolución. Commun.* **210**: 82-89, **1995**). (Melloni et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**:82-89, **1995**). Estudios previos indican que el producto gen del gen HMG1 funciona como un factor de diferenciación aumentado por estimulante PKC (Melloni et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**:82-89, **1995**; and Melloni et al., *FEBS Lett.* **368**:466-470, **1995**).

El producto de gen HMG1 ha sido demostrado que interactúa con plasminógeno y activador del plasminógeno tipo tejido (t-PA) y aumenta efectivamente la generación de plasmina en la superficie de las células, un sistema que se conoce que tiene un rol en la proteólisis extracelular durante la invasión de células y el tejido que remodela. Anfoterina/HMG1 también ha sido demostrado que interactúa con el receptor de glicosilación avanzado de productos terminados (RAGE) (Mohan et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**: 689-696, **1992**; Yamawaki et al., *J. Neurosci. Res.* **44** 586-593, 1996; Salmivirta et al., *Exp. Células Res.* **200**:444-451, 1992; and Vassalli et al., *J. Clin. Invest.* **88**: 1067-1072, **1991**), (Redlitz and Plow, *Baillieres Clin. Haematol.* **8**: 313-327, **1995**; and Parkkinen et al., *J. Biol. Chem.* **266**:16730-16735, **1991**).

En *Biochem. J.*, **1996**, vol. 320, pp. 253-256 se revela un anticuerpo monoclonal anti-HMG1 y su capacidad de inhibir procesos de diferenciación y su uso para investigar la diferenciación de las células eritroleucemia de murino. *Biophys. Res. Commun.*, **1992**, vol. 186, pp. 129 - 134 se revela la encapsulación de la proteína HMG1 con plásmido ADN en liposomas y lo propone como un agente útil en terapia génica de enfermedades renales.

Existe una necesidad mucho tiempo en el arte de la técnica de descubrir agentes mejorados que puedan prevenir la cascada inflamatoria mediada por citoquinas y que tengan una actividad terapéutica en una amplia variedad de enfermedades inflamatorias mediadas por citoquinas. La presente invención fue hecha durante el curso de la investigación para identificar a agentes que median la toxicidad, patogénesis y/o letalidad en la sepsis y otros trastornos relacionados por una común activación de la cascada inflamatoria de citoquinas.

Las enfermedades y enfermedades mediadas por una cascada inflamatoria de citoquinas son numerosas. Tales enfermedades incluyen los siguientes grupos de categorías de enfermedades:

Síndrome Respuesta Inflamatoria Sistémica, incluye:

Síndrome de Sepsis

Sepsis Gram positivo

Sepsis Gram negativo

Sepsis Cultivo negativo

Sepsis Fúngica

Fiebre Neutropénica

Urosepsis

Meningococemia

Trauma hemorrágico

Hums

Exposición a Radiación Ionizante

Pancreatitis Aguda

Síndrome grave respiratorio adulto (ARDS)

Lesión Reperfusión, incluye:

Síndrome Post-pump

Lesión de reperfusión isquémica

ES 2 269 118 T3

Enfermedad Cardiovascular, incluye:

Síndrome de espasmo cardiaco

5 Infarto del Miocardio

Falla del corazón congestiva

10 Enfermedad Infecciosa incluye:

Infección HIV/neuropatía HIV

15 Meningitis

Hepatitis

Artritis Séptica

20 Peritonitis

Epiglotitis Neumonía

25 *E. coli* 0157:H7

Síndrome Hemolítico urémico/Malaria púrpura trombótica trombocitopénica.

30 Fiebre Dengue hemorrágico

Leishmaniasis

Leprosi

35 Síndrome shock Tóxico

Miositis Streptococcal

Gangrena Gas

40 Tuberculosis *Mycobacterium*

Mycobacterium avium intracelulare

45 *Pneumocystis carinii pneumonia*

Enfermedad inflamatoria pélvica

Orchitis/epididimitis

50 Legionella

Enfermedad Lyme

55 Influenza A

Virus Epstein-Barr

Síndrome viral asociado *hemiphagocytic*

60 Meningitis encefalitis séptica viral

Ginecología, Obstetricia, incluye:

65 Premature labor

Miscarriage

ES 2 269 118 T3

Infertilidad

Enfermedades Inflammatorias autoinmune, incluye:

- 5 Artropatias artritis reumatoidea seronegativo
- Osteoartritis
- 10 Inflamatoria intestinal
- Enfermedad sistémica *lupus eitematosi*s
- IridoeyeIitis/uveitistoptic neuritis
- 15 Fibrosis pulmonal idiopática
- Vasculitis Sistémica/Gramilomatosis Wegenr's
- 20 Sarcoidosis
- Procedimiento Orchitis/vasectomia reversa

25 Enfermedades Alérgicas Atópica, incluye:

- Asma
- Rinitis Alérgica
- 30 Eczema
- Dermatitis contacto Alérgica
- 35 Conjuntivitis Alérgica
- Hipersensibilidad neumonitis

40 Malignidad, incluye:

- ALL
- AML
- 45 CML
- CLL

50 Enfermedad Hodgkin's, Linfoma no-Hodgkin's

- Sarcoma Kaposi's
- Carcinoma Colorectal
- 55 Carcinoma Nasofaringe
- Histiocitosis Maligno

60 Síndrome Paraneoplástico/hipercalcemia maligna

- Transplantes, incluyen:
- 65 Rechazo trasplante Organo
- Enfermedad injerto contra hospedero

ES 2 269 118 T3

Cachexia

Congénitas, incluye:

5

Fibrosis enquistada

Linfohistiocitosis familiar hematofagocítica

10

Células de anemia segadora

Dermatológica, incluyen:

15

Psoriasis Alopecia

Neurológica, incluye:

20

Esclerosis Múltiple

Migraña

25

Renal, incluye:

Síndrome Nefrítico

Hemodialisis

30

Uremia

Toxicidad, incluye:

35

Terapia OKT3

Terapia Anti-CD3

40

Terapia Citoquina

Quimioterapia

Terapia por radiación

45

Intoxicación salicilato crónica

Metabólica/Idiopática, incluye:

50

Enfermedad Wilson's

Hemacromatosis

55

Deficiencia antitripsina Alfa-I

Diabetes

Tiroiditis Hashimoto's

60

Osteoporosis

Evaluación Hipotalámica - pituitaria suprarrenal

65

Cirrosis biliar primaria

Resumen de la invención

La invención proporciona una composición farmacéutica que consta de un anticuerpo que se une específicamente a una proteína HMG1 y a un fragmento de esta e inhibe la activación mediada por HMG1 de la cascada inflamatoria de citoquinas. La invención se dirige al uso de un anticuerpo, el cuál se une específicamente a una proteína HMG1 y fragmento de esta e inhibe la cascada inflamatoria de citoquinas para la fabricación de un medicamento, para el tratamiento de las enfermedades caracterizadas también por la activación de la cascada inflamatoria de citoquinas.

En otra realización, el método de invento consta de administrar un segundo agente en combinación con el antagonista HMG1, en el que el segundo agente es un antagonista mediador temprano de la sepsis, como TNF, IL-1 α , IL-1 β , MIF ó IL - 6. Preferentemente, el segundo agente es un anticuerpo para TNF o un receptor antagonista de IL - 1 (IL - 1ra).

La presente invención proporciona un diagnóstico y un método de pronóstico para monitorear la gravedad y predecir el curso clínico más probable de la sepsis y las enfermedades que relacionan a un paciente que presenta shock ó síntomas de riesgo relacionados con enfermedades mediadas por la cascada inflamatoria. El diagnóstico ingenioso y el método de pronóstico consta de medir la concentración de HMG1 en una muestra, preferentemente una muestra de suero, y compara la concentración con un patrón de HMG1 que representa un rango de concentración normal de HMG1 en una muestra semejante, en el que a niveles superiores de HMG1 indican poca probabilidad de ocurrencia de reacciones tóxicas. El método de diagnóstico también puede ser aplicado a otros tejidos o compartimentos de fluidos, como el fluido cerebroespinal o la orina. Para terminar, la presente invención proporciona una composición farmacéutica y un método para provocar pérdida de peso o un tratamiento para la obesidad, que consta de administrar una cantidad efectiva de HMG1 ó un fragmento activo terapéuticamente de esta.

Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 indica dos gráficos que muestran el perfil de inducción de HMG1 liberado por LPS *in vitro* (Figura 1A) e *in vivo* (Figura 1B). Específicamente, Figura 1A muestra la acumulación de HMG1 en los supernatantes de cultivo de células de macrófago RAW 264.7, después del estímulo con LPS (100 ng/mL). El recuadro es un *Western blot* (que usa anticuerpos levantados contra HMG1 recombinante) que indica la inducción de HMG1 liberado desde células RAW 264.7 después de la inducción con TNF. La Figura 1B muestra la acumulación de HMG1 en suero de ratones tratados con LPS. Suero desde ratones Balb/C se colectan a varios tiempos después de la administración de LPS, y se ensayan para HMG1 por *Western blot* usando anticuerpos levantados contra HMG1 recombinante. La Figura 2 ilustra que el HMG1 es un mediador de la patogénesis y letalidad de endotoxemia. La Figura 2A muestra el efecto protector de los anticuerpos anti-HMG1 contra la letalidad de LPS, evaluado en ratones. La administración del antisuero anti-HMG1 en las cantidades indicadas a - 0,5 (si es una dosis), - 0,5 y 12 (si son dos dosis), ó - 0,5, 12 y 36 horas (si son tres dosis) en comparación con el reto de LPS (a tiempo 0) fueron protectora contra la letalidad inducida por LPS, y el esquema de dosis repetidas proporciona una mejor protección. La Figura 2B ilustra que rHMG1 causa la letalidad dependiente a la dosis en ratones endotóxicos. Ratones Balb/C machos (20-23 gramos) fueron aleatorizados en grupos de diez para recibir LPS (3,15 mg/kg; una dosis no letal) individual o conjuntamente con la proteína HMG1 recombinante purificada. La administración de HMG1 a las dosis mostradas 2, 16, 28 y 40 horas después de retar con LPS incrementó significativamente la letalidad por endotoxemia subyacente. La Figura 2C ilustra la toxicidad letal independiente de HMG1 como una función de la dosis. La rHMG1 purificada fue administrada a ratones Balb/C machos (cinco ratones por grupo de tratamiento) como un simple *i.p bolus* a la dosis demostrada. Los ratones fueron observados durante al menos 48 horas, y el 60% de los ratones tratados con rHMG1 a una dosis de 500 μ g/ratón murieron dentro de las 24 horas de retada con rHMG1, demostrando que una dosis simple de LD₅₀, menor de 500 μ g/ratón.

La Figura 3 muestra que HMG1 inducido libera TNF tanto *in vitro* (Figura 3A) e *in vivo* (Figura 3B). Específicamente, la figura 3A muestra que al inducir HMG1 se libera TNF desde huPPBMCs dependiente a la dosis. Recientemente huPBMC aislado de cultivos fueron estimulados con proteína HMG1 recombinante purificada a las dosis indicadas, y el medio de cultivo fue muestreado cuatro horas más tarde en que se ensaya por TNF de acuerdo con métodos inmunológicos conocidos (ELISA). La figura 3A muestra la media \pm S.E.M. en la respuesta de TNF inducida en dos experimentos (por triplicado). La Figura 3B muestra la administración de HMG1 inducida y la acumulación de TNF en suero de ratones tratados. Los ratones Balb/C (20-23 g) fueron tratados intraperitonealmente a las dosis indicadas con HMG1 recombinante purificada y fueron tomadas muestras de sangre dos horas más tarde para ser ensayadas por TNF en un ensayo biológico L929 (niveles de TNF expresados como la media \pm S.E.M., n = 3).

La Figura 4 muestra que HMG1 provoca la pérdida de peso corporal en los ratones. La HMG1 purificada fue administrada intraperitonealmente a los ratones a razón de 100 μ g/ratón/día durante tres días, y el peso corporal fue monitoreado. La Figura 4 indica la media \pm S.E.M. del cambio en el peso corporal neto de tres ratones por grupo.

La Figura 5 indica la distribución de tejido de mRNA HMG1. Las manchas de ARN humanos que contenía poli (A) + ARN de varios tejidos (*Clontech, Palo Alto, CA, USA*) fueron hibridizadas con unos 0,6 kb de digoxigenin-1, 1-dUTP-con HMG1 ADNc sintetizada por PCR usando plásmido recombinante que contiene el inserto HMG1 ADNc, todo de acuerdo con los métodos conocidos en el estado de la técnica. Brevemente, la hibridización fue llevada a cabo con un tampón de hibridación (reactivo de bloqueo 5X SSC/2%/0,1%, SDS/50% de formamida, *Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN*) con una concentración de prueba de 10 μ g/mL durante 16 horas a 65°C. Después de la

hibridación, los filtros fueron sometidos a dos lavados de 0,5X SSC/0,1%, SDS por 5 minutos, y dos lavados de 0,2X SSC/0,1%, SDS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las señales fueron detectadas usando anticuerpos anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa y reactivo de detección cloruro de 4 nitrobluetetrazolium (NBT) y de 5 cromó-
 5 fueron escaneados con un escáner de imagen de plata (*SilverScanner II, Lacie Limited, Beaverton, OR*), y la respectiva densidad óptica (en las unidades arbitrarias, AU) fue cuantificada usando el software de imagen NIH 1.59. Note que altos niveles fueron observados en tejidos ricos en macrófago.

La Figura 6 muestra, una comparación en un grupo de sujetos normal control, los niveles de HMG1 se incremen-
 10 taron en suero humanos como se detecta en los sujetos humanos hospitalizados con sepsis, en el que los pacientes sépticos han sido posterior categorizados como si el paciente murió o sobrevivió.

Descripción detallada de la invención

La presente invención está basada en el descubrimiento y el aislamiento de una proteína de 30 kDa altamente
 15 inducible que es liberada y acumulada en medios condicionados por cultivos con células como macrófago y murino, (RAW 264.7) seguido al estímulo con LPS, TNF, ó IL - 1. Una secuencia de aminoácido parcial de este polipéptido aislado es idéntica a la secuencia de la proteína HMG1, también conocida como anfoterina, una proteína no antes unida a la patogénesis de cualquier enfermedad. Esta información se usa para clonar a un ADNc que codifica para
 20 HMG1, la secuencia se expresa y proporciona la proteína recombinante, esta proteína se usa para generar anticuerpos anti-HMG1 específicos.

La eficacia terapéutica y diagnóstica fue determinada en una serie de experimentos *in vitro* e *in vivo* predictivos. Los experimentos son detallados en la sección de Ejemplos. Por ejemplo, luego de la administración de endotoxina
 25 (LD₁₀₀) a ratones, los niveles de HMG1 en suero se incrementan más tarde (16 h) que los mediadores conocidos "Temprano" de la sepsis (tales como TNF y IL - 1) y niveles de estancamiento de HMG1 fueron mantenidos de 16 a 32 horas. Los pacientes con la sepsis letal tenían niveles HMG1 altos en suero, que no eran detectados en voluntarios sanos normales. Además, la administración experimental aguda de rHMG1 evaluada en animales, ya sea individual o conjuntamente con las cantidades subletales de LPS, que provocan respuestas patológicas notables e incluso la muerte.
 30 Esquemas de dosis más distribuidas de cantidades más bajas de rHMG1 resulta en la pérdida de peso importante en los animales tratados. Estos resultados dan evidencias de que HMG1 es un mediador de endotoxemia y particularmente un mediador tardío, tan opuesto a los mediadores "Tempranos" conocidos como TNF y IL - 1. Estos datos indican la importancia HMG1 en suero, más lejos como un indicador para la gravedad o letalidad potencial de la sepsis y las enfermedades relacionadas.

Además, el tratamiento con anticuerpos anti-HMG1 proporciona la protección completa LD₁₀₀ a la dosis de LPS
 35 en ratones. La HMG1 es inducible por TNF y la IL-1 β , a dosis dependiente estimula la liberación de TNF desde huPBMCs. TNF es un marcador de la activación de macrófago así que es probable (sin la limitación respecto a los mecanismos implícitos por teoría a ser unido) que HMG1 promueve la reactivación hacia abajo de la cascada de citoquina que cambia y media tardíamente la patogénesis y la letalidad en la sepsis y las enfermedades relacionadas que involucran la activación de las respuestas de citoquinas pro-inflamatorias. Por lo tanto, HMG1 ocupa un papel principal probablemente en mediar la respuesta inflamatoria, la infección y la lesión, y los antagonistas de HMG1 son el beneficio terapéutico en la sepsis y las enfermedades relacionadas con la activación de cascada inflamatoria. La aparición de HMG1 en la cascada de citoquinas inflamatoria es apropiada para propagar las fases posteriores de la
 45 respuesta del hospedero y colaborar en la toxicidad y letalidad. Los datos predictivos que proporcionan estos soportan la efectividad terapéutica de los antagonistas de HMG1 y proporcionan evidencias a favor del mecanismo terico de acción del tratamiento mencionado anteriormente. Los datos del tratamiento *in vivo* indica la eficacia de antagonistas de HMG1 en general, y los anticuerpos anti-HMG1 en particular, para el tratamiento de las enfermedades mediadas por la cascada inflamatoria de citoquinas en general y particularmente la que condiciona sepsis, incluyendo el shock, por ejemplo, shock séptico, el síndrome de sepsis u otras afecciones "Sepsis" mediadas por citoquinas inflamatorias. Además, la patogenicidad, toxicidad y letalidad independiente de HMG1 muestra que antagonistas de HMG1 son particularmente efectivos cuando se coadministran con antagonistas de mediadores inflamatorios "Temprano". Como el TNF, MIF, IL - 1 y IL - 6.

En resumen, HMG1 es un mediador de citoquinas de las reacciones inflamatorias porque: 1) HMG1 es liberado
 55 de macrófagos y pituicitos luego del estímulo con toxinas bacterianas o con citoquinas pro-inflamatorias (TNF o IL - 1 β); 2) HMG1 se acumula en suero de animales expuesto a LPS y en pacientes con Sepsis; y 3) los anticuerpos HMG1 específicos protegen contra la mortalidad en un modelo animal de endotoxemia letal predictivo de la sepsis clínica y las enfermedades relacionadas.

Composición farmacéutica y método de administración

La composición farmacéutica ingeniosa o combinación farmacéutica ingeniosa puede ser administrada a un pacien-
 65 te (complejo o combinación) por sí, o en composiciones farmacéuticas donde se mezclan con portadores y excipientes apropiados. La composición farmacéutica ingeniosa o la combinación farmacéutica ingeniosa pueden ser administra- das parenteralmente, como la inyección intravenosa o en inyección, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, o inyección intramuscular. La composición farmacéutica ingeniosa o la combinación farmacéutica ingeniosa pueden ser administradas de forma oral o rectalmente a través de una formulación apropiada con portadores y excipientes para

formar tabletas, comprimidos, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, jaleas, suspensiones y semejante. La composición farmacéutica ingeniosa o la combinación farmacéutica ingeniosa pueden ser administradas tópicamente, tales como parches de piel, para conseguir niveles sistémicos consistentes de agentes activos. La composición farmacéutica ingeniosa o la combinación farmacéutica ingeniosa pueden ser formuladas en la actualidad como, cremas tópicas parches de mucosa o de piel, líquidos o geles apropiados para la aplicación de la piel o superficies de membranas de mucosas. La composición farmacéutica ingeniosa o la combinación farmacéutica ingeniosa pueden ser administradas por inhalador al tracto respiratorio para un tratamiento local o sistémico.

La dosis de la composición farmacéutica ingeniosa o la combinación farmacéutica ingeniosa de la presente invención puede ser determinada por aquellos expertos en el estado de la técnica de esta revelación. La composición farmacéutica o la combinación farmacéutica ingeniosa contendrán una dosis efectiva (dependiendo de la vía de administración y farmacocinética del agente activo) de la composición farmacéutica ingeniosa o combinación farmacéutica ingeniosa y los portadores farmacéuticos apropiados y excipientes, que son apropiados para una vía en especial de administración de la formulación (es decir, oral, parenteral, o por la inhalación). El agente activo es mezclado en la formulación farmacéutica por medio de los procesos de mezclado, disolución, granulación, arrastre, emulsión, condensación, atrapamiento o liofilización. Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen el agente activo en soluciones acuosas o la combinación en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones del agente activo podrían estar preparadas como las suspensiones de inyección aceitosas. Los disolventes lipofílicos apropiados o vehículos que incluyen aceites grasos como aceite de ajonjolí, o esterres de ácido grasos sintéticos, tales como etil oleato o trigliceraldehído, o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas podrían contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, o dextran. La suspensión podría contener estabilizadores o agentes opcionalmente que incrementan la solubilidad del agente activo o la combinación para permitir las soluciones más concentradas.

Las formulaciones farmacéuticas para administración oral pueden ser obtenidas combinando al agente activo con excipientes sólidos, como azúcar (por ej. lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol), preparados de celulosa (por ej. almidón, metilcelulosa, celulosa de hidroxipropilmetil, y carboximetilcelulosa de sodio), gelatina, gomas, o polivinilpirrolidona. Además, un agente desintegrado puede ser añadido, y un estabilizador puede ser añadido.

30 *Olímeros de Detección*

La presente invención proporciona olímeros de detección teniendo una secuencia efectiva para inhibir o bloquear la expresión del gen HMG1 o la secuencia de ARNm. La tecnología de detección, usa oligonucleótidos específicos para inhibir la expresión de productos del gen objetivo, se está desarrollando como una modalidad terapéutica para enfermedades humanas. Algunos criterios de selección son disponibles para contribuir en la optimización de antagonistas de oligonucleótidos de detección. Por ejemplo, es aconsejable seleccionar las secuencias con un 50% o más del contenido de GC. Las secuencias preferidas abarcan el codon de iniciación AUG de la proteína objetivo, pero los sitios en la región de codificación 5' UTR pueden funcionar equitativamente bien. Tales secuencias son en general aproximadamente de 18 - 30 nucleótidos grandes y elegido para sobreponer el codon de iniciación ATG de la secuencia ADNc HMG1 para inhibir la expresión de la proteína. Olímeros más grandes son a menudo encontrados para inhibir el objetivo en mayor grado, indicando que la longitud preferida es aproximadamente 25 mer para el primer oligonucleotido seleccionado como reactivos de detección. Típicamente, tres secuencias de oligonucleotidos son seleccionados con respecto a estos criterios, y comparados por la actividad antagonista de controlar las secuencias de oligonucleotidos, tales como oligonucleotidos "reverso" o ésos en los que sobre cada cuarta base de la secuencia de detección se aleatoriza. Por lo tanto, una secuencia preferida para hacer las secuencias de oligómeros de detección para HMG1 es una secuencia de 25 mer seleccionada para que sobreponga el codon de iniciación ATG (subrayado) de la secuencia ADNc HMG1:

GAGGAAAATAACTAAACATGGCAAAGGAGATCCTAAGAAG

(SEQ ID No. 5)

y tales secuencias de detección preferidas son usadas para construir oligonucleotidos como agentes de detección (y controles apropiados) para una comparación *in vitro* como antagonistas HMG1. Estos datos *in vitro* son predictivos y de utilidad clínica en humanos que usa agentes de detección de diseño comparable. *Anticuerpos dirigidos HMG1*.

Los anticuerpos revelados podrían ser policlonal o monoclonal; pueden ser de fuentes eucariotas cualquier número de humanos, fuentes celulares no humanas, fúngicas o bacterianas. Los anticuerpos pueden ser codificados por genómica o secuencias que codifica en un vector, y pueden ser extraídas HMG1 contra nativa o recombinante o fragmentos de estas con o sin el uso de adyuvantes. Los métodos para hacer anticuerpos, son los métodos y los procedimientos conocidos en el estado de la técnica para generar y producir anticuerpos. En general, neutralizar anticuerpos contra HMG1 (es decir, aquellos que inhiben la actividad biológica particularmente HMG1 con respecto al papel de citoquinas como proinflamatorios) mientras es preferido para las aplicaciones terapéuticas los anticuerpos no neutralizante que podrían ser tan apropiados para las aplicaciones diagnósticas. Los ejemplos de tales anticuerpos útiles se incluyen, pero no son limitados a policlonal, monoclonal, quimérico, simple cadena de varios humanos o anticuerpos clase humanizado, tanto como varios fragmentos de estos como fragmentos Fab y fragmentos fabricados desde sistemas de expresión especializados.

ES 2 269 118 T3

Ensayo de diagnóstico

El ensayo de diagnóstico proporciona aquí el uso de anticuerpos anti-HMG1 que pueden ser policlonal o monoclonal o ambos. El procedimiento de diagnóstico puede ser utilizar las técnicas usuales basadas en anticuerpos para medir las concentraciones del producto gen del gen HMG1 en un fluido biológico. Procedimientos patrones de diagnósticos preferidos son los ensayos de ELISA y las técnicas de *Western*.

Ejemplo 1

10 Identificación de HMG1 como un mediador “Retardado” de endotoxemia

Este ejemplo proporciona los resultados de un experimento para identificar, aislar y liberar factores derivados de macrófago y que tienen un papel en la sepsis y en las enfermedades relacionadas típicas de la actividad inflamatoria de citoquinas. El experimento reportado en este ejemplo examina macrófago murino RAW 264.7, medio de células condicionadas después de la estimulación de cultivos con TNF. Células de macrófago murino RAW 264.7 fueron obtenidas *American Type Culture Collections (ATCC, Rockville, MD, USA)*, y proliferaron en un cultivo bajo de DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino y 1% Glutamina. Cuando la confluencia alcanza 70-80%, el medio se reemplaza por medio OPTI - MEM libre de suero y los cultivos se estimulan con citoquinas pro-inflamatorias (por ej. TNF α o IL - 1) o endotoxina bacteriana (LPS).

Las proteínas liberadas de los cultivos de macrófago estimuladas anteriores fueron examinadas. Específicamente, a diferentes instantes de tiempo, células y medios condicionados con células fueron colectados y separados por centrifugación (3000 rpm, 10 minutos). Proteínas en el medio condicionado se concentran por ultrafiltración sobre membranas de AMICON con *cut off* de 10 kDa (*Amicon Inc., Bevermente, MA, USA*), y fraccionada subsiguientemente por SDS - PAGE, y teñida con color azul de Coomassie (*Coomassie Blue R250 1,25% en metanol 30%/10% ácido acético*). Después de desteñir con metanol 30%/7% ácido acético, la proteína (s) de interés (es decir, aquella que se acumula de forma preferencial en el medio condicionado de cultivo estimulado) se aísla por excisión del gel de SDS - PAGE, y se somete al análisis de secuencia de N-terminal (*Commonwealth Biotechnologies, Inc., Richmond, VA, USA*).

La comparación de análisis de gel SDS - PAGE y el de perfil de proteínas acumulados en el control (sin estimulación TNF) vs TNF - estimulado por células RAW 264.7 mostró una proteína de 30 kDa fuertemente inducible cuya concentración en el medio condicionado de células se aumenta significativamente después del estímulo durante 16 horas. El análisis de secuencia de aminoácido de esta proteína aislada reveló su secuencia N-terminal como **Gly - Lys - Gly - Asp - Pro- Lys - Lys - pro- Arg - Gly - Lys - Met - Ser - Ser** (SEQ ID No.1). Una evaluación de las bases de datos del gen relevante encontró una identificación del 100% a la secuencia de aminoácido N-terminal de HMG1.

Esta data identifica HMG1 como un producto “aparece atrasado” de cultivos de macrófago estimulados por LPS, y por lo tanto como un candidato de mediador pro- inflamatorio. Esta actividad se confirma por la administración de HMG1 recombinante producida de y/o anticuerpos anti-HMG1 en sistemas de modelo animal que son predictivo de las enfermedades clínicas humanas.

Ejemplo 2

45 Fuentes celulares de HMG1

Este ejemplo muestra cuales fuentes de células son capaces de liberar HMG1 en respuesta para TNF, IL - 1 y/o LPS. Las células estudiadas incluyen GH, pituicitos, células de macrófago murino RAW 264.7, células de sangre mononuclear periférica primaria humana (huPBMCs), células T primaria humana, células suprarrenal de rata PC - 12, y células de riñón de rata primaria (Tabla 1). La glándula pituitaria de rata fue obtenida de la línea celular de GH₃ *American Type Cultures (ATCC, Rockville, Md., USA)*, y el cultivo en DEME complementado con suero fetal bovino estadounidense 10% y glutamina 1%. Ser humano PBMCs y células T estaban recientemente separadas del hoyo de sangre donadores y cultivo complementado con RPMI 1640 suero sanos 10% humano como se describió previamente (*Zhang y col., J Exp. Med. 185: 1759-1768, 1997*). Cuando la confluencia llegó a 70-80%, el medio fue reemplazado por OPTI - MEM medio libre de suero y cultivos estimulados con citoquinas proinflamatoria (por ej. TNF α o IL - 1) o endotoxina bacteriana (LPS).

Aunque las células T humanas, células suprarrenales de rata (PC - 12), y células primarias de riñón de ratas contenían células HMG1 asociadas como se demuestra por el análisis de *western blot* de células lisadas en el hoyo usando anticuerpos HMG1 específicos (vea ejemplo 4 abajo), HMG1 no se acumuló significativamente en el medio de estos cultivos después del estímulo con TNF, IL - 1 β , ó LPS (Tabla 1).

65

ES 2 269 118 T3

TABLA 1

Liberación de HMG1 producida desde varios tipos de células

	Tipo de células	Estímulos		
		TNF	IL - 1 β	LPS
5				
10	Células RAW Murino 264.7	Yes	Yes	Yes
	PBMCs humana	Yes	Yes	Yes
	Células primarias T humanas	No	No	No
15	Células suprarrenales de rata PC-12	No	No	No
	Células pituitarias de rata GH ₃	Yes	Yes	No
20	Células primarias del riñón de rata PC-12	No	No	No

TNF, IL - 1 β (concentración efectiva mínima = 5 ng/ml para cada uno) y endotoxina bacteriana (LPS, efectiva mínima = 10 ng/ml) en un tiempo y manera dosis dependiente (Tabla 1). IFN - γ sólo (0 - 200 U/ml) no produce liberación de HMG1 desde ninguna de las células de arriba, pero cuando adicionamos cualquier combinación de TNF ó IL - 1 β , dependientemente la dosis IFN - γ aumenta la liberación de HMG1 desde macrófagos, con un incremento máximo de 3 veces por IFN - γ a una concentración de 100 U/ml. La liberación de HMG1 no es debido a la muerte celular ya que la viabilidad de la célula no se afecta por TNF, IL - 1 β ó LPS, como juzga *trypan blue exclusión* (90-92% \pm 5% viable por el control vs 88 - 95% \pm 4% en presencia de TNF, IL - 1 β ó LPS). La cantidad de HMG1 liberada por pituiticos y macrófagos correlaciona inversamente proporcional con la concentración intracelular de HMG1, como se determina por análisis de *Westren blotting*, indicando que el material liberado es en parte derivada desde la proteína HMG1 asociada a células.

Fuentes potenciales de circulación de HMG1 *in vivo* fueron valoradas por hibridación de un medidor de HMG1 específico para ARNm preparado desde varios tejidos humanos normales (disponible desde fuentes comerciales), con los resultados resumidos en Figura 5. Algunos tejidos macrófago (pulmón, hígado, riñón, pancreas y bazo) presentaban la expresión de ARNm de HMG1 más abundante; los menos fueron observados en glándula pituitaria, médula de hueso, timo, nódulo linfático y glándula suprarrenal. Además de proporcionar la información respecto a la respectiva expresión de HMG1 de distribución para tejido, este estudio indica la pericia y la utilidad de ensayar las secuencias de ácido nucleico en muestras de tejido HMG1 específico.

Ejemplo 3

Administración de HMG1, in vitro e in vivo

Este ejemplo detalla los procedimientos para producir HMG1 por las tecnología de ADN recombinante conocidas. El HMG1 marco de lectura abierto fue amplificado por PCR y clonado en un vector de expresión (pCAL - n). Resumiendo, el marco de lectura abierto ADNc de HMG1 648 bp es amplificado por PCR (94°C 1', 56°C 2', 72°C 45", 30 ciclos) desde 5 ng de cerebro de rata *Quick Clone* ADNc (# 7150-1, *Clontech, Palo Alto, CA, USA*) usando plantillas que contienen las siguientes secuencias, 5'-CCC GCG GAT CCA TCG AGG GAA GGA TGG GCA AAG GAG ATC CTA - 3' (SEQ. ID No. 2), y 5'-CCC GCA AGC TTA TTC ATC ATC ATC TTC T - 3' (SEQ ID No. 3). El producto de PCR 680 bp (4 kg) es digerido con Bam HI y Hind III y clonados dentro de Bam HI/Hind III sitios clonados en el vector pCAL - n (*Stratagen, USA de La Jolla, CA*). El plásmido recombinante fue transformado en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (*Novagen, Madison, WI, USA*), y los clones positivos fueron cribados y confirmados por secuencia de ADN ambas hebras usando kit de secuencia ciclo exterminador *Tag DyeDeoxi* en un equipo de secuenciación fluorescente automatizado ABI 373A (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*)

Expresar HMG1 recombinante, clones positivos se cultivan a 37°C con agitación vigorosa (250 rpm) hasta OD₆₀₀ y alcanza 0,6, cuando se añade IPTG (1 mM). Doce horas después de la inducción de IPTG, las células bacterianas fueron cosechadas por centrifugación (6500 rpm, 15 minutos), y lisadas por ciclos de congelación y descongelación. La fracción soluble en agua fue colectada después de la centrifugación (30 minutos, 12,000 rpm), y la HMG1 recombinante fue purificada en la columna con resina unida a calmodulina como instruye el fabricante (*Stratagen*). Endotoxina bacterianas se retiran del HMG1 recombinante usando Detoxi-gel, gel removedor de endotoxina (*Pierce, Rockford, IL USA*, Catalogo #20344), y contenido de LPS residuales se determinan por el ensayo *Limulus Amebocyte* Lysate (Test LAL, Cat. # 50-64811, QCL - 1000 *Cromogenic LAL, Bio - Whittaker, Inc., Walkersville, MD, USA*). HMG1 recombinante purificada se añade a los cultivos de células mononuclear de sangre periférica humana (HuPBMCs), y los sobrenadantes ensayados para TNF por ELISA 4 horas después del estímulo. El agente neutralizante de LPS *polimyxin B* (10 μ g/ml) se añade simultáneamente con HMG1 recombinante para eliminar el efecto ninguna contaminación

de LPS sobre la liberación de TNF. Adicionalmente HMG1 recombinante derivada fue administrado para evaluar a animales, con o sin el reto adicional endotoxémico de LPS exógeno, para estudiar el potencial de patogenicidad a alto niveles de HMG1 *in vivo* (ver Figura 2B y Figura 2C). En algunos experimentos, muestras de suero fueron aseguradas de animales tratados por HMG1 como los que se ensayan para TNF como se detalla aquí (ver Figura 1B).

El procedimiento de más arriba proporciona HMG1 recombinante como un péptido fusión que consta de 3,0 kDa dominio unida a calmodulina y un sitio de anclaje trombina como una extensión del amino terminal en el registro de la secuencia de péptido HMG1. En algunos experimentos, la identificación de fusión es retirada de una alícuota de proteína recombinante y la bioactividad de la proteína de fusión completa es comparada con el péptido HMG1 anclada; ninguna diferencia importante en bioactividad se nota y en experimentos adicionales (especialmente aquellos que requerían la administración produjeron HMG1 recombinante para animales) típicamente fueron conducidos con la proteína de fusión (no anclada).

Como se demuestra en la Figura 3A y 3B, administración *in vivo* ó *in vitro* de la proteína HMG1 recombinante derivada produce una respuesta de TNF eficiente, confirmando la identificación de HMG1 como un mediador endógeno de LPS derivado de macrófago con la actividad pro-inflamatoria.

Ejemplo 4

Anticuerpos anti- HMG1 e inmunodetección

Este ejemplo proporciona los resultados de los experimentos para generar y usar anticuerpos policlona contra HMG1. En resumen, anticuerpos policlonales contra un oligopéptido le corresponde la secuencia de aminoácido N - terminal de HMG1, o contra HMG1 recombinante purificada. Fue generado en conejos de acuerdo con los procedimientos estandares conocidos en el estado de la técnica. En resumen, ocho copias de un oligopéptido con la secuencia **GKGDPPKKPRGKMSSC** (SEQ. ID No. 4) se fijan radialmente a las dendritas ramificadas de lisina (núcleo inerte inmunogenicamente pequeño. Éstas macromoléculas grandes son inyectadas tres veces de ambas formas subcutáneamente e intradérmicamente (0,5 - 1,0 mg por inyección) en conejos a las semanas 1, 2, y 4 después de extraer sangre en el día 0. Dos semanas después de la última inmunización, los conejos se le extraen sangre y amplifican intramuscularmente con 1,0 mg de antígeno, seguido por una segunda extracción de sangre dos semanas después. Por otra parte, para producir anticuerpos policlonales contra HMG1 recombinante, los conejos fueron inmunizados con péptido de fusión HMG1 recombinante (100 µg por inyección) siguiendo un protocolo similar. Anticuerpos monoclonales reactivos contra HMG1 (es decir, que se une, y en algunos casos se neutraliza o se antagoniza con la actividad biológica HMG1) son convenientemente preparados de acuerdo con los métodos conocidos en el estado del arte usando el antígeno HMG1 descrito aquí o los otros fragmentos del péptido HMG1 como inmunógenos. Tales anticuerpos monoclonales, y/o los hibridomas que los causan, son efectivos para producir anticuerpos "Humanizados" varios reactivos contra HMG1 (todos de acuerdo con los métodos conocidos en el estado de la técnica), que los anticuerpos humanizados son útiles como se enseña aquí.

Los anticuerpos específicos HMG1 fueron usados para medir la liberación de HMG1 producido por el análisis de *western blot* desde células RAW 264.7 después del tratamiento con TNF o LPS (Figura 1). Brevemente, las proteínas fueron fraccionadas por SDS - PAGE sobre un gel de gradiente 4-20%, transferido a una membrana de PVDF, y manchado con antisuero de conejo levantado contra cualquier antígeno sintético HMG1 del N-terminal o contra HMG1 recombinante. La señal fue detectada usando un equipo ECL como es instruido por el fabricante (*Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, IL, USA*), y los niveles de HMG1 fueron determinados midiendo la densidad óptica de las bandas sobre el *western blot* digitalizados para análisis usando software de imagen NIH 1.59, con referencia a una curva estándar de HMG1 recombinante purificado.

La proteína No HMG1 fue detectada en medio condicionado de células RAW 264.7 en ausencia de tratamiento con TNF o LPS, pero HMG 1 acumulado a altos niveles en medios condicionados después de tal estimulación, alcanzan un período de estancamiento entre 8-28 horas después de la estimulación (Figura 1A). En resumen, los datos presentados en los Ejemplos 1, 3 y en la Figura 1A muestran que la liberación de HMG1 de macrófagos es un estímulo específico y dependiente a la dosis y tiempo, con la acumulación máxima observada dentro de 8 horas después del estímulo con TNF a concentraciones tan bajas como 5 ng/ml. Es bien apreciado que la sepsis, el shock séptico y las enfermedades relacionadas pueden ocurrir en seres humanos en respuesta a los estímulos que difieren cualitativamente o cuantitativamente desde bolus de LPS letales y grandes usan este modelo predictivo. Sin embargo, endotoxemia experimental ha sido un sistema de modelo predictivo y valioso por lo que identifican componentes críticos de la cascada inflamatorias de citoquinas y por lo que se identifican antagonistas específicos con utilidad clínica predictivo. Con respecto a esto, los antagonistas de HMG1 son quizás más terapéuticamente atractivos que los antagonistas de TNF en vista de la aparición posterior de HMG1 contra TNF en la respuesta a endotoxina.

Ejemplo 5

Detección HMG1 en modelos de animal in vivo

Este ejemplo ilustra un experimento *in vivo* en roedores que mide niveles de HMG1 en suero después de la administración de una dosis subletal de LPS (LD₅₀). Ratonos o ratas fueron tratados con LPS, y el suero fue colectado a diferentes tiempos, y ensayados los niveles de HMG1 por análisis de *western blot*. Las concentraciones de HMG1 en

ES 2 269 118 T3

siero fueron calculadas midiendo la intensidad óptica de la banda con una referencia a una curva estandar de HMG1 purificado. Niveles de suero aumentan significativamente por 16 horas después de LPS, y se mantienen altos durante al menos 32 horas (Figura 1B), y no fue detectado en animales control tratados con el vehículo. Estos datos muestran que HMG1 representa una meta particularmente atractiva para el diagnóstico, y la intervención farmacéutica contra, la sepsis y los trastornos relacionados de la toxicidad de citoquinas porque HMG1 es un mediador que aparece retrasado en la cascada inflamatoria de citoquinas.

Ejemplo 6

Beneficios de Protección contra HMG1

El ejemplo proporciona los resultados predictivos, ensayos *in vivo* para medir la actividad terapéutica de antagonistas HMG1 en relación con el tratamiento de la sepsis y las enfermedades relacionadas a la toxicidad mediada por citoquinas. En este ejemplo, el antagonista de HMG1 es una preparación de anticuerpo anti-HMG1. Los controles tratados con suero pre-inmunizado desarrollan letargo, pilo erección, diarrea, y sucumbieron a la muerte dentro de las 48 horas. Estas señales clínicas de endotoxemia fueron significativamente prevenidas por la administración de anticuerpos anti-HMG1. Ratonos Balb/C machos (6-7 semanas, 20-23 gramos) fueron agrupados aleatoriamente (10 animales por grupo) y pretratados cualquiera con el control (pre-inmunizado) o el suero anti-HMG1 (como se hace en el Ejemplo 4) 30 minutos antes de la administración (intraperitonealmente) de una dosis letal de LPS (50 mg/kg 1X PBS). Otros grupos experimentales recibieron dosis adicionales de suero anti-HMG1 a +12 ó, +12, + 36 horas después de administración de LPS. Los animales fueron observados por la aparición y la supervivencia durante al menos dos semanas.

Anticuerpos policlonales contra HMG1 recombinante fueron generados en conejos, y los antisuero se ensayan para la especificidad y título por ELISA y procedimiento de *western blot*. El antisuero policlonal reconoce inmunoespecíficamente HMG1 recombinante (atado a) en análisis de *western blot*, por ejemplo, y discriminar HMG1r tanto desde otras proteínas en un crudo de lisados bacterianas como de una proteína purificada que había estado diluido en el suero de ratón. Usando métodos de detección amplificados como químicoiluminiscentes y análisis de *western blot*, con antisuero policlonal anti-HMG1 a diluciones hasta 1:1000 son útiles para detectar tan poco como 50 pg de proteína rHMG1. La administración de antisuero anti-HMG1 indicada (Figura 2A) a las cantidades - 0.5 (una dosis), 0.5 y 12 (dos dosis), o - 0.5, 12 y 36 (tres dosis) horas respectivo al desafío con LPS (tiempo 0) es protectora contra la letalidad inducida por LPS, y el esquema de dosis repetidas proporciona mejor protección.

Figura 2B ilustra que rHMG1 causa letalidad a dosis dependiente en ratones endotóxicos. Los ratones Balb/C machos (20-23 gramos) reciben aleatoriamente en grupos de diez LPS (3.15 mg/kg; una dosis no-letal) individual o conjuntamente con proteína HMG1 recombinante purificada. La administración de HMG1 a las dosis demostradas que 2, 16, 28 y 40 horas después de desafío de LPS significativamente incrementa la letalidad de la endotoxemia fundamental.

Figura 2C ilustra la toxicidad letal independiente de HMG1 como una función de la dosis. HMG1r purificado fue administrado a ratones Balb/C machos (cinco ratones por grupo de tratamiento) como un solo bolus i.p. en la dosis demostrada. Ratonos fueron observados durante al menos 48 horas, y el 60% de ratones tratados con rHMG1 a una dosis de 500 μ g/ratonos se mueren dentro de las 24 horas de desafío con rHMG1, demostrando una sola dosis LD₅₀, menores que 500 μ g/ratonos.

La protección conferida por anticuerpos anti-HMG1 fue específica, debido a la administración del suero preinmunizado, lo que indica reactividad no inmunoespecífica a HMG1 en *western blot*, no dispone de sujetos de mortalidad mediada por LPS (Figura 2A). Además anticuerpos específicos HMG1 no se entrecruzan y reaccionan con otras citoquinas derivada de macrófago (por ejemplo IL - 1 y TNF), eliminando la posibilidad de que anticuerpos confieran la protección y así neutralizar a estos mediadores. La protección contra la sepsis, la patogénesis asociada a la sepsis y las enfermedades relacionadas con la sepsis, que involucra la activación de cascadas pro-inflamatoria de citoquinas puede ser mejorada por la combinación de la terapia dirigida contra más de un componente de la cascada de citoquinas. Los antagonistas HMG1 con respecto a esto pueden ser combinados con antagonistas específicos de TNF, IL - 1, MIF y otros mediadores inflamatorios, o en general con más antagonistas activos de las respuestas inflamatorias que inhiben componentes múltiples para de la cascada inflamatoria (por ej. aspirina, NSAIDS esteroides anti-inflamatorios, etcétera), para proporcionar aún más modalidades terapéuticas efectivas. La protección contra la toxicidad de LPS fue el anticuerpo a dosis relacionada y más frecuentemente dosificando cantidades más altas de anticuerpo reduciendo la mortalidad por hasta 70% (Figura 2A). Ratonos fueron observados al menos 2 semanas en todos los experimentos y mortalidad no atrasada ocurre, demostrando que anticuerpo anti-HMG1 en el tratamiento otorga la protección duradera contra la letalidad de LPS, y simplemente no retrasa el tiempo de la muerte.

Ejemplo 7

Enfermedad HMG1 en humanos

Este ejemplo proporciona los datos que establecen una asociación entre HMG1 y la sepsis humana, y respaldan una indicación para usar antagonistas HMG1 generalmente y anticuerpos anti-HMG1 en particular en la sepsis humana y las enfermedades relacionadas con la toxicidad de citoquinas. Niveles de HMG1 en suero de personas individuales

sanas normales y pacientes gravemente enfermos fueron medidos usando los anticuerpos policlonal generados como en el Ejemplo 4 en un formato de *western blot* con la referencia a una curva estandar de rHMG1. HMG1 no se detecta en los controles normales, pero se acumuló a niveles altos en 30 pacientes gravemente enfermos con sepsis (Tabla 2).

TABLA 2

Aparición de suero de HMG1 en pacientes con sepsis.

Pacientes	Edad (años)	HMG1 (ng/ml)	Diagnóstico	Resultante
1	27	<d.l.	Normal	Saludable
2	34	<d.l.	Normal	Saludable
3	35	<d.l.	Normal	Saludable
4	36	<d.l.	Normal	Saludable
5	61	<d.l.	Normal	Saludable
6	31	<d.l.	Normal	Saludable
7	55	10	Sepsis, fuga anastomotica	Recuperado
8	70	7-20	Sepsis, perforación colonia	Recuperado
9	44	10-60	Sepsis, MOF, reconstrucción espinal	Muerto
10	60	> 120	Sepsis, MOF, úlcera gástrica perforada	Muerto
11	47	> 120	Sepsis, MOF, neumonia	Muerto

Nota: <d.l. – límite detección por debajo, MOF – Fallo múltiple órgano

Estos datos muestran que los niveles elevados de HMG1 en suero son observados en pacientes con sepsis, y los niveles más altos de HMG1 en suero son observados en casos letales (Tabla 2). Estos datos demuestran la importancia terapéutica de antagonistas de HMG1 en la sepsis y también proporcionan evidencias para la utilidad en el diagnóstico de un ensayo para la sepsis y la gravedad (es decir, potencial de letalidad) de la sepsis midiendo las concentraciones de HMG1 en suero. Este ensayo de diagnóstico también es útil para diagnosticar la gravedad de las enfermedades relacionadas que involucra la activación de la cascada inflamatoria de citoquinas.

Sujetos adicionales fueron protegidos por niveles de HMG1 en suero en asociación con la sepsis letal vs no-letal, con los resultados (acumulativo con Tabla 2) como se describe en Figura 6. Los datos resumidos de muestras de suero obtenidas en la figura 6 representan ocho sujetos sanos y veinticinco pacientes sépticos infectados con gram positivo: *Bacillus fragilis* (1 paciente), *Enterococcus faecalis* (1 paciente), *Streptococcus pneumonia* (4 pacientes), *Listeria monocytogenes* (1 paciente), o *Staphylococcus aureus* (2 pacientes), Gram negativo [*Escherichia coli* (7 pacientes), *Klebsiella pneumonia* (1 paciente), *Acinetobacter calcoaceticus* (1 paciente), *Pseudomonas aeruginosa* (1 paciente), *Fusobacterium nucleatum* (1 paciente), *Citrobacterfreundii* (1 paciente)], o agentes patógenos no identificados gram negativo. El suero fue fraccionado por electroforesis de gel SDS - PAGE, y los niveles HMG1 fueron determinados por el análisis *western blot* con referencia a la curva estandar de rHMG1 purificado diluido en el suero humano normal. El límite de detección por el análisis de *western blot* es 50 pg. Note que HMG1 no es detectable en los controles normales, pero significativamente aumenta en pacientes sépticos. El nivel medio de HMG1 en suero de pacientes sépticos no-sobrevivientes (pacientes n = 13, nivel medio de HMG1 83,7 ± 22,3 ng/ml) es significativamente más alto que en supervivientes (n = 12, nivel medio de HMG1 25,2 ± 15.1 ng/ml, P < 0,05). Estos datos proporcionan la evidencia directa de la conveniencia de tejido cribado (incluyendo sin la limitación de sangre o suero) muestras para secuencias de HMG1 (proteína o ácidos nucleicos) como un indicador de diagnóstico y pronóstico de la presencia de la sepsis y los trastornos relacionados con la activación de citoquinas y la gravedad y el curso clínico probable de tales enfermedades y enfermedades.

Ejemplo 8

Inducción de mediadores proinflamatorios HMG1 y pérdida de peso

Los resultados actuales proporcionan evidencias que HMG1 es un elemento mediador liberado con retraso de la cascada inflamatoria de citoquinas. Adición de HMG1 recombinante para células de sangre mononuclear primaria periférica humana conduce a la inducción dosis dependiente de TNF dentro de las cuatro horas después del estímulo (Figura 3A). Esta estimulación por HMG1 recombinante libera TNF por HuPBMCs que no fue contaminada por LPS debido a: (i) HMG1 recombinante purificada no fue contaminada por LPS juzgado por el ensayo de endotoxina LAL; ii) la adición de agentes neutralizante de LPS *polimyxin B* no afectó la inducción de HMG1 y liberación de TNF y iii) la división proteolítica de preparaciones de HMG1 recombinante con tripsina suprime la actividad de liberación de

ES 2 269 118 T3

TNF completamente para los cultivos de PBMC. La estimulación de HMG1 también induce macrófagos para liberar óxido nítrico (NO).

5 Para confirmar que HMG1 induce suero que libera TNF *in vivo*, HMG1 recombinante purificado fue administrado intraperitonealmente a ratones Balb/C, y muestras de sangre son colectadas para ser ensayadas para TNF por el ensayo L929. Como se muestra en figura 3B, TNF no es detectable en el suero de animales control, pero se aumenta significativamente después de dos horas de la administración de proteína HMG1 recombinante.

10 La administración repetitiva del producto gen recombinante del gen HMG1 (100 μg /ratón/día) causa la pérdida importante de peso corporal en ratones (Figura 4). Sin la limitación respecto al mecanismo y sin estar avalado por teoría, estos datos son compatibles con la hipótesis de que HMG1 actúa como un estimulador delantero de la cascada proinflamatoria bajo las enfermedades tanto *in vitro* e *in vivo*. Éstos datos *in vivo* en un modelo predictivo de pérdida de peso también proporcionan evidencias predictivas de que una formulación farmacéutica que consta de HMG1, o un fragmento de ella activo terapéuticamente, es una terapia efectiva para pérdida de peso.

15 Ejemplo 9

Fuentes in vivo de HMG1

20 Los niveles de HMG1 en suero en hipofisectomizados contra ratas control también son medidos por cuantificación de la intensidad por *western blot* como se describe arriba. Existen niveles de HMG1 significativamente altos dentro de 12 horas después del reto endotóxico (LPS 1,0 mg/kg) en ratas hipofisectomizadas (aproximadamente 75 ng/ml) cuando comparamos con controles (aproximadamente 25 ng/ml). Estos resultados indican que pituicitos no son la fuente más importante de niveles de HMG1 en suero y que los macrófagos pueden tener un papel cuantitativamente más importante.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un antagonista de HMG1 que inhibe la activación mediada por HMG1 de la cascada inflamatoria de citoquinas para ser usada como un fármaco, en el que el antagonista es seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo que se une específicamente a una proteína HMG1 o fragmento de ésta y una secuencia de gen de detección HMG1.
2. Un antagonista como se reivindica en la Reivindicación 1, que es un anticuerpo que se une específicamente a una proteína HMG1 o fragmento de ésta.
- 10 3. Un anticuerpo como se reivindica en la Reivindicación 2, que es policlonal o monoclonal.
4. Un antagonista como se reivindica en la Reivindicación 1, que es una secuencia de detección del gen HMG1.
- 15 5. Una composición farmacéutica que consta:
- (a) de un antagonista de HMG1 que inhibe la activación mediada por HMG1 de la cascada inflamatoria de citoquinas, en el que el antagonista es seleccionado del grupo que consta de un anticuerpo que se une específicamente a una proteína HMG1 o fragmento de ésta y a una secuencia de detección del gen HMG1; y
- 20 (b) de un antagonista de TNF, IL - 1 α , IL-1 β , MIF o IL - 6.
6. La composición farmacéutica de la Reivindicación 5, en que el componente (a) es un anticuerpo que específicamente se une a una proteína HMG1 o a un fragmento de ésta.
- 25 7. La composición farmacéutica de la Reivindicación 6, en el que el anticuerpo es policlonal o monoclonal.
8. La composición farmacéutica de la Reivindicación 5, en que el componente (a) es una secuencia de detección del gen HMG1.
- 30 9. La composición farmacéutica de una cualquiera de las Reivindicaciones 5 a 8, en el que componente (b) de la composición es un anticuerpo para TNF o un antagonista del receptor de IL - 1 (IL - 1ra.).
- 35 10. Uso de un antagonista de HMG1 que inhibe la activación mediada por HMG1 de la cascada inflamatoria de citoquinas, en el que el antagonista se selecciona de un grupo que consta de un anticuerpo que específicamente une a la proteína HMG1 o fragmento de ésta y a una secuencia de detección del gen HMG1, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una condición **caracterizada** por la activación de la cascada inflamatoria de citoquinas, en el que dicha condición se selecciona de un grupo que consta de sepsis, pancreatitis aguda, síndrome de agonía respiratoria adulto, lesión de reperfusión, enfermedad cardiovascular, peritonitis, artritis reumatoidea, osteoartritis, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematoso sistémico, asma, rechazo de trasplante de órgano, enfermedad de injerto desde hospederos, cachexia, fibrosis quística, soriasis y esclerosis múltiple.
- 40 11. El uso como se reivindica en la Reivindicación 10, en el que el antagonista es un anticuerpo que se une específicamente a una proteína HMG1 o a un fragmento de ésta.
- 45 12. El uso como se reivindica en la Reivindicación 11, en el que el anticuerpo es policlonal o monoclonal.
13. El uso como se reivindica en la Reivindicación 10, en el que el antagonista es una secuencia de detección del gen HMG1.
- 50 14. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones de 10 hasta 13, en el que la condición es sepsis.
15. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones de 10 hasta 13, en el que la condición es lesión de reperfusión.
- 55 16. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones de 10 hasta 13, en el que la condición es la artritis reumatoidea.
17. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones de 10 hasta 13; en el que la condición es esclerosis múltiple
18. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones de 10 hasta 13, en el que la condición es enfermedad cardiovascular
- 60 19. El uso de la reivindicación 18, en el que la enfermedad cardiovascular es seleccionada del grupo que consta de síndrome de espasmo cardíaco, infarto del miocardio y fallo congestivo del corazón.
- 65 20. El anticuerpo de la Reivindicación 2 o la Reivindicación 3, o la composición farmacéutica de la Reivindicación 6 o la Reivindicación 7, en el que el anticuerpo que inhibe HMG1 media la activación de la cascada inflamatoria de citoquina es seleccionado del grupo que consta de un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de simple cadena, un anticuerpo humano y un anticuerpo humanizado.

ES 2 269 118 T3

21. El anticuerpo de la Reivindicación 2 ó la Reivindicación 3, ó la composición farmacéutica de la Reivindicación 6 ó la Reivindicación 7, en el que el anticuerpo que inhibe HMG1, la activación mediada por la cascada inflamatoria de citoquinas que se puede unir a un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos **GKGDPPKKPRGKMSSC** (SEQ ID No.4).

5

22. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 20 y 21, ó la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 20 y 21, en el que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

23. El anticuerpo ó la composición farmacéutica de la Reivindicación 22, en el que el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.

10

24. El uso de la reivindicación 11 ó la Reivindicación 12, en el que el anticuerpo es seleccionado del grupo que consta de un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de simple cadena, un anticuerpo humano y un anticuerpo humanizado.

15

25. El uso de la reivindicación 11 ó la reivindicación 12, en el que el anticuerpo puede unirse a un péptido que consta de la secuencia de aminoácido **GKGDPPKKPRGKMSSC** (SEQ ID No.4).

20

26. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 11, 12, 24 y 25, en el que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

27. El uso de la Reivindicación 26, en el que el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

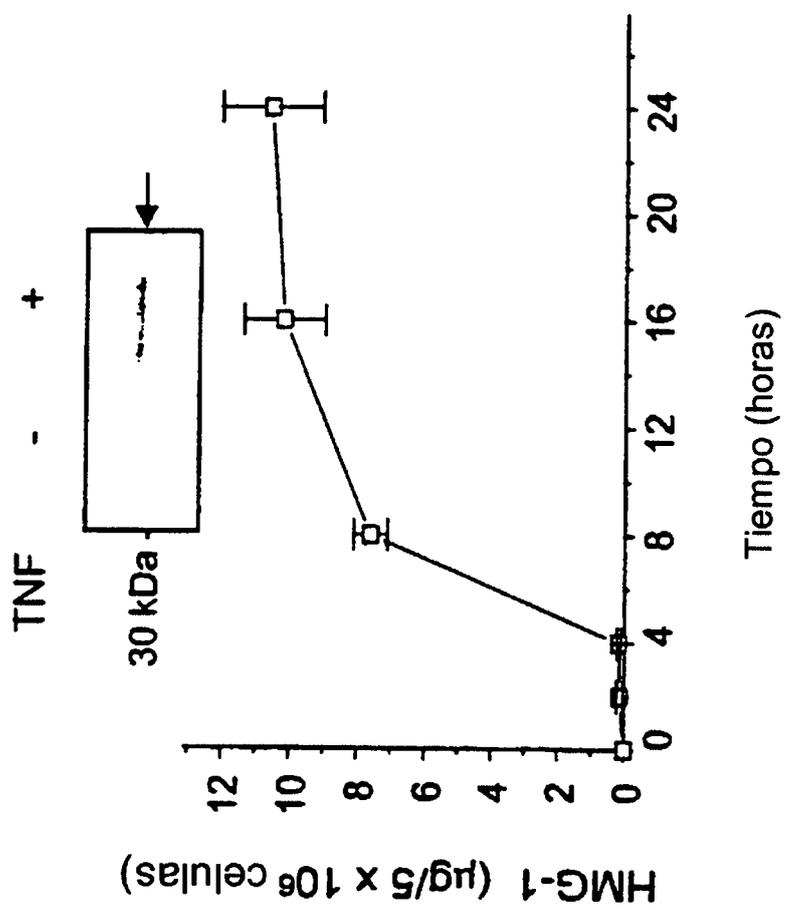


Fig. 1a

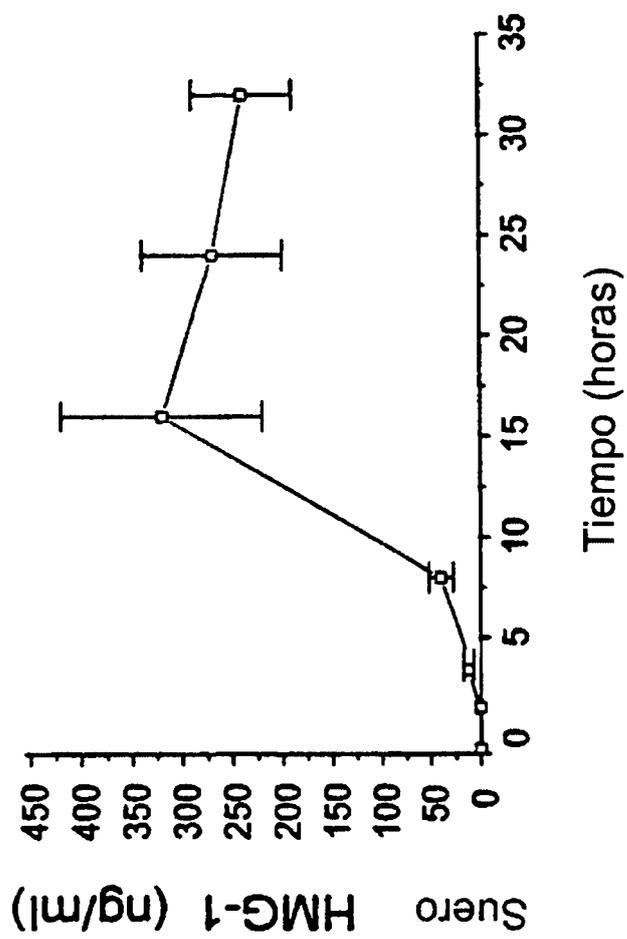


Fig. 1b

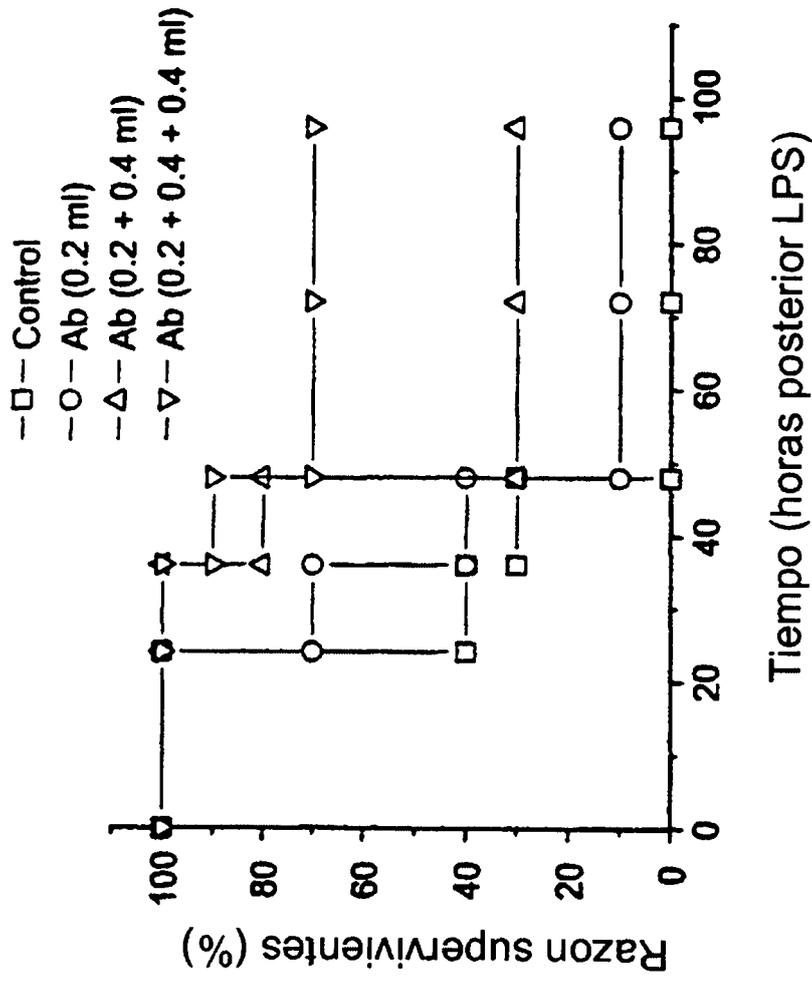


Fig. 2a

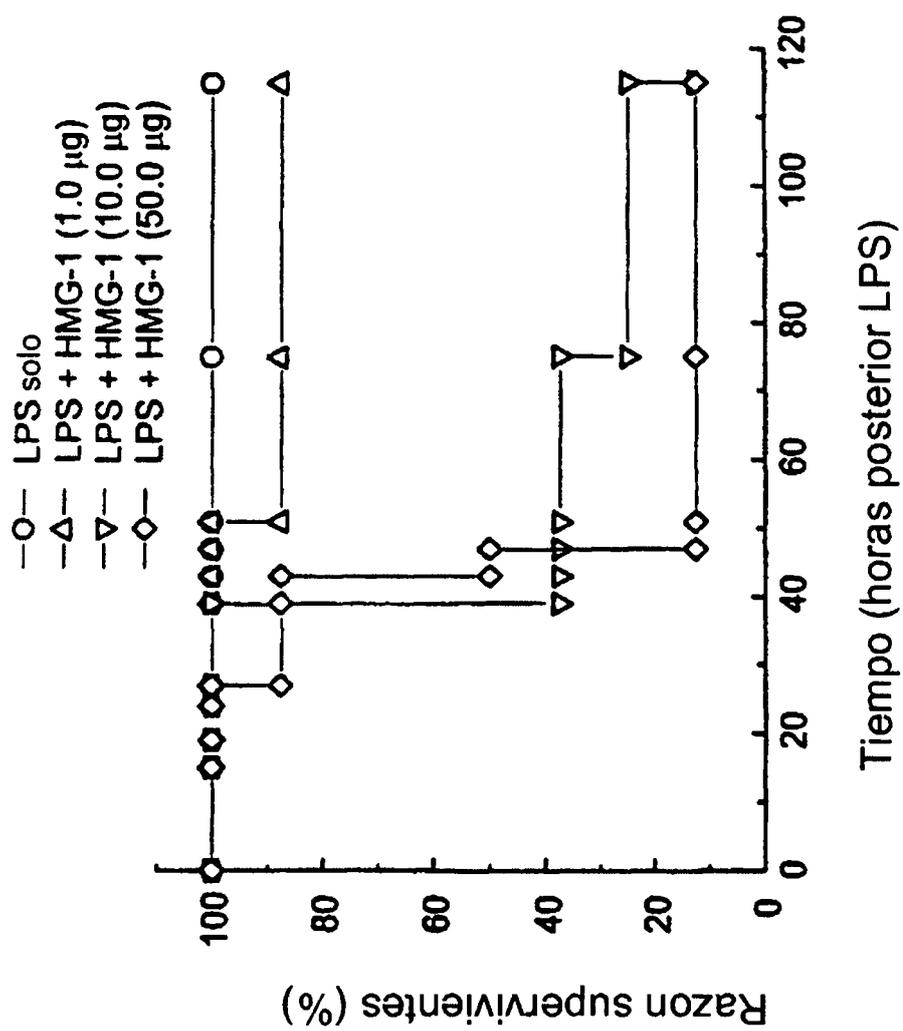


Fig. 2b

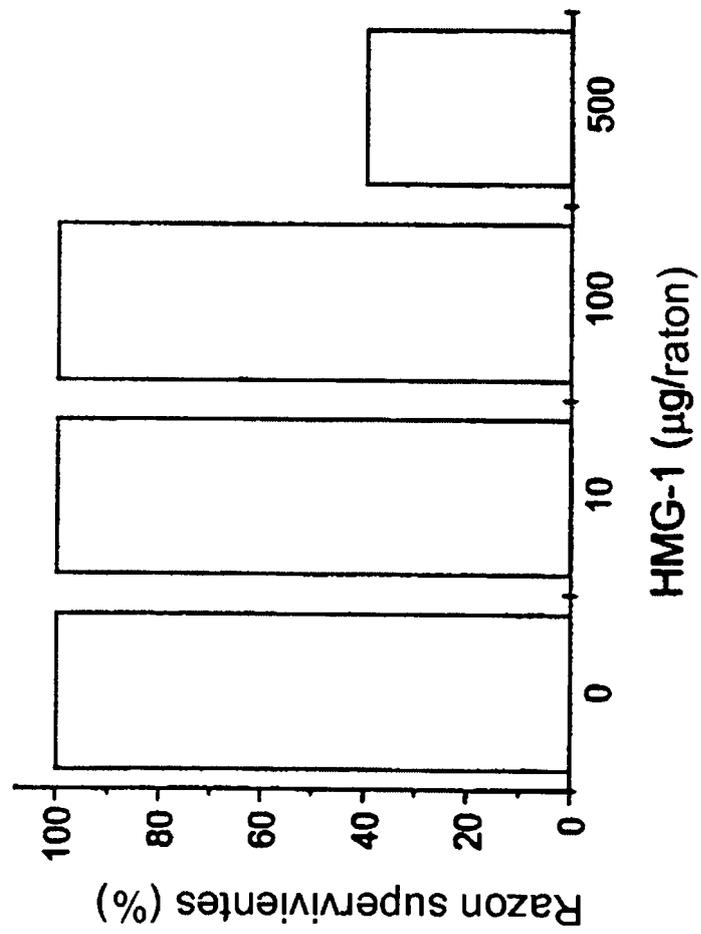


Fig. 2c

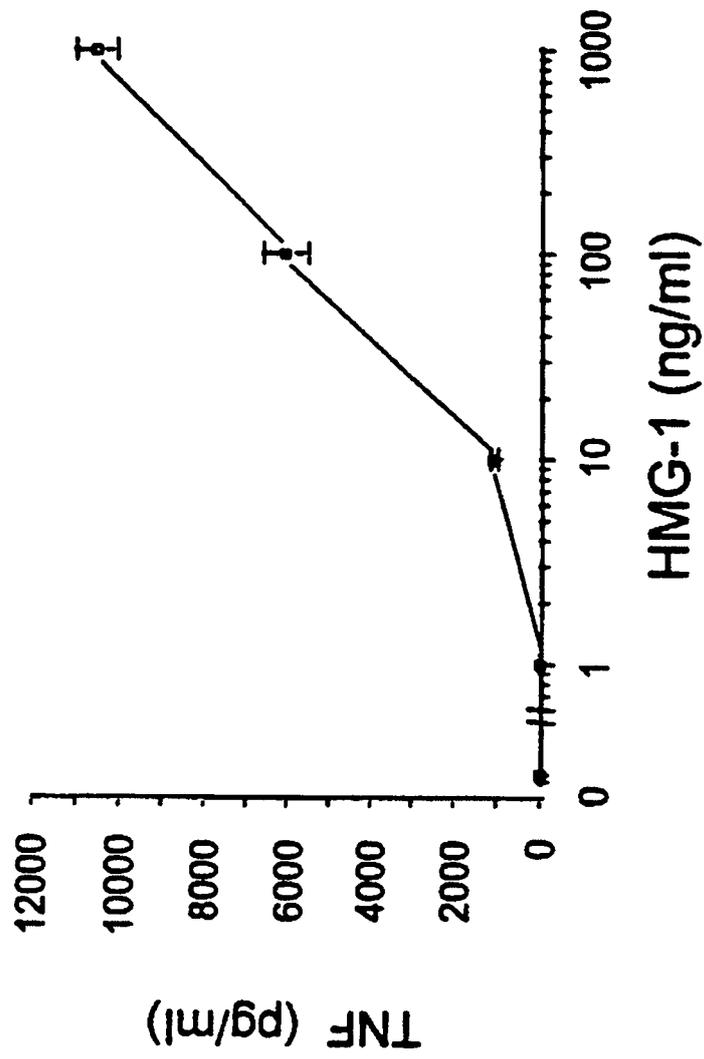


Fig. 3a

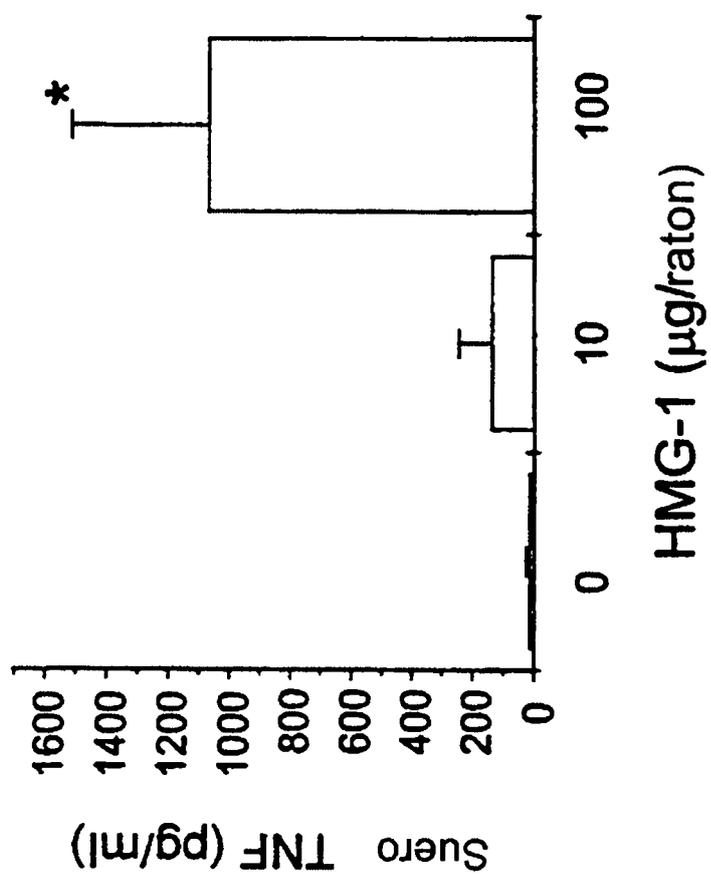


Fig. 3b

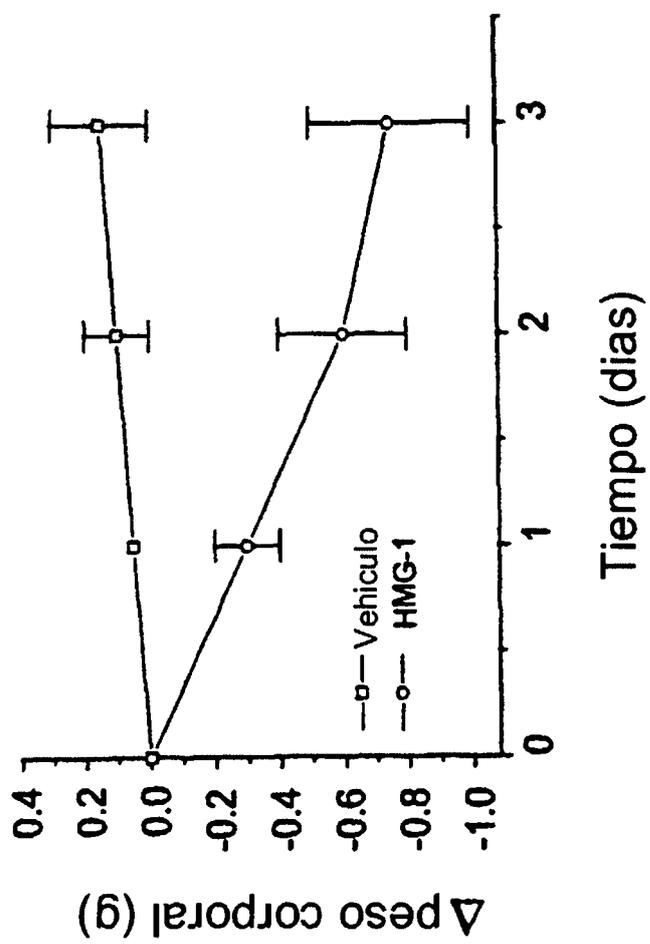
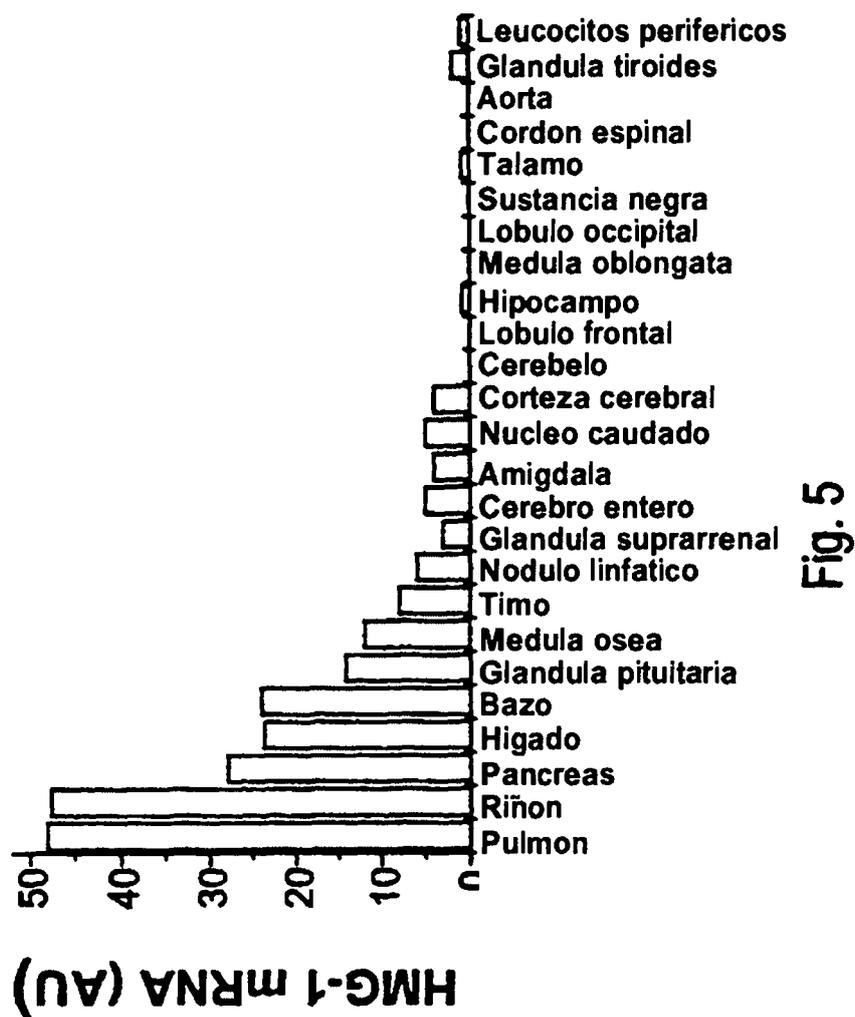


Fig. 4



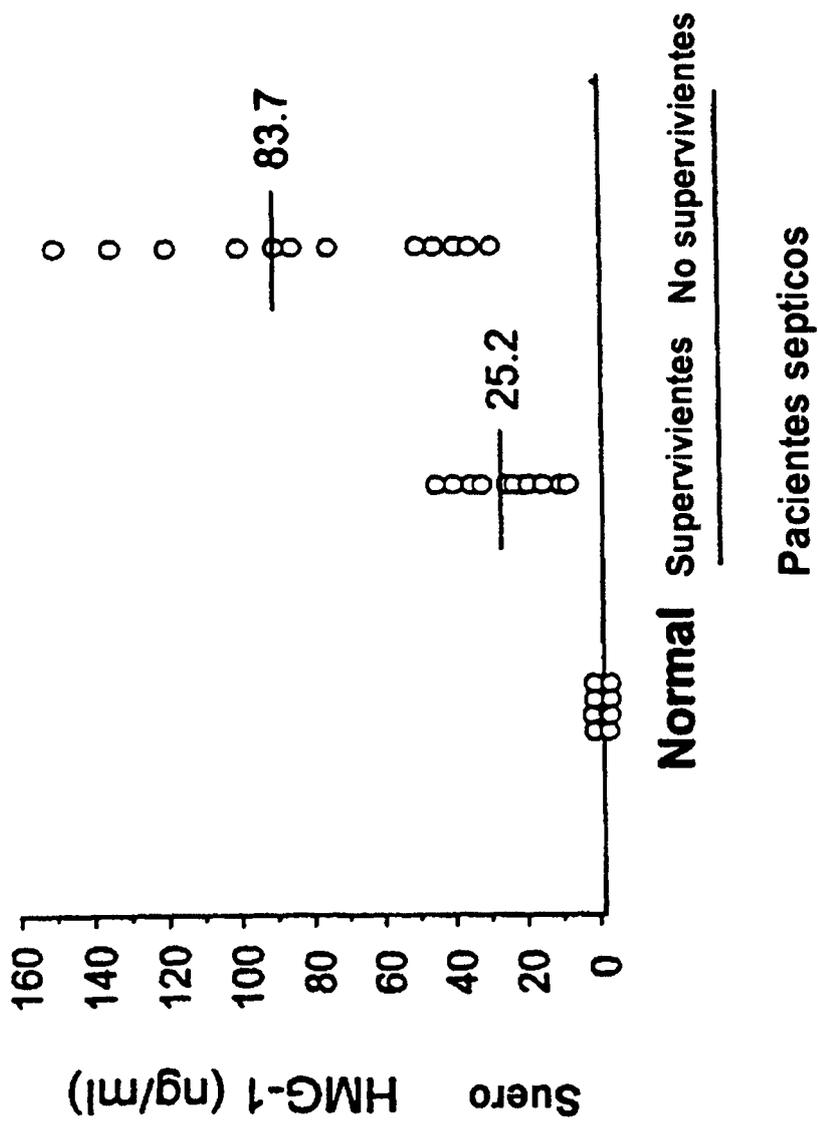


Fig. 6

ES 2 269 118 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) APLICANTE: THE PICOWER INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH
(ii) TÍTULO DE INVENCIÓN: Antagonistas de HMGI para Tratamiento de Enfermedades Inflamatorias.
(iii) NÚMEROS DE SECUENCIAS: 5
10 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
(A) DESTINATARIO: DAVIS WRIGHT TREMAINE
(B) CALLE: 1501 Fourth Avenue 2600 Century Square
15 (C) CIUDAD: Seattle
(D) ESTADO: Washington
(E) PAÍS: U.S.A.
(F) ZIP: 98101
20 (v) FORMA LEGIBLE EN COMPUTADORA
(A) TIPO DE MEDIO: Disco Floppy
(B) COMPUTADORA: PC compatible
25 (C) SISTEMA OPERATIVO: Windows95
(D) SOFTWARE: Word
(vi) FECHA DE APLICACIÓN:
30 (A) NÚMERO DE APLICACIÓN: PCTIUS00103583
(B) FECHA DE LLENADO: 14 Febrero 2000
(C) CLASIFICACIÓN:
35 (viii) INFORMACIÓN NOTARIO:
(A) NOMBRE: Oster, Jeffrey B.
(B) NÚMERO REGISTRO: 32,585
40 (C) NÚMERO DE REFERENCIA: WO 1201
(ix) INFORMACIÓN TELECOMUNICACION:
(A) TELÉFONO: 206 628 771 1
45 (B) TELEFAX: 206 628 7699

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID No.1:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 14
(B) TIPO: Aminoácido
(C) STRANDEDNESS: SIMPLE
55 (D) TOPOLOGÍA: DESCONOCIDO
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: N - Terminal de HMG1
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID No:1
60 **Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser 14**
5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID No.:2:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 42

