

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 MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2000 PCT/US2000/03583**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.08.2000 WO00047104**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2000 E 00915762 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **16.11.2016 EP 1165110**

54 Título: **Antagonistas de HMG1 para el tratamiento de afecciones inflamatorias**

30 Prioridad:

11.02.1999 US 248574

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

31.05.2017

73 Titular/es:

**THE FEINSTEIN INSTITUTE FOR MEDICAL
RESEARCH (100.0%)
350 COMMUNITY DRIVE
MANHASSET, NY 11030, US**

72 Inventor/es:

**TRACEY, KEVIN J. y
WANG, HAICHAO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 269 118 T5

DESCRIPCIÓN

Antagonistas de HMG1 para el tratamiento de afecciones inflamatorias

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención proporciona una composición farmacéutica y un método para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la activación de una cascada de citocinas inflamatorias, en particular, como se reivindica explícitamente, la sepsis, incluyendo, como se desvela pero no se reivindica explícitamente, el choque séptico y el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS, del inglés *acute respiratory distress syndrome*), que comprende administrar una cantidad eficaz de un antagonista de la proteína 1 del grupo de alta movilidad (HMG1). La presente invención proporciona adicionalmente un método de diagnóstico para controlar la gravedad de la sepsis y las afecciones relacionadas, que comprende medir la concentración sérica de HMG1 en un paciente que presenta síntomas de una enfermedad caracterizada por la activación de una cascada de citocinas inflamatorias. Por último, como se desvela pero no se reivindica explícitamente, se proporciona una composición farmacéutica y un método para provocar una pérdida de peso o tratar la obesidad, que comprende administrar una cantidad eficaz de la proteína HMG1 o un fragmento terapéuticamente activo del producto génico de un gen HMG1.

20 **Antecedentes de la invención**

La sepsis es un síndrome clínico con frecuencia fatal que se desarrolla después de una infección o una lesión. La sepsis es la causa más frecuente de mortalidad en pacientes hospitalizados. Los modelos experimentales de sepsis gramnegativas basados en la administración de endotoxina bacteriana (lipopolisacárido, LPS) han conducido a una mejora en la comprensión de los mecanismos patogénicos de la sepsis letal y las afecciones relacionadas con la sepsis en virtud de la activación de una cascada de citocinas inflamatorias común subyacente. Esta cascada de mediadores de respuesta del hospedador incluye el TNF, la IL-1, el PAF y otros factores derivados de macrófagos que se han estudiado extensamente como mediadores agudos, tempranos, de la letalidad final en endotoxemias graves (Zhang y Tracey, en *The Cytokine Handbook*, 3rd ed. Ed. Thompson (Academic Press Limited, EE.UU.). 515-547, 1998).

Desafortunadamente los enfoques terapéuticos basados en la inhibición de estos mediadores individuales "tempranos" de la endotoxemia solo han tenido un éxito limitado en ensayos clínicos prospectivos extensos contra la sepsis en pacientes humanos. Es posible inferir de estos resultados decepcionantes que los factores que aparecen posteriores a la respuesta del hospedador podrían determinar de forma crítica la patogenia y/o la letalidad en la sepsis y los trastornos relacionados. En consecuencia, existe una necesidad de descubrir dichos supuestos mediadores "tardíos" necesarios y/o suficientes para parte de toda la amplia patogenia multisistema, o para la letalidad de la endotoxemia grave, en particular cuando la endotoxemia es representativa de la sepsis clínica y trastornos clínicos relacionados.

La HMG1 es una nucleoproteína cromosómica de 30 kDa que pertenece al creciente grupo de alta movilidad (HMG, del inglés *high mobility group*) de proteínas no histonas asociadas a cromatina. Como grupo, las proteínas HMG reconocen estructuras de ADN únicas y han sido implicadas en diversas funciones celulares, incluyendo la determinación de la estructura y la estabilidad del nucleosoma, así como en la transcripción y/o la replicación. Las proteínas HMG fueron caracterizadas por primera vez por Johns y Goodwin como componentes de la cromatina con una alta movilidad electroforética en geles de poli(acrilamida) (véase *The HMG Chromosomal Proteins*, E. W. Johns, Academic Press, Londres, 1982). Los 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 las propiedades de unión al ADN, son similares en sus propiedades físicas. Las proteínas HMG están altamente conservadas entre especies, están distribuidas ubicuamente y son muy abundantes, y pueden extraerse de la cromatina en NaCl 0,35 M y son solubles en ácido perclórico o tricloroacético al 5 %. En general, se piensa que las proteínas HMG doblan el ADN y facilitan la unión de diversos factores de transcripción a sus secuencias afines, incluyendo por ejemplo, el receptor de progesterona, el receptor de estrógenos, las proteínas HOX y Oct1, Oct2 y Oct6. Recientemente, se han puesto en evidencia que un grupo grande y muy diverso de proteínas, incluyendo varios factores de transcripción y otras proteínas de interacción con el ADN, contienen una o más regiones similares a HMG1, y esta característica ha llegado a conocerse como caja HMG1 o dominio HMG1. Se han clonado ADN_c que codifican para HMG1 a partir de células de seres humanos, de ratas, de truchas, de hámsters, de cerdos y de terneros, y se cree que la HMG1 es abundante en los núcleos celulares de todos los vertebrados. La proteína está muy conservada con identidades de secuencia entre especies en el intervalo del 80 %. En la cromatina, la HMG1 se une al ADN enlazador entre nucleosomas y a diversas estructuras de ADN no- β tales como estructuras palindrómicas, cruciformas y de lazo, así como al ADN modificado por cisplatino. En general se cree que la unión al ADN por la HMG1 es insensible a la secuencia. La HMG1 se prepara más frecuentemente a partir de núcleos lavados o cromatina, pero la proteína también se ha detectado en el citoplasma. (Revisado en Landsman y Bustin, *BioEssays* 15:539-546, 1993; Baxevanis y Landsman, *Nucleic Acids Research* 23:514-523, 1995). Hasta la fecha, no se ha establecido ningún vínculo entre las proteínas HMG y cualquier afección clínica o enfermedad.

La proteína HMG1 se ha identificado como alternativa como una proteína de unión a heparina expresada

abundantemente en el cerebro en desarrollo y se ha apodado "anfoterina" por su secuencia altamente dipolar, que comprende dos repeticiones internas de un dominio cargado positivamente de aproximadamente 80 aminoácidos (la caja HMG1) y un dominio C-terminal ácido que contiene un tramo de aproximadamente de 30 restos de ácido glutámico o aspártico ininterrumpidos. La HMG1/Anfoterina se ha localizado en la superficie exterior de las membranas plasmáticas de las células epiteliales, y especialmente en las neuronas, donde se ha localizado específicamente la filipodia de las neuronas. Los estudios de inhibición han señalado que la HMG1/anfoterina es necesaria para el proceso de extensión (neurita) y la HMG1/anfoterina también puede estar implicada en las interacciones neurona-glia (Merenmies *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266:16722-16729, 1991; Merenmies *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266:16722-16729, 1991; Milev *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273:6998-7005, 1998; y Salmivirta *et al.*, *Exp. Cell Res.* 200:444-451, 1992). La Anfoterina/HMG1 puede liberarse desde células de eritroleucemia murina después de la estimulación con el inductor químico hexametilenobisacetamida (Melloni *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210:82-89, 1995). Los estudios previos señalaban que el producto génico del gen HMG1 funciona como un factor de potenciación de la diferenciación mediante la estimulación de α -PKC (Melloni *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210:82-89,1995; y Melloni *et al.*, *FEBS Lett.* 368:466470, 1995).

Se ha demostrado que el producto del gen HMG1 interactúa con plasminógeno y activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA) y potencia eficazmente la generación de plasmina en la superficie de las células, un sistema que se sabe que desempeña un papel en la proteólisis extracelular durante la invasión celular y la remodelación tisular. También se ha demostrado que la Anfoterina/HMG1 interactúa con el receptor productos finales de glicosilación avanzada (RAGE, del inglés *receptor of advanced glycosylation end products*) (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. Cell Res.* 200:444-451, 1992; y Vassalli *et al.*, *J. Clin. Invest.* 88:1067-1072, 1991), (Redlitz y Plow, *Baillieres Clin. Haematol.* 8:313-327, 1995; y Parkkinen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266:16730-16735, 1991).

Biochem. J., 1996, vol. 320, págs. 253-256 desvela un anticuerpo monoclonal anti-HMG1 y su capacidad de inhibir procesos de diferenciación y su uso para investigar la diferenciación de las células de eritroleucemia murina. *Biophys. Res. Commun.*, 1992, vol. 186, págs. 129-134 desvela la co-encapsulación de la proteína HMG1 con ADN plasmídico en liposomas y lo propone como un agente útil en la terapéutica génica de enfermedades renales.

Existe una necesidad permanente en la técnica de descubrir agentes mejorados que puedan evitar la cascada inflamatoria mediada por citocinas y que tengan una actividad terapéutica en una amplia diversidad de enfermedades inflamatorias mediadas por citocinas. La presente invención se hizo en el curso de la investigación para identificar agentes que median la toxicidad, la patogenia y/o la letalidad en la sepsis y otros trastornos relacionados mediante una activación común de la cascada de citocinas inflamatorias.

Las enfermedades y afecciones mediadas por la cascada de citocinas inflamatorias son numerosas. Dichas afecciones incluyen las siguientes, agrupadas en categorías de enfermedades:

Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica, que incluye:

- Síndrome séptico
- Sepsis grampositiva
- Sepsis gramnegativa
- Sepsis de cultivo negativo
- Sepsis fúngica
- Fiebre neutropénica
- Urosepsis
- Meningococemia
- Hemorragia por traumatismo
- Zumbidos
- Exposición a radiación ionizante
- Pancreatitis aguda
- Síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS)

Lesión por reperfusión, que incluye:

- Síndrome posterior a la bomba circulatoria extracorpórea
- Lesión por isquemia-reperfusión

Enfermedad cardiovascular, que incluye:

- Síndrome de espasmo cardíaco
- Infarto de miocardio
- Insuficiencia cardíaca congestiva

Enfermedad Infecciosa, que incluye:

- 5
 - Infección por VIH/neuropatía por VIH
 - Meningitis
 - Hepatitis
 - Artritis séptica
 - Peritonitis
 - Epiglotitis por neumonía
- E. coli 0157:H7
- 10
 - Síndrome urémico hemolítico/Malaria con púrpura trombolítica trombocitopénica
 - Fiebre hemorrágica del Dengue
 - Leishmaniasis
 - Lepra
- 15
 - Síndrome del choque tóxico
 - Miositis estreptocócica
 - Gangrena Gas
 - Tuberculosis *por Mycobacterium*
 - Mycobacterium avium intracelulare*
 - Neumonía *por Pneumocystis carinii*
- 20
 - Enfermedad inflamatoria pélvica
 - Orquitis/epididimitis
 - Legionella
 - Enfermedad de Lyme
 - Gripe A
- 25
 - Virus de Epstein-Barr
 - Síndrome hemiafagocítico asociado a virus
 - Encefalitis vírica/Meningitis aséptica
 - Obstetricia/Ginecología, que incluyen:
- 30
 - Parto prematuro
 - Aborto
 - Infertilidad
- 35
 - Enfermedades Inflamatorias/Autoinmunidad, que incluyen:
 - Artritis reumatoide/Artropatías seronegativas
 - Osteoartritis
 - Enfermedad inflamatoria intestinal
 - Lupus eritematoso sistémico
- 40
 - Iritis/neuritis óptica por uveitis
 - Fibrosis pulmonar idiopática
 - Vasculitis sistémica/Granulomatosis de Wegener
 - Sarcoidosis
 - Orquitis/Procedimientos de reversión de la vasectomía
- 45
 - Enfermedades Alérgicas/Atópicas, que incluyen:
 - Asma
 - Rinitis Alérgica
- 50
 - Eczema
 - Dermatitis contacto Alérgica
 - Conjuntivitis Alérgica
 - Hipersensibilidad neumonitis
- 55
 - Cáncer, que incluye:
 - LLA
 - LMA
 - LMC
- 60
 - LLC
 - Enfermedad de Hodgkin, Linfoma no Hodgkin
 - Sarcoma de Kaposi
 - Carcinoma colorrectal
 - Carcinoma nasofaríngeo
- 65
 - Histiocitosis maligna
 - Síndrome paraneoplásico/hipercalcemia maligna

Trasplantes, que incluyen:

Rechazo del trasplante de órganos
Enfermedad injerto contra hospedador

5

Caquexia

Enfermedades congénitas, que incluyen:

Fibrosis quística
Linfocitosis hematofagocítica familiar
Anemia de células falciformes

10

Enfermedades dermatológicas, que incluyen:

Psoriasis
Alopecia

15

Enfermedades neurológicas, que incluyen:

Esclerosis múltiple
Migraña

20

Enfermedades renales, que incluyen:

Síndrome nefrítico
Hemodiálisis
Uremia

25

Toxicidad, que incluye:

Terapia con OKT3
Terapia con anti-CD3
Terapia con citocinas
Quimioterapia
Radioterapia
Intoxicación crónica por salicilatos

30

35

Enfermedades metabólicas/idiopáticas, que incluyen:

Enfermedad de Wilson
Hemocromatosis
Deficiencia de antitripsina Alfa-I
Diabetes
Tiroiditis de Hashimoto
Osteoporosis
Evaluación del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal
Cirrosis biliar primaria

40

45

50 Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une específicamente a una proteína HMG1 y a un fragmento de la misma e inhibe la activación mediada por HMG1 de la cascada de citocinas inflamatorias. La invención se refiere al uso de un anticuerpo, que se une específicamente a una proteína HMG1 y a un fragmento de la misma e inhibe la activación mediada por HMG1 de la cascada de citocinas inflamatorias para su uso como un producto farmacéutico y, en particular, para la fabricación de un medicamento, para el tratamiento de la sepsis.

55

60

En otra realización, el método de la invención comprende adicionalmente administrar un segundo agente en combinación con el antagonista de HMG1, en el que el segundo agente es un antagonista de un mediador temprano de la sepsis, tal como TNF, IL-1 α , IL-1 β , MIF o IL-6. Mucho más preferentemente, el segundo agente es un anticuerpo para TNF o un antagonista del receptor de IL-1 (ar IL-1).

65

La presente invención proporciona adicionalmente un método de diagnóstico y de pronóstico para controlar la

gravedad y predecir el curso clínico probable de la sepsis y las enfermedades relacionadas para un paciente que presenta síntomas de tipo choque o que está en riesgo de presentar síntomas asociados a enfermedades mediadas por la cascada inflamatoria. El método de diagnóstico y de pronóstico de la invención comprende medir la concentración de HMG1 en una muestra, preferentemente una muestra de suero, y comparar esa concentración con un patrón para HMG1 representativo de un intervalo de concentración normal de HMG1 en una muestra similar, por lo que niveles mayores de HMG1 son indicativos de mal pronóstico o de la probabilidad de aparición de reacciones tóxicas. El método de diagnóstico también puede aplicarse a otros tejidos o compartimentos de fluidos, tales como el fluido cerebroespinal o la orina. Por último, como se desvela pero no se reivindica explícitamente, se proporciona una composición farmacéutica y un método para provocar una pérdida de peso o tratar la obesidad, que comprende administrar una cantidad eficaz de HMG1 o un fragmento terapéuticamente activo de la misma.

Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 muestra dos gráficos que perfilan la inducción de la liberación de HMG1 por LPS *in vitro* (Figura 1A) e *in vivo* (Figura 1B). Específicamente, la Figura 1A muestra la acumulación de HMG1 en los sobrenadantes del cultivo de células de macrófago RAW 264.7, después de la estimulación con LPS (100 ng/ml). El recuadro es una transferencia Western (que utiliza anticuerpos activados contra la HMG1 recombinante) que muestra la inducción de la liberación de HMG1 desde las 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. Se recogió suero de ratones Balb/C en diversos puntos temporales después de la administración de LPS, y se ensayó para determinar la HMG1 mediante transferencia de *Western* usando anticuerpos activados contra la HMG1 recombinante.

La Figura 2 ilustra que la HMG1 es un mediador de la patogenia y la letalidad en la endotoxemia. La Figura 2A muestra el efecto protector de los anticuerpos anti-HMG1 frente a la letalidad por LPS, evaluado en ratones. La administración de antisuero anti-HMG1 en las cantidades indicadas a las -0,5 (si es una dosis), -0,5 y 12 (si son dos dosis), o -0,5, 12 y 36 horas (si son tres dosis) en relación con la exposición a LPS (a tiempo 0) fue protectora frente a la letalidad inducida por LPS, y las pautas posológicas repetidas proporcionaron una mejor protección. La Figura 2B ilustra la letalidad dependiente de la dosis provocada por rHMG1 en ratones endotóxicos. Se aleatorizaron ratones Balb/C machos (20-23 gramos) en grupos de diez para recibir LPS (3,15 mg/kg; una dosis no letal) solo o en combinación con proteína HMG1 recombinante purificada. La administración de HMG1 a las dosis indicadas 2, 16, 28 y 40 horas después de la exposición al LPS incrementó significativamente la letalidad de la endotoxemia subyacente. La Figura 2C ilustra la toxicidad letal independiente de HMG1 en función de la dosis. Se administró rHMG1 purificada a ratones Balb/C machos (cinco ratones por grupo de tratamiento) como un único bolo i.p. a la dosis indicada. Los ratones se observaron durante al menos 48 horas, y el 60 % de los ratones tratados con rHMG1 a una dosis de 500 µg/ratón murieron dentro de las 24 horas siguientes a la exposición a rHMG1, indicando una DL₅₀ de dosis única de menos de 500 µg/ratón.

La Figura 3 muestra que la HMG1 indujo la liberación de TNF tanto *in vitro* (Figura 3A) como *in vivo* (Figura 3B). Específicamente, la Figura 3A muestra que la HMG1 induce la liberación de TNF desde huPPBMC (células mononucleares de sangre periférica humana) de forma dependiente de la dosis. Se estimularon cultivos recientemente aislados de huPBMC con proteína HMG1 recombinante purificada a las dosis indicadas y el medio de cultivo se muestreó cuatro horas más tarde en para ensayarse para determinar el TNF de acuerdo con métodos inmunológicos conocidos (ELISA). La Figura 3A muestra la media ± E.T.M. de la respuesta de TNF inducida en dos experimentos (por triplicado). La Figura 3B muestra que la administración de HMG1 indujo la acumulación de TNF en el suero de ratones tratados. Se trataron ratones Balb/C (20-23 g) por vía intraperitoneal a las dosis indicadas con HMG1 recombinante purificada y se tomaron muestras de sangre dos horas más tarde para el ensayo del TNF mediante un ensayo biológico L929 (niveles de TNF expresados como la media ± E.T.M., N = 3).

La Figura 4 muestra que la HMG1 provocó la pérdida de peso corporal en los ratones. Se administró HMG1 purificada por vía intraperitoneal a los ratones a razón de 100 µg/ratón/día durante tres días y se controló el peso corporal. La Figura 4 muestra la media ± E.T.M. del cambio en el peso corporal neto de tres ratones por grupo.

La Figura 5 muestra la distribución tisular del ARNm de HMG1. Se hibridaron manchas de transferencia de ARN humano que contenían ARN poli(A)* de diversos tejidos (Clontech, Palo Alto, CA, EE.UU.) con una sonda de ADNc de HMG1 marcada con digoxigenina-1,1-dUTP de 0,6 kb sintetizada mediante PCR usando un plásmido recombinante que contenía el inserto de ADNc de HMG1, todo de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. En resumen, la hibridación se realizó en un tampón de hibridación (SSC 5X/reactivo de bloqueo al 2 %/SDS al 0,1 %/formamida al 50 %, Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) con una concentración de sonda de 10 ng/ml durante 16 horas a 65 °C. Después de la hibridación, el filtro se sometió a dos lavados de SSC 0,5X/SDS al 0,1 %, durante 5 minutos, y dos lavados de SSC 0,2X/SDS al 0,1 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las señales se detectaron usando anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa y los reactivos de detección cloruro de 4-nitroblutetrazolio (NBT) y de 5-cromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) (Boehringer-Mannheim) de acuerdo con métodos convencionales. Las transferencias de Western se exploraron con un escáner de imágenes de plata (SilverScanner II, Lacie Limited, Beaverton, OR) y se cuantificó la densidad óptica relativa (en unidades arbitrarias, UA) usando el software de imágenes NIH 1.59. Nótese que se observaron altos niveles en tejidos ricos en macrófago.

La Figura 6 muestra, en comparación con un grupo de sujetos normales control, niveles aumentados de HMG1 sérica humana detectados en sujetos humanos hospitalizados con sepsis, en la que los pacientes sépticos se han categorizado adicionalmente en función de 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 inducible que se libera y se acumula en medios acondicionados por células de tipo macrófago murinas cultivadas, (RAW 264.7) después de la estimulación con LPS, TNF, o IL-1. Una secuencia de aminoácidos parcial de este polipéptido aislado era idéntica a la secuencia de la proteína HMG1, también conocida como anfoterina, una proteína no vinculada anteriormente a la patogenia de ninguna enfermedad. Esta información se usó para clonar un ADNc que codificaba para HMG1, cuya secuencia se expresó para proporcionar la proteína recombinante, proteína que se usó para generar anticuerpos anti-HMG1 específicos.

La eficacia terapéutica y diagnóstica se determinó en una serie de experimentos predictivos *in vitro* e *in vivo*. Los experimentos se detallan en la sección de Ejemplos. Por ejemplo, después de la administración de endotoxina (DL₁₀₀) a los ratones, los niveles de HMG1 en suero aumentaron más tarde (16 h) que los bien conocidos mediadores "tempranos" de la sepsis (tales como TNF e IL-1) y los niveles estables de HMG1 se mantuvieron de 16 a 32 horas. Los pacientes con sepsis letal tenían niveles altos de HMG1 en suero, que no se detectaron en voluntarios sanos normales. Además, la administración experimental aguda de rHMG1 a animales de ensayo, ya sea sola o en combinación con cantidades subletales de LPS, provocó respuestas patológicas notables e incluso la muerte. Pautas de dosificación más distribuidas de cantidades menores de rHMG1 condujeron a una pérdida de peso importante en los animales tratados. Estos resultados proporcionan evidencia de que HMG1 es un mediador de la endotoxemia y en particular un mediador tardío, en contraste con los mediadores "tempranos" tales como TNF e IL-1. Estos datos muestran adicionalmente la importancia de la HMG1 sérica como indicador de la gravedad o la letalidad potencial de la sepsis y enfermedades relacionadas.

Además, el tratamiento con anticuerpos anti-HMG1 proporcionó la protección completa frente a dosis DL₁₀₀ de LPS en ratones. La HMG1 es inducible por el TNF y por la IL-1 β , y estimula de forma dosis dependiente la liberación de TNF desde las huPBMC. El TNF es un marcador de la activación de los macrófagos, de modo que es probable (sin limitación en cuanto a los mecanismos implícitos ni quedar ligado a teoría alguna) que la HMG1 promueva la reactivación aguas abajo de la cascada de citocinas que, a su vez, media la patogenia tardía y la letalidad en la sepsis y las enfermedades relacionadas que implican la activación de respuestas de citocinas proinflamatorias. Por lo tanto, HMG1 probablemente ocupa un papel central en la mediación de la respuesta inflamatoria a la infección y la lesión, y los antagonistas de HMG1 serán de beneficio terapéutico en la sepsis y afecciones relacionadas con la activación de la cascada inflamatoria. La aparición de HMG1 en la cascada de citocinas inflamatorias es adecuada para propagar las fases posteriores de la respuesta del hospedador y contribuye a la toxicidad y letalidad. Los datos predictivos proporcionados en el presente documento apoyan la eficacia terapéutica de los antagonistas de HMG1 y proporcionan evidencia a favor de la teoría anteriormente mencionada respecto al mecanismo de acción. Los datos del tratamiento *in vivo* demostraron la eficacia de los antagonistas de HMG1 en general, y los anticuerpos anti-HMG1 en particular, para tratar afecciones mediadas por la cascada de citocinas inflamatorias en general y afecciones de sepsis en particular, incluyendo, por ejemplo, el choque séptico, el síndrome séptico u otras afecciones "de tipo sepsis" mediadas por citocinas inflamatorias. Adicionalmente, la patogenicidad independiente y la toxicidad y letalidad de HMG1 demuestran que los antagonistas de HMG1 son particularmente eficaces cuando se coadministran con antagonistas de mediadores inflamatorios "tempranos" tales como TNF, MIF, IL-1 e IL-6.

En resumen, de HMG1 es un mediador citocina de reacciones inflamatorias porque: 1) la HMG1 se libera desde macrófagos y células de la hipófisis después del estímulo con toxinas bacterianas o con citocinas proinflamatorias (TNF o IL-1 β); 2) la HMG1 se acumula en el suero de animales expuesto a LPS y en pacientes con sepsis; y 3) los anticuerpos específicos para HMG1 protegen contra la mortalidad en un modelo animal de endotoxemia letal predictivo de la sepsis clínica y afecciones relacionadas.

Composición farmacéutica y método de administración

La composición farmacéutica de la invención o combinación farmacéutica de la invención puede administrarse a un paciente ya sea por sí misma (complejo o combinación) o en composiciones farmacéuticas en las que se mezcla con vehículos y excipientes adecuados. La composición farmacéutica de la invención o combinación farmacéutica de la invención puede administrarse por vía parenteral, tal como mediante inyección o infusión intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea o inyección intramuscular. La composición farmacéutica de la invención o combinación farmacéutica de la invención puede administrarse por vía oral o por vía rectal a través de una formulación apropiada con vehículos y excipientes para formar comprimidos, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares. La composición farmacéutica de la invención o combinación farmacéutica de la invención puede administrarse por vía tópica, tal como parches para la piel, para conseguir niveles sistémicos uniformes de agentes activos. La composición farmacéutica de la invención o combinación farmacéutica de la invención puede formularse en cremas tópicas, parches para mucosas o para la piel, líquidos o geles adecuados para la aplicación a la piel o las superficies de membranas de mucosas. La composición farmacéutica de la invención o combinación farmacéutica de la invención puede administrarse mediante un inhalador al tracto respiratorio para un tratamiento local o sistémico.

La dosificación de la composición farmacéutica de la invención o combinación farmacéutica de la invención de la

presente invención puede determinarse por los expertos en la materia a partir de la presente divulgación. La composición farmacéutica o combinación farmacéutica de la invención contendrá una dosis eficaz (dependiendo de la vía de administración y la farmacocinética del agente activo) de la composición farmacéutica de la invención o combinación farmacéutica de la invención y los vehículos y excipientes farmacéuticos adecuados, que son adecuados para la vía particular de administración de la formulación (es decir, oral, parenteral, o por inhalación). El agente activo se mezcla en la formulación farmacéutica por medio de los procesos de mezclado, disolución, granulación, grageado, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas del agente activo o la combinación en forma hidrosoluble. Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones del agente activo en forma de suspensiones de inyección oleosas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como el aceite de sésamo o los ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como el oleato de etil o los triglicéridos o los liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. La suspensión puede contener opcionalmente estabilizadores o agentes que aumenten la solubilidad del agente activo o la combinación para permitir soluciones más concentradas.

Las formulaciones farmacéuticas para la administración oral pueden obtenerse combinando el agente activo con excipientes sólidos, tales como azúcares (por ej. lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol), preparaciones de celulosa (por ej. almidón, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, y carboximetilcelulosa de sodio), gelatina, gomas o polivinilpirrolidona. Además, pueden añadirse un agente disgregante y un estabilizante.

Oligómeros antisentido

La presente invención proporciona oligómeros antisentido que tienen una secuencia eficaz para inhibir o bloquear la expresión del gen o la secuencia de ARNm de HMG1. La tecnología antisentido, que usa oligonucleótidos específicos para inhibir la expresión de productos del gen diana, se está desarrollando como una modalidad terapéutica para enfermedades humanas. Hay disponibles varios criterios de selección para contribuir a la optimización de los antagonistas de oligonucleotidos antisentido. Por ejemplo, es aconsejable seleccionar las secuencias con un 50 % o más de contenido de GC. Las secuencias preferidas abarcan el codón de iniciación AUG de la proteína diana, aunque sitios en la región codificante 5' UTR pueden funcionar igual de bien. Dichas secuencias tienen en general aproximadamente 18-30 nucleótidos de largo y se eligen de manera que solapen el codón de iniciación ATG de la secuencia de ADNc de HMG1 para inhibir la expresión de la proteína. Se observa que con frecuencia oligómeros más largos inhiben la diana en mayor grado, indicando que la longitud preferida es aproximadamente de 25 monómeros para los primeros oligonucleótidos seleccionados como reactivos de detección. Normalmente, se seleccionan tres secuencias de oligonucleotidos con respecto a estos criterios y se comparan para que la actividad antagonista controle las secuencias de oligonucleotidos, tales como los oligonucleotidos "inversos" o aquellos en los aproximadamente cada cuarta base de la secuencia antisentido está aleatorizada. Por tanto, una secuencia preferida para fabricar secuencias de oligómeros de detección para HMG1 es una secuencia de 25 monómeros seleccionada para solapar el codón de iniciación ATG (subrayado) de la secuencia de ADNc de HMG1:

40 GAGGAAAATAACTAAACATGGGCAAAGGAGATCCTAAGAAG [SEQ ID NO. 5]

y dichas secuencias de detección preferidas se usan para construir agentes oligonucleotidos antisentido (y controles adecuados) para una comparación *in vitro* como antagonistas de HMG1. Estos datos *in vitro* son predictivos de la utilidad clínica en humanos usando agentes antisentido de diseño comparable.

Anticuerpos dirigidos a HMG1

Los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden ser policlonales o monoclonales; pueden ser de cualquiera de una serie de fuentes humanas, eucariotas no humanas, celulares, fúngicas o bacterianas. Los anticuerpos pueden codificarse mediante genómica o secuencias codificantes transmitidas por vectores y pueden ser inducidos frente a HMG1 nativa o recombinante o fragmentos de las mismas con o sin el uso de adyuvantes. Los métodos para fabricar anticuerpos son métodos y procedimientos bien conocidos en la técnica para generar y producir anticuerpos. En general, se prefieren anticuerpos neutralizantes frente a HMG1 (es decir, aquellos que inhiben las actividades biológicas de HMG1 en particular con respecto al papel similar a citocinas proinflamatorias) para las aplicaciones terapéuticas mientras que los anticuerpos no neutralizante podrían ser igual de apropiados para las aplicaciones diagnósticas. Los ejemplos de dichos anticuerpos útiles incluyen, pero no se limitan a tipos de anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, monocatenarios, humanos o humanizados, así como diversos fragmentos de los mismos tales como fragmentos Fab y fragmentos producidos a partir de sistemas de expresión especializados.

Ensayo de diagnóstico

El ensayo de diagnóstico proporcionado en el presente documento utiliza anticuerpos anti-HMG1 que pueden ser ya sea policlonales o monoclonales o ambos. El procedimiento de diagnóstico puede utilizar técnicas convencionales basadas en anticuerpos habituales para medir las concentraciones del producto génico de los genes de HMG1 en un

fluido biológico. Los procedimientos de diagnósticos convencionales preferidos son los ensayos de ELISA y las técnicas de Western.

Ejemplo 1: Identificación de HMG1 como un mediador de endotoxemia "tardío"

- 5 Este ejemplo proporciona los resultados de un experimento para identificar y aislar factores derivados de macrófagos liberados más tarde y que desempeñan un papel en la sepsis y en afecciones relacionadas tipificadas mediante la actividad inflamatoria de las citocinas. El experimento notificado en este ejemplo examinó medio acondicionado para células RAW 264.7 de macrófagos murinos después de la estimulación de los cultivos con TNF.
- 10 Las células de macrófago murino RAW 264.7 se obtuvieron de American Type Culture Collections (ATCC, Rockville, MD, EE.UU.) y proliferaron en cultivo con DMEM complementado con suero fetal bovino al 10 % y Glutamina al 1 %. Cuando la confluencia alcanzó el 70-80 %, el medio se reemplazó por medio OPTI-MEM I sin suero y los cultivos se estimularon con citocinas proinflamatorias (por ej. TNF α o IL-1) o endotoxina bacteriana (LPS).
- 15 Las proteínas liberadas de los anteriores cultivos de macrófagos estimuladas se examinaron. Específicamente, en diferentes puntos temporales, las células y los medios acondicionados para células se recogieron por separado mediante centrifugación (3000 rpm, 10 minutos). Las proteínas en el medio acondicionado se concentraron por ultrafiltración sobre membranas de AMICON con un punto de corte de 10 kDa (Amicon Inc., Bevermente, MA, EE.UU.) y se fraccionaron posteriormente mediante SDS-PAGE, y se tificaron con azul de Coomassie (Coomassie Blue R250 al 1,25 % en metanol al 30 %/ácido acético al 10 %). Después de desteñir con metanol al 30 %/ácido acético al 7 %, la proteína o proteínas de interés (es decir, las que se acumulan de forma preferencial en el medio de cultivo acondicionado estimulado) se aislan mediante escisión del gel de SDS-PAGE y se someten al análisis de secuencia N-terminal (Commonwealth Biotechnologies, Inc., Richmond, VA, EE.UU.).
- 20
- 25 La comparación del análisis por gel de SDS-PAGE de los perfiles de proteínas acumuladas en el control (sin estimulación con TNF α) frente a las células RAW 264.7 estimuladas por TNF reveló una proteína de 30 kDa fuertemente inducible cuya concentración en el medio acondicionado para células aumentó significativamente después de la estimulación durante 16 horas. El análisis por secuencia de aminoácidos 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].
- 30 Una revisión de bases de datos de genes relevantes encontró un 100 % de identidad de la secuencia de aminoácidos N-terminal con la HMG1.

Estos datos identificaron a la HMG1 como un producto "de aparición tardía" de cultivos de macrófagos estimulados con LPS y, por tanto, como un candidato de mediador proinflamatorio. Esta actividad se confirmó por la administración de HMG1 producida de forma recombinante y/o anticuerpos anti-HMG1 en sistemas de modelos celulares y animales que son predictivos de las afecciones clínicas humanas.

35

Ejemplo 2: Fuentes celulares de HMG1

- 40 Este ejemplo muestra qué fuentes celulares son capaces de liberar HMG1 en respuesta a TNF, IL-1 y/o LPS. Las células estudiadas incluyen células de hipófisis GH₃, células de macrófago murino RAW 264.7, células mononucleares de sangre periférica primaria humana (huPBMC), linfocitos T primarios humanos, células suprarrenales de rata PC-12 y células de riñón de rata primarias (Tabla 1). La estirpe celular de GH₃ de hipófisis de rata se obtuvo de American Type Cultures (ATCC, Rockville, Md., EE.UU.) y se cultivó en DEME complementado con suero fetal bovino al 10 % y glutamina al 1 %. Las células PBMC y los linfocitos T humanos estaban recién aislados de sangre completa de donantes sanos y se cultivaron en RPMI 1640 complementado con suero humano al 10 % como se describió previamente (Zhang *et al.*, *J Exp. Med.* 185: 1759-1768, 1997). Cuando la confluencia alcanzó el 70-80 %, el medio se reemplazó por medio OPTI-MEM I sin suero y los cultivos se estimularon con citocinas proinflamatoria (por ej. TNF α o IL-1) o endotoxina bacteriana (LPS).
- 45
- 50 Aunque los linfocitos T humanos, las células suprarrenales de rata (PC-12) y las células primarias de riñón de rata contenían HMG1 asociada a células como se demuestra mediante el análisis de transferencia Western de células enteras lisadas usando anticuerpos específicos de HMG1 (véase el ejemplo 4 a continuación), HMG1 no se acumuló significativamente en el medio de estos cultivos después de la estimulación con TNF, IL-1 β o LPS (Tabla 1).
- 55

TABLA 1: Liberación de HMG1 inducida desde diversos tipos de células

Tipo de células	Estímulos		
	TNF	IL-1 β	LPS
células murinas RAW 264.7	Sí	Sí	Sí
PBMC humanas	Sí	Sí	Sí
linfocitos T primarios humanos	No	No	No
células suprarrenales de rata PC-12	No	No	No
células de hipófisis de rata GH ₃	Sí	Sí	No
células de riñón de rata primarias PC-12	No	No	No

Nota: PBMC, células mononucleares de sangre periférica

TNF, IL-1 β (concentración eficaz mínima = 5 ng/ml para cada uno) y endotoxina bacteriana (LPS, concentración eficaz mínima =10 ng/ml) indujeron la liberación de HMG1 desde las células PBMC de forma dependiente del tiempo y de la dosis (Tabla 1). El IFN- γ solo (0 – 200 U/ml) no indujo la liberación de HMG1 desde ninguna de las células anteriores, pero cuando se añade en cualquier combinación con TNF o IL-1 β , IFN- γ potenció la liberación de HMG1 desde macrófagos de forma dependiente de la dosis, con una potenciación máxima de 3 veces por IFN- γ a una concentración de 100 U/ml. La liberación de HMG1 no se debió a la muerte celular porque la viabilidad de la célula no se vio afectada por TNF, IL-1 β o LPS, como se juzgó mediante exclusión de azul de tripano (90-92 % \pm 5 % viable para el control frente al 88 - 95 % \pm 4 % en presencia de TNF, IL-1 β o LPS). La cantidad de HMG1 liberada por las células de la hipófisis y las macrófagos se relaciona de forma inversamente proporcional con la concentración intracelular de HMG1, como se determina mediante el análisis por transferencia Western, lo que indica que el material liberado es en parte derivado de la proteína HMG1 asociada a células.

Se evaluaron fuentes potenciales de HMG1 circulante *in vivo* mediante la hibridación de una sonda específica de HMG1 para ARNm preparada a partir de diversos tejidos humanos normales (sustrato de transferencia disponible de fuentes comerciales), resumiendo los resultados en la Figura 5. Algunos tejidos ricos en macrófagos (pulmón, hígado, riñón, páncreas y bazo) presentaron la expresión más abundante de ARNm de HMG1; se observó menos en la hipófisis, la médula ósea, el timo, los nódulos linfáticos y la glándula suprarrenal. Además de proporcionar la información respecto a la respectiva distribución tisular de la expresión de HMG1, este estudio indica la practicidad y la utilidad de determinar secuencias de ácidos nucleicos específicas de HMG1 en muestras de tejido.

Ejemplo 3: Administración de HMG1 recombinante, *in vitro* e *in vivo*

Este ejemplo detalla los procedimientos para producir HMG1 mediante tecnología de ADN recombinante bien conocidas. El marco de lectura abierto de HMG1 se amplificó mediante PCR y se clonó en un vector de expresión (pCAL-n). En resumen, el marco de lectura abierto de ADNc de HMG1 de 648 bp se amplificó mediante PCR (94 °C 1', 56 °C 2', 72 °C 45", 30 ciclos) a partir de 5 ng de ADNc Quick Clone de cerebro de rata (n.º 7150-1, Clontech, Palo Alto, CA, EE.UU.) usando plantillas que contenían 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 ATC TTC T -3' [SEQ. ID NO. 3]. El producto de PCR de 680 bp (4 μ g) se digirió con *Bam* HI y *Hind* III y se clonó dentro de los sitios de clonación *Bam* HII/*Hind* III del vector pCAL-n (Stratagen, USA de La Jolla, CA, EE.UU.). El plásmido recombinante se transformó en *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen, Madison, WI, EE.UU.) y los clones positivos se exploraron y se confirmaron mediante la secuenciación de ADN en ambas hebras usando un kit de secuenciación de ciclo terminador Tag DyeDeoxi en un secuenciador fluorescente automatizado ABI 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

Para expresar HMG1 recombinante, se cultivaron clones positivos a 37 °C con agitación vigorosa (250 rpm) hasta que la DO₆₀₀ alcanzó 0,6, cuando se añadió IPTG (1 mM). Doce horas después de la inducción por IPTG, las células bacterianas se recogieron mediante centrifugación (6500 rpm, 15 minutos) y se lisaron mediante ciclos de congelación y descongelación. La fracción soluble en agua se recogió después de la centrifugación (30 minutos, 12.000 rpm), y la HMG1 recombinante se purificó en la columna de resina de unión a calmodulina como indica el fabricante (Stratagene). La endotoxina bacteriana se retiró del HMG1 recombinante usando Detoxi-Gel, gel removedor de endotoxina (Pierce, Rockford, IL EE.UU., n.º del catálogo 20344) y el contenido de LPS residual se determinó mediante el ensayo Limulus Amebocyte Lysate (Ensayo LAL, n.º del catálogo 50-64811, QCL-1000 Cromogenic LAL, Bio-Whittaker, Inc., Walkersville, MD, EE.UU.). La HMG1 recombinante purificada se añadió a los cultivos de células mononucleares de sangre periférica humana (HuPBMC) y los sobrenadantes se ensayaron para el TNF mediante ELISA 4 horas después del estímulo. El agente neutralizante de LPS polimixina B (10 μ g/ml) se añadió simultáneamente con HMG1 recombinante para eliminar el efecto de cualquier LPS contaminante sobre la liberación de TNF. Adicionalmente, se administró HMG1 derivada de modo recombinante para evaluar a animales, con o sin la exposición endotoxémica adicional del LPS exógeno, para estudiar el potencial patológico de alto niveles de HMG1 *in vivo* (véase la Figura 2B y la Figura 2C). En algunos experimentos, se aseguraron muestras de suero de animales tratados con HMG1 para someterlos a ensayo para TNF como se detalla en el presente documento (véase la Figura 1B).

El procedimiento anterior proporciona HMG1 recombinante como un péptido fusión que comprende un dominio de unión a calmodulina de 3,0 kDa y un sitio de anclaje de trombina como una extensión amino terminal registrada con la secuencia del péptido HMG1. En algunos experimentos, el indicador de fusión se retira de una alícuota de proteína recombinante y la bioactividad de la proteína de fusión completa se comparó con el péptido HMG1 anclado; no se observó ninguna diferencia importante en la bioactividad y se realizaron experimentos adicionales (especialmente aquellos que requerían la administración de HMG1 producida de modo recombinante a animales) normalmente con la proteína de fusión (no anclada).

Como se demuestra en las Figuras 3A y 3B, la administración *in vivo* o *in vitro* de HMG1 derivada de forma recombinante indujo una respuesta de TNF eficiente, confirmando la identificación de HMG1 como un mediador endógeno derivado de macrófago inducido por LPS con actividad proinflamatoria.

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, se generaron anticuerpos policlonales contra un oligopéptido correspondiente a la secuencia de aminoácidos N-terminal de la HMG1, o contra HmG1 recombinante purificada, en conejos de acuerdo con los procedimientos convencionales conocidos en la técnica. En resumen, se anclaron ocho copias de un oligopéptido con la secuencia GKGDPKKPRGKMSSC [SEQ. ID NO. 4] a las dendritas de lisina ramificadas radialmente (núcleo inerte inmunogénicamente pequeño. Éstas macromoléculas grandes se inyectan tres veces tanto por vía subcutánea como por vía intradérmica (0,5-1,0 mg por inyección) en conejos las semanas 1, 2 y 4 después de extraer sangre el día 0. Dos semanas después de la última inmunización, a los conejos se le extrajo sangre y se reforzaron por vía intramuscular con 1,0 mg de antígeno, seguido de una segunda extracción de sangre dos semanas después. Además, para producir anticuerpos policlonales contra HMG1 recombinante, los conejos se inmunizaron con péptido de fusión HMG1 recombinante (100 µg por inyección) siguiendo un protocolo similar. Se preparan anticuerpos monoclonales reactivos contra HMG1 (es decir, que se unen y en algunos neutralizan o antagonizan la actividad biológica HMG1) convenientemente de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica usando el antígeno HMG1 descrito en el presente documento o los otros fragmentos del péptido HMG1 como inmunógenos. Dichos anticuerpos monoclonales, y/o los hibridomas que los originan, son eficaces para producir diversos anticuerpos "humanizados" reactivos contra HMG1 (todos de acuerdo con los métodos conocidos en el estado de la técnica), anticuerpos humanizados que son útiles como se enseña en el presente documento.

Los anticuerpos específicos de HMG1 se usaron usados para medir la liberación de la HMG1 producida por el análisis de transferencia Western desde células RAW 264.7 después del tratamiento con TNF o LPS (Figura 1). Brevemente, se fraccionaron proteínas mediante SDS-PAGE sobre un gel de gradiente del 4-20 %, transferido a una membrana de PVDF, y se manchó con antisuero de conejo activado contra cualquier antígeno de HMG1 del N-terminal sintético o contra HMG1 recombinante. La señal se detectó usando un kit ECL según se explica por el fabricante (Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, IL, EE.UU.), y los niveles de HMG1 se determinaron midiendo la densidad óptica de las bandas sobre transferencias Western digitalizadas para su análisis usando software de imagen NIH 1.59, con referencia a una curva patrón de HMG1 recombinante purificado.

No se detectó ninguna proteína HMG1 en medio acondicionado para células RAW 264.7 en ausencia del tratamiento con TNF o LPS, pero se acumuló HMG1 a altos niveles en medio acondicionado después de dicha estimulación, alcanzando un período de estabilidad 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 específica de estímulo y dependiente de la dosis y el tiempo, con la acumulación máxima observada dentro de 8 horas después del estímulo con TNF a concentraciones tan bajas como 5 ng/ml. Se aprecia que la sepsis, el choque séptico y las enfermedades relacionadas pueden producirse en seres humanos en respuesta a los estímulos que difieren cualitativamente o cuantitativamente del bolo grande y letal de LPS utilizado en este modelo predictivo. Sin embargo, la endotoxemia experimental ha sido un sistema de modelo predictivo y valioso mediante el que se identifican componentes críticos de la cascada de citocinas inflamatorias y mediante el que se identifican antagonistas específicos con utilidad clínica predictiva. Con respecto a esto, los antagonistas de HMG1 son quizás más terapéuticamente atractivos que los antagonistas de TNF a la vista de la aparición tardía de HMG1 frente a TNF en la respuesta a la endotoxina.

Ejemplo 5: Detección de HMG1 en modelos animales in vivo

Este ejemplo ilustra un experimento *in vivo* en roedores que mide los niveles de HMG1 en suero después de la administración de una dosis subletal de LPS (DL₅₀). Se trataron ratones o ratas con LPS, y el suero se recogió en diferentes tiempos, y se ensayaron los niveles de HMG1 mediante análisis de transferencia de Western. Las concentraciones de HMG1 en suero se calcularon midiendo la intensidad óptica de la banda con referencia a una curva patrón de HMG1 purificada. Los niveles en suero aumentaron significativamente 16 horas después del LPS, y permanecieron altos durante al menos 32 horas (Figura 1B), y no fueron detectables en animales control tratados con vehículo. Estos datos muestran que la HMG1 representa una diana particularmente atractiva para el diagnóstico de y la intervención farmacéutica contra la sepsis y los trastornos relacionados con la toxicidad de citocinas porque la HMG1 es un mediador que de aparición tardía en la cascada de citocinas inflamatorias.

Ejemplo 6: beneficios de la protección frente a HMG1

Este ejemplo proporciona los resultados de un ensayos predictivos *in vivo* para medir la actividad terapéutica de antagonistas HMG1 en relación con el tratamiento de la sepsis y afecciones relacionadas con la toxicidad mediada por citocinas. En este ejemplo, el antagonista de HMG1 era una preparación de anticuerpo anti-HMG1. Los controles tratados con suero preinmunizado desarrollaron letargo, piloerección, diarrea, y sucumbieron a la muerte a las 48 horas. Estos signos clínicos de endotoxemia se evitaban significativamente mediante la administración de anticuerpos anti-HMG1. Se agruparon ratones Balb/C machos (6-7 semanas, 20-23 gramos) aleatoriamente (10 animales por grupo) y se pretrataron ya sea con suero control (preinmunizado) o suero anti-HMG1 (como se hace en el Ejemplo 4) 30 minutos antes de la administración (por vía intraperitoneal) de una dosis letal de LPS (50 mg/kg en 1X PBS). Otros grupos experimentales recibieron dosis adicionales de suero anti-HMG1 a +12 o +12 y + 36 horas

después de administración de LPS. Los animales fueron observados para determinar la aparición y la supervivencia durante al menos dos semanas.

5 Se generaron anticuerpos policlonales contra HMG1 recombinante en conejos y el antisuero se ensayó para determinar la especificidad y el título mediante procedimientos de ELISA y de transferencia Western. El antisuero policlonal reconoce inmunoespecíficamente al HMG1 recombinante (se une) en el análisis por transferencia de Western, por ejemplo, y discriminó la rHMG1 de otras proteínas en lisados bacterianas en bruto y como una proteína purificada que había estado diluida en suero de ratón. Usando métodos de detección de quimioluminiscencia amplificada en análisis de transferencia de Western, el antisuero policlonal anti-HMG1 a diluciones de hasta 1:1000
10 fueron útiles para detectar tan poco como 50 pg de proteína rHMG1. La administración de antisuero anti-HMG1 en las cantidades indicadas (Figura 2A) a -0,5 (una dosis), -0,5 y 12 (dos dosis), o -0,5, 12 y 36 (tres dosis) horas respecto a la exposición a LPS (tiempo 0) fue protectora frente a la letalidad inducida por LPS y las pautas posológicas repetidas proporcionaron una mejor protección.

15 La Figura 2B ilustra que rHMG1 provoca letalidad dosis dependiente en ratones endotóxicos. Se aleatorizaron ratones Balb/C machos (20-23 gramos) en grupos de diez para recibir LPS (3,15 mg/kg; una dosis no-letal) solo o en combinación con proteína HMG1 recombinante purificada. La administración de HMG1 a las dosis indicadas 2, 16, 28 y 40 horas después de la exposición a LPS significativamente incrementó la letalidad de la endotoxemia subyacente.

20 La Figura 2C ilustra la toxicidad letal independiente de HMG1 como función de la dosis. Se administró rHMG1 purificada a ratones Balb/C machos (cinco ratones por grupo de tratamiento) como un solo bolo por vía i.p. a la dosis indicada. Los ratones se observaron durante al menos 48 horas y el 60 % de los ratones tratados con rHMG1 a una dosis de 500 µg/ratón murieron a las 24 horas de la exposición a rHMG1, indicando una única dosis DL₅₀ de menos de 500 µg/ratones.

La protección conferida por los anticuerpos anti-HMG1 fue específica, porque la administración de suero preinmune, que no indicó ninguna reactividad inespecífica a HMG1 en las transferencias de Western, no evitó a los sujetos la mortalidad mediada por LPS (Figura 2A). Además, los anticuerpos específicos de HMG1 no reaccionaron de forma cruzada con otras citocinas derivadas de macrófago (por ejemplo IL-1 y TNF), eliminando la posibilidad de que los anticuerpos confiriesen protección mediante la unión a estos mediadores y por tanto mediante sus neutralización. La protección contra la sepsis, la patogenia asociada a la sepsis y las enfermedades relacionadas con la sepsis, que implican la activación de cascadas de citocinas proinflamatorias puede mejorarse mediante la combinación de la terapia dirigida contra más de un componente de la cascada de citocinas. Los antagonistas de HMG1 a este respecto pueden combinarse con antagonistas específicos de TNF, IL-1, MIF y otros mediadores inflamatorios, o con antagonistas de respuestas inflamatorias con actividad más amplia que inhiban múltiples componentes de la cascada inflamatoria (por ej. aspirina, AINES, esteroides antiinflamatorios, etcétera), para proporcionar incluso más modalidades terapéuticas eficaces. La protección contra la toxicidad del LPS estaba relacionada con la dosis del anticuerpo y la dosificación más frecuentemente con cantidades más altas de anticuerpo redujo la mortalidad en hasta el 70 % (Figura 2A). Los ratones se observador durante al menos 2 semanas en todos los experimentos y no se produjo mortalidad retardada, demostrando que el tratamiento con anticuerpo anti-HMG1 confiere protección duradera frente a la letalidad por LPS, y no retrasa simplemente el tiempo de la muerte.

45 Ejemplo 7: HMG1 en Enfermedad humana

Este ejemplo proporciona los datos que establecen una asociación entre HMG1 y la sepsis humana, y respaldan de este modo una indicación para usar antagonistas HMG1 en general y anticuerpos anti-HMG1 en particular en la sepsis humana y las enfermedades relacionadas con la toxicidad de citocinas. Los niveles de HMG1 en suero de individuos sanos normales y pacientes gravemente enfermos se midieron usando los anticuerpos policlonales generados como en el Ejemplo 4 en un formato de transferencia Western con referencia a una curva patrón de rHMG1. La HMG1 no fue detectable en los controles normales, pero se acumuló a niveles altos en los pacientes gravemente enfermos con sepsis (Tabla 2).

TABLA 2: Aparición en suero de la HMG1 en pacientes con sepsis.

Pacientes	Edad (años)	HMG1 (ng/ml)	Diagnóstico	Resultado
1	27	< l. d.	Normal	Saludable
2	34	< l. d.	Normal	Saludable
3	35	< l. d.	Normal	Saludable
4	36	< l. d.	Normal	Saludable
5	61	< l. d.	Normal	Saludable
6	31	< l. d.	Normal	Saludable
7	55	10	Sepsis, fuga anastomótica	Recuperado
8	70	7-20	Sepsis, perforación colónica	Recuperado
9	44	10-60	Sepsis, FMO, reconstrucción espinal	Muerto

10	60	> 120	Sepsis, FMO, úlcera gástrica perforada	Muerto
11	47	> 120	Sepsis, FMO, neumonía	Muerto
Nota: <l. d. - por debajo del límite de detección, FMO - Fallo multiorgánico				

Estos datos muestran que se observan niveles elevados de HMG1 en suero en pacientes con sepsis, y los niveles más altos de HMG1 en suero se observan en los casos letales (Tabla 2). Estos datos demuestran la importancia terapéutica de los 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, la letalidad potencial) de la sepsis mediante la medición de las concentraciones de HMG1 en suero. Este ensayo de diagnóstico también es útil para diagnosticar la gravedad de las afecciones relacionadas que implican la activación de la cascada de citocinas inflamatorias.

Se exploraron sujetos adicionales para detectar niveles de HMG1 en suero en asociación con la sepsis letal frente a la no letal, con los resultados (acumulativos con la Tabla 2) como se describen en la Figura 6. Los datos resumidos en la figura 6 representan de muestras de suero obtenidas de ocho sujetos sanos y veinticinco pacientes sépticos infectados con grampositivos: *Bacillus fragilis* (1 paciente), *Enterococcus faecalis* (1 paciente), *Streptococcus pneumoniae* (4 pacientes), *Listeria monocytogenes* (1 paciente), o *Staphylococcus aureus* (2 pacientes), Gramnegativos: [*Escherichia coli* (7 pacientes), *Klebsiella pneumoniae* (1 paciente), *Acinetobacter calcoaceticus* (1 paciente), *Pseudomonas aeruginosa* (1 paciente), *Fusobacterium nucleatum* (1 paciente), *Citrobacterfreundii* (1 paciente)], o agentes patógenos no identificados (5 pacientes). El suero se fraccionó mediante electroforesis en gel por SDS-PAGE y los niveles de HMG1 se determinaron mediante el análisis por transferencia de Western con referencia a la curva patrón de rHMG1 purificado diluido en el suero humano normal. El límite de detección por el análisis de transferencia de Western es 50 pg. Nótese que la HMG1 no es detectable en los controles normales, pero aumenta significativamente en pacientes sépticos. El nivel medio de HMG1 en suero de pacientes sépticos no-supervivientes (pacientes n = 13, nivel medio de HMG1 83,7 ± 22,3 ng/ml) es significativamente más alto que en los supervivientes (n = 12, nivel medio de HMG1 25,2 ± 15,1 ng/ml, P < 0,05). Estos datos proporcionan evidencia directa de la utilidad de la exploración de muestras tisulares (incluyendo sin limitación sangre o suero) para detectar secuencias de HMG1 (proteína o ácidos nucleicos) como un indicador de diagnóstico y pronóstico de la presencia de sepsis y trastornos relacionados con la activación de citocinas y de la gravedad y el curso clínico probable de dichas enfermedades y afecciones.

Ejemplo 8: La HMG1 induce mediadores proinflamatorios y pérdida de peso

Los presentes resultados proporcionan evidencia de que la HMG1 es un elemento mediador liberado tardíamente de la cascada de citocinas inflamatorias. La adición de HMG1 recombinante a células mononucleares de sangre primaria periférica humana condujo a la inducción dosis dependiente del TNF a las cuatro horas después del estímulo (Figura 3A). Esta estimulación por HMG1 recombinante libera TNF por las HuPBMC que no fue debido a la contaminación por LPS porque: (i) la HMG1 recombinante purificada no fue contaminada por LPS según se juzgó por un ensayo de endotoxina LAL; ii) la adición del agente neutralizante de LPS polimixina B no afectó a la inducción de HMG1 ni a la liberación de TNF y iii) la escisión proteolítica de preparaciones de HMG1 recombinante con tripsina suprimió la actividad de liberación de TNF completamente para los cultivos de PBMC. La estimulación por HMG1 también indujo que los macrófagos liberaran óxido nítrico (NO).

Para confirmar que la HMG1 indujo la liberación de TNF *in vivo*, se administró HMG1 recombinante purificada por vía intraperitoneal a ratones Balb/C, y se recogieron muestras de sangre para someterlas a ensayo para determinar TNF mediante el ensayo L929. Como se muestra en figura 3B, el TNF no es detectable en el suero de los animales control, pero aumenta significativamente después de dos horas de la administración de la proteína HMG1 recombinante.

La administración repetitiva del producto génico recombinante del gen de HMG1 (100 µg/ratón/día) provocó una pérdida significativa de peso corporal en ratones (Figura 4). Sin limitación en cuanto al mecanismo y sin ligado por teoría alguna, estos datos son coherentes con la hipótesis de que la HMG1 actúa como un estimulador unidireccional de la cascada proinflamatoria tanto en las enfermedades *in vitro* como *in vivo*. Estos datos *in vivo* en un modelo predictivo de pérdida de peso también proporcionan evidencia predictiva de que una formulación farmacéutica que comprende HMG1, o un fragmento terapéuticamente activo de la misma, es una terapia eficaz para la pérdida de peso.

Ejemplo 9: Fuentes *in vivo* de HMG1

Los niveles de HMG1 en suero en ratas hipofisectomizadas frente a ratas control también se midieron mediante la cuantificación de las intensidades de transferencias Western como se ha descrito anteriormente. Hubieron niveles de HMG1 significativamente altos a las 12 horas después de la exposición endotóxica (LPS 1,0 mg/kg) en ratas hipofisectomizadas (aproximadamente 75 ng/ml) en comparación con los controles (aproximadamente 25 ng/ml). Estos resultados indican que las células de la hipófisis no son la fuente principal de los niveles de HMG1 en suero y que los macrófagos pueden desempeñar un papel cuantitativamente más importante.

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: THE PICOWER INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Antagonistas de HMG1 para el tratamiento de afecciones inflamatorias
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 5
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- 15 (A) DESTINATARIO: DAVIS WRIGHT TREMAINE
(B) CALLE: 1501 Fourth Avenue 2600 Century Square
(C) CIUDAD: Seattle
(D) ESTADO: Washington
(E) PAÍS: EE.UU.
(F) CÓDIGO POSTAL: 98101
- 20 (v) FORMA DE LECTURA EN EL ORDENADOR
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: Disco Floppy
(B) ORDENADOR: PC compatible
(C) SISTEMA OPERATIVO: Windows95
(D) SOFTWARE: Word
- (vi) FECHA DE SOLICITUD:
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US00/03583
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 14 de Febrero de 2000
(C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- 35 (A) NOMBRE: Oster, Jeffrey B.
(B) NÚMERO REGISTRO: 32.585
(C) NÚMERO DE REFERENCIA: WO 1201
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACION:
- 40 (A) TELÉFONO: 206 628 771 1
(B) TELEFAX: 206 628 7699

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No:1:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 50 (A) LONGITUD: 14
(B) TIPO: Aminoácido
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: desconocida
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: HMG1 N-terminal
- 55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID No:1:
- Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser 14**
5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No:2:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 42
(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Primer PCR

5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID No:2:

CCC GCGGATC CATCGAGGGA AGGATGGGCA AAGGAGATCC TA 42

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 31
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Cebador de PCR

20

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID No:3:

CCC GCAAGCT TATCATCAT CATCATCTC T 31

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 15
(B) TIPO: aminoácido
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: HMG1 N-terminal

35

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID No:4:

Gly Lys Gly **Asp** Pro Lys **Lys** Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Cys 15
5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID No:5:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

45 (A) LONGITUD: 42
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Secuencia iniciadora que abarca la región de ADNc de HMG1

50

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID No:5:

GAGGAAAAAT AACTAAACAT GGGCAAAGGA GATCCTAAGA AG 42

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de la HMG1 que inhibe la activación mediada por HMG1 de la cascada de citocinas inflamatorias para su uso como un producto farmacéutico, en donde el antagonista se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo que se une específicamente a una proteína HMG1 o a un fragmento de la misma y una secuencia antisentido del gen de HMG1.
2. Un antagonista como se reivindica en la Reivindicación 1, que es un anticuerpo que se une específicamente a una proteína HMG1 o a un fragmento de la misma.
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 antisentido del gen de HMG1.
5. Una composición farmacéutica que comprende:
- (a) un antagonista de HMG1 que inhibe la activación mediada por HMG1 de la cascada de citocinas inflamatorias, en donde el antagonista se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo que se une específicamente a una proteína HMG1 o a un fragmento de la misma y una secuencia antisentido del gen de HMG1; y
- (b) un antagonista de TNF, IL-1 α , IL-1 β , MIF o IL-6.
6. La composición farmacéutica de la Reivindicación 5, en la que el componente (a) es un anticuerpo que se une específicamente a una proteína HMG1 o a un fragmento de la misma.
7. La composición farmacéutica de la Reivindicación 6, en la que el anticuerpo es policlonal o monoclonal.
8. La composición farmacéutica de la Reivindicación 5, en la que el componente (a) es una secuencia antisentido del gen HMG1.
9. La composición farmacéutica de una cualquiera de las Reivindicaciones 5 a 8, en la que el componente (b) de la composición es un anticuerpo para TNF o un antagonista del receptor de IL-1 (ar IL-1).
10. Uso de un antagonista de HMG1 que inhibe la activación mediada por HMG1 de la cascada de citocinas inflamatorias, en donde el antagonista se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo que se une específicamente a la proteína HMG1 o a un fragmento de la misma y una secuencia antisentido del gen de HMG1, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección caracterizada por la activación de la cascada de citocinas inflamatorias, en donde dicha afección es sepsis.
11. Uso como se reivindica en la Reivindicación 10, en donde el antagonista es un anticuerpo que se une específicamente a una proteína HMG1 o a un fragmento de la misma.
12. Uso como se reivindica en la Reivindicación 11, en donde el anticuerpo es policlonal o monoclonal.
13. Uso como se reivindica en la Reivindicación 10, en donde el antagonista es una secuencia antisentido del gen de HMG1.
14. El anticuerpo de la Reivindicación 2 o la Reivindicación 3, o la composición farmacéutica de la Reivindicación 6 o la Reivindicación 7, en donde el anticuerpo que inhibe la activación mediada por HMG1 de la cascada de citocinas inflamatorias se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo humano y un anticuerpo humanizado.
15. El anticuerpo de la Reivindicación 2 o la Reivindicación 3, o la composición farmacéutica de la Reivindicación 6 o la Reivindicación 7, en donde el anticuerpo que inhibe la activación mediada por HMG1 de la cascada de citocinas inflamatorias puede unirse a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos GKGDPPKPRGKMSSC (SEQ ID NO:4).
16. El anticuerpo de una cualquiera de las Reivindicaciones 2, 3, 14 y 15, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las Reivindicaciones 6, 7, 14 y 15, en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
17. El anticuerpo o la composición farmacéutica de la Reivindicación 16 en donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.
18. El uso de la Reivindicación 11 o la Reivindicación 12, en donde el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo humano y un anticuerpo humanizado.

19. El uso de la Reivindicación 11 o la Reivindicación 12, en el que el anticuerpo puede unirse a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos GKGDPPKKPRGKMSSC (SEQ ID NO:4).

5 20. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 11, 12, 18 y 19, en el que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

21. El uso de la Reivindicación 20 en el que el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.

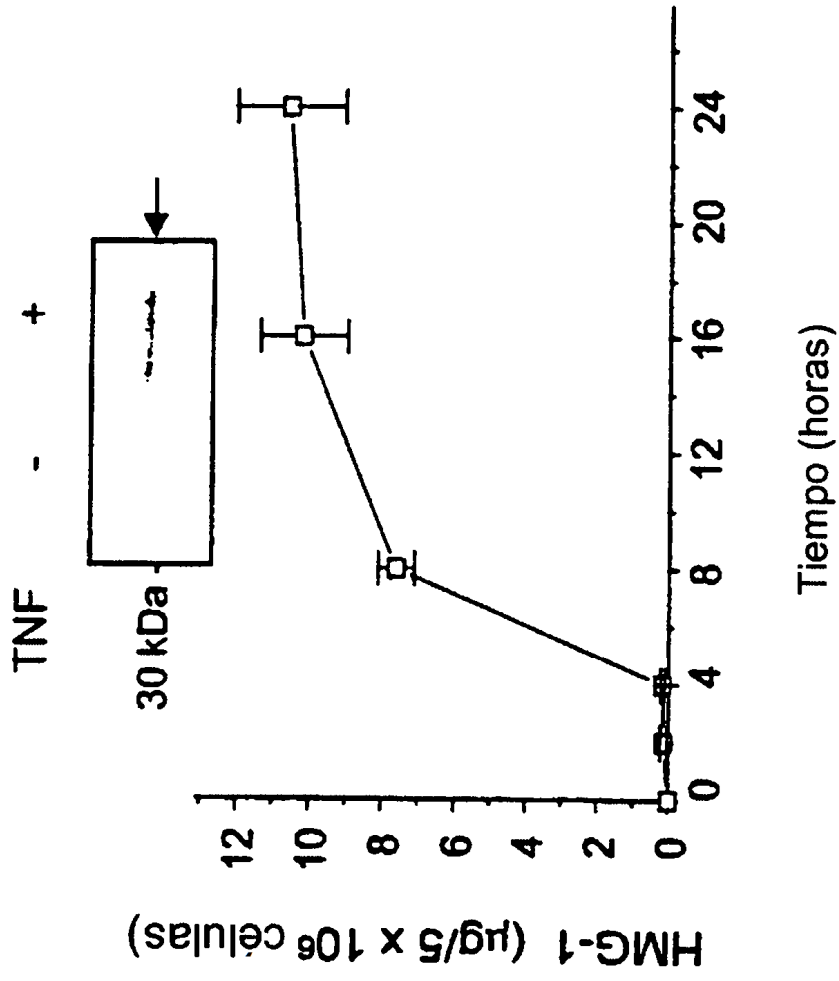


Fig. 1a

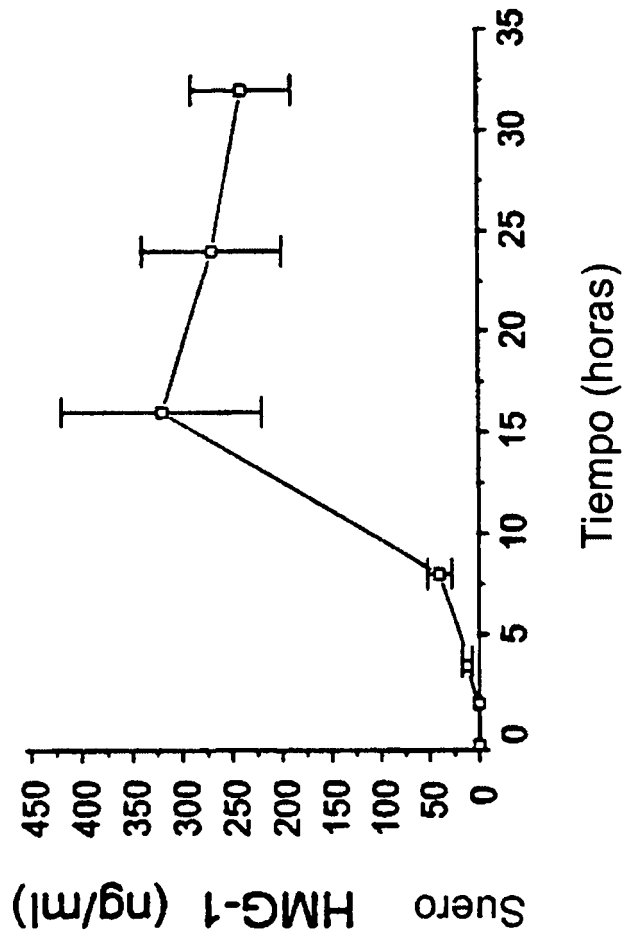


Fig. 1b

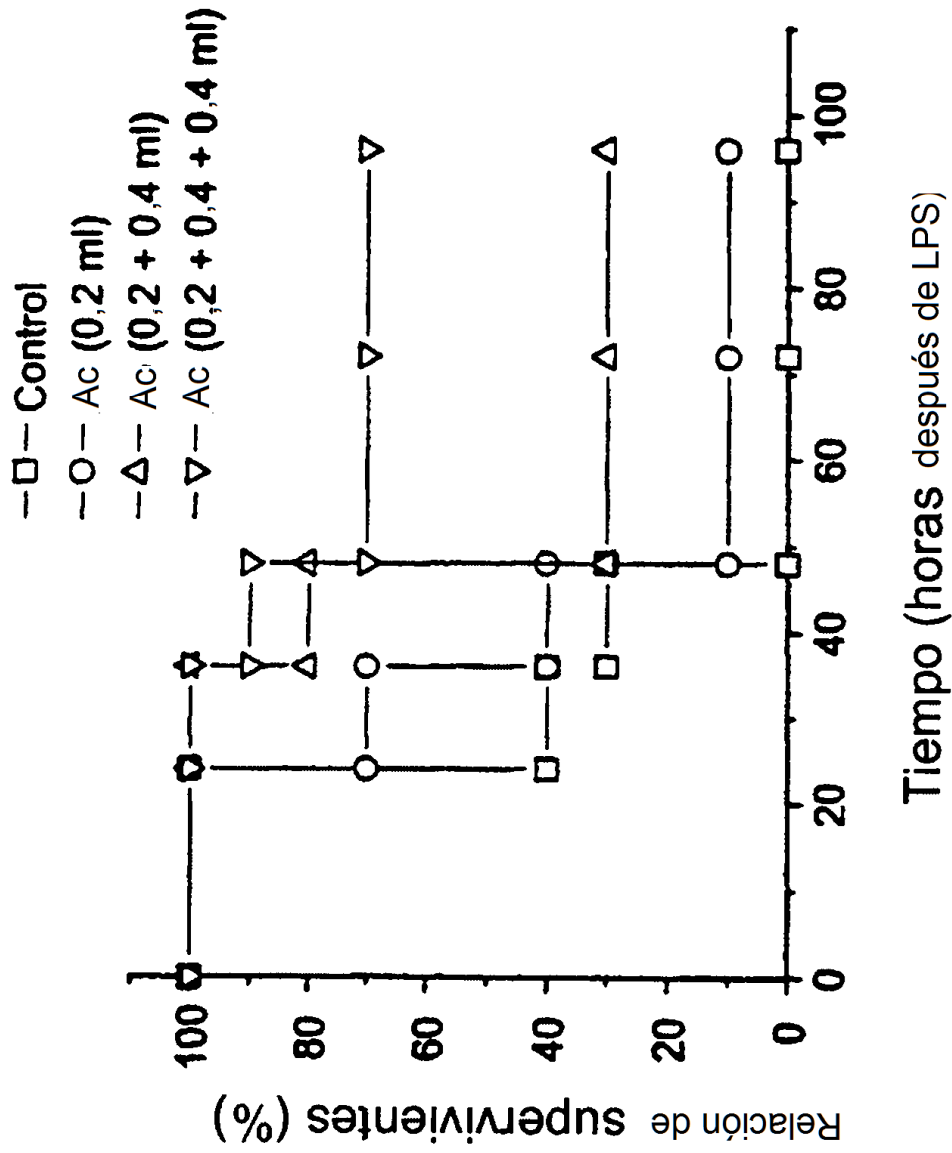


Fig. 2a

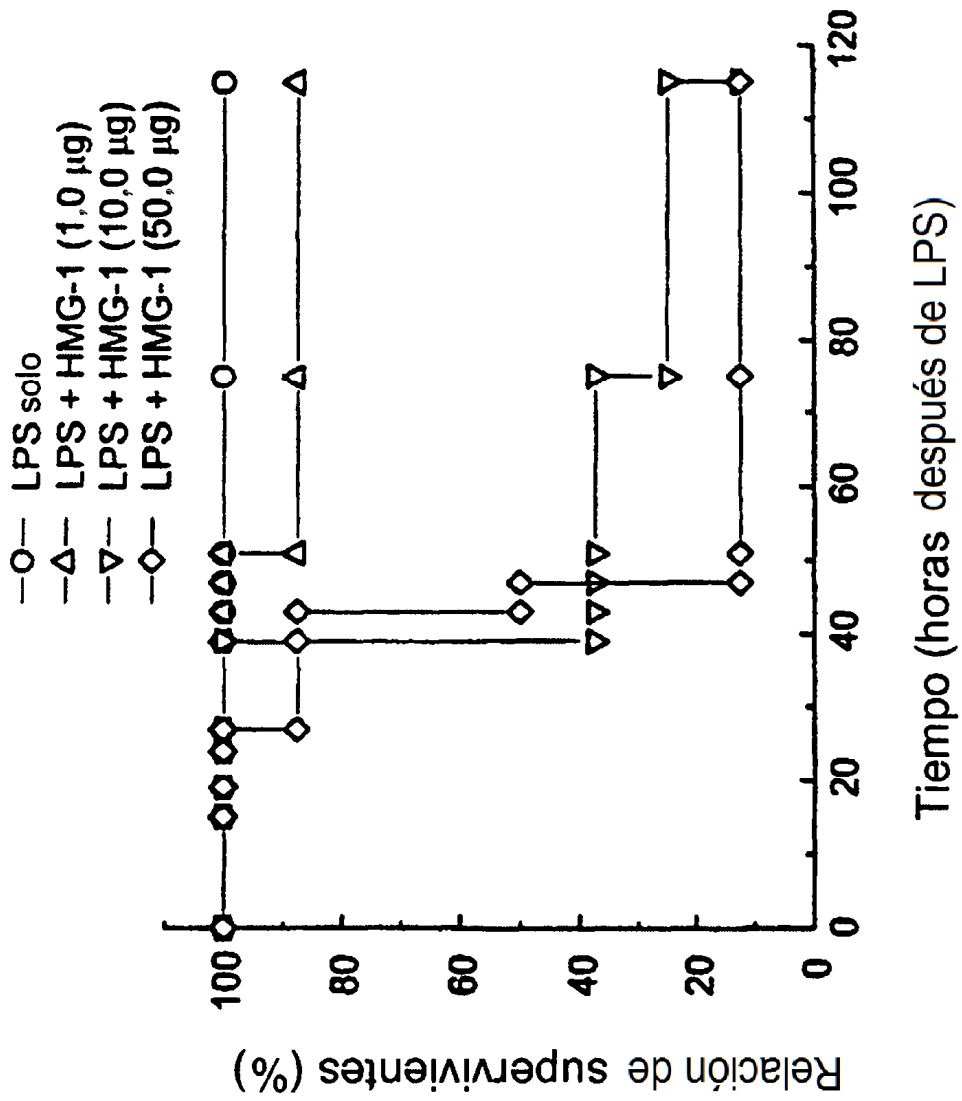


Fig. 2b

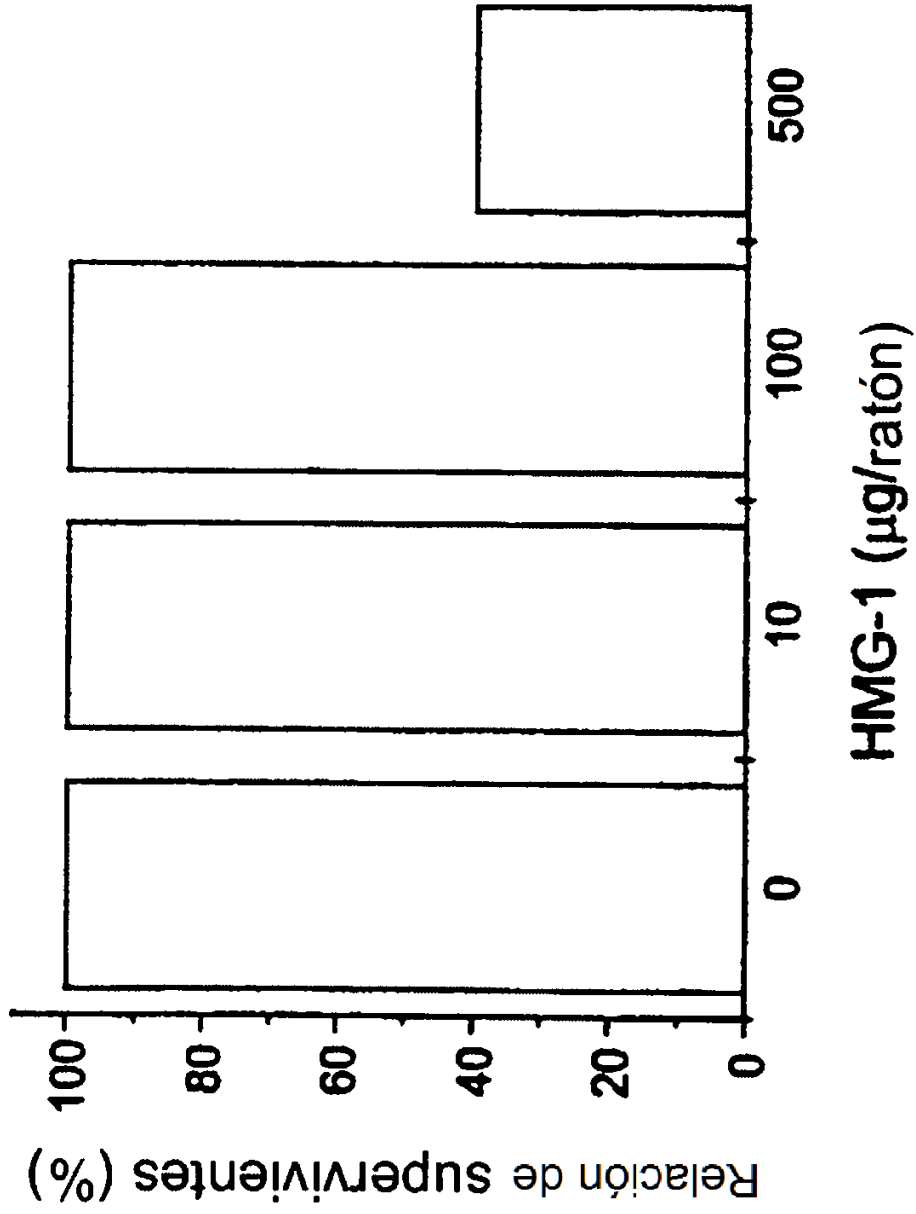


Fig. 2c

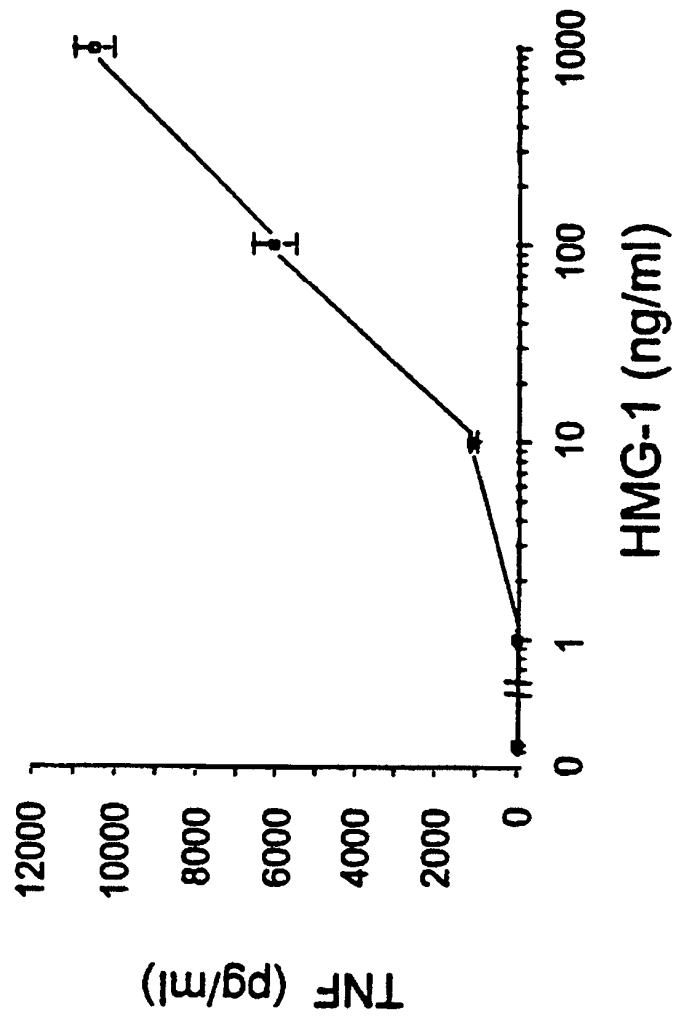


Fig. 3a

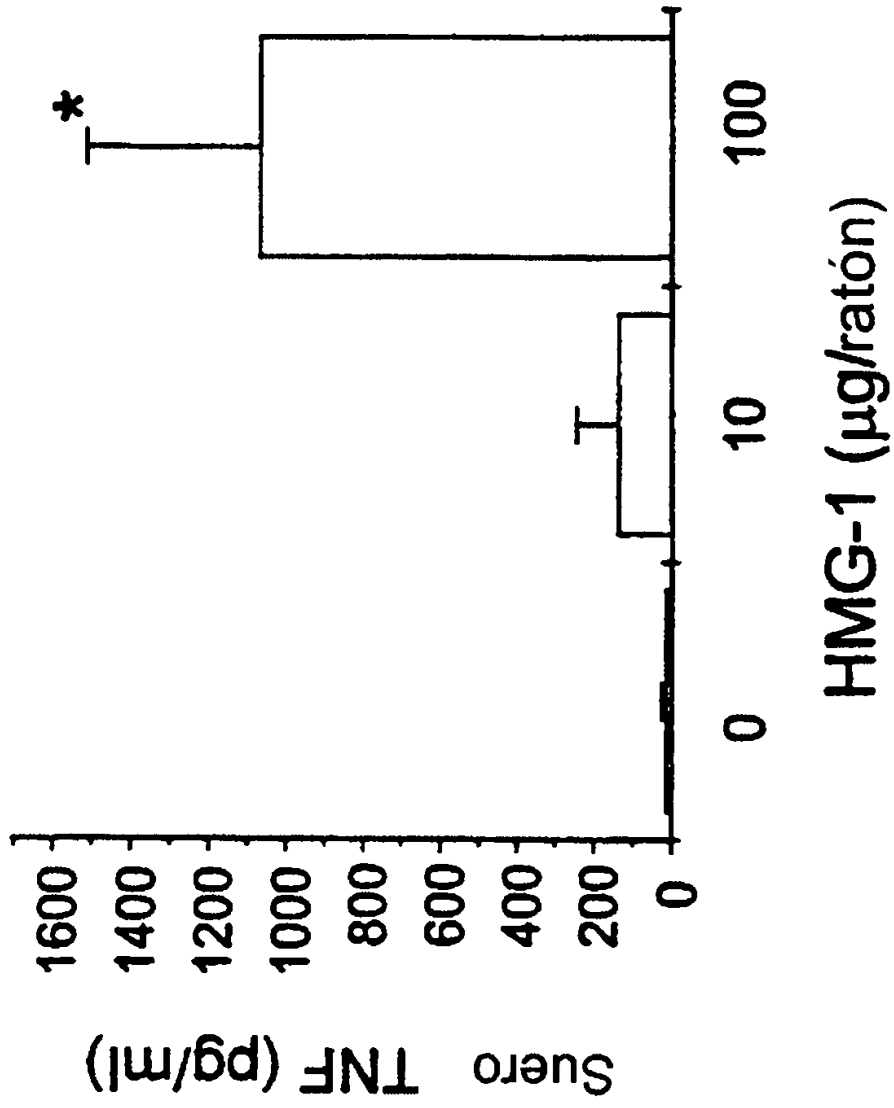


Fig. 3b

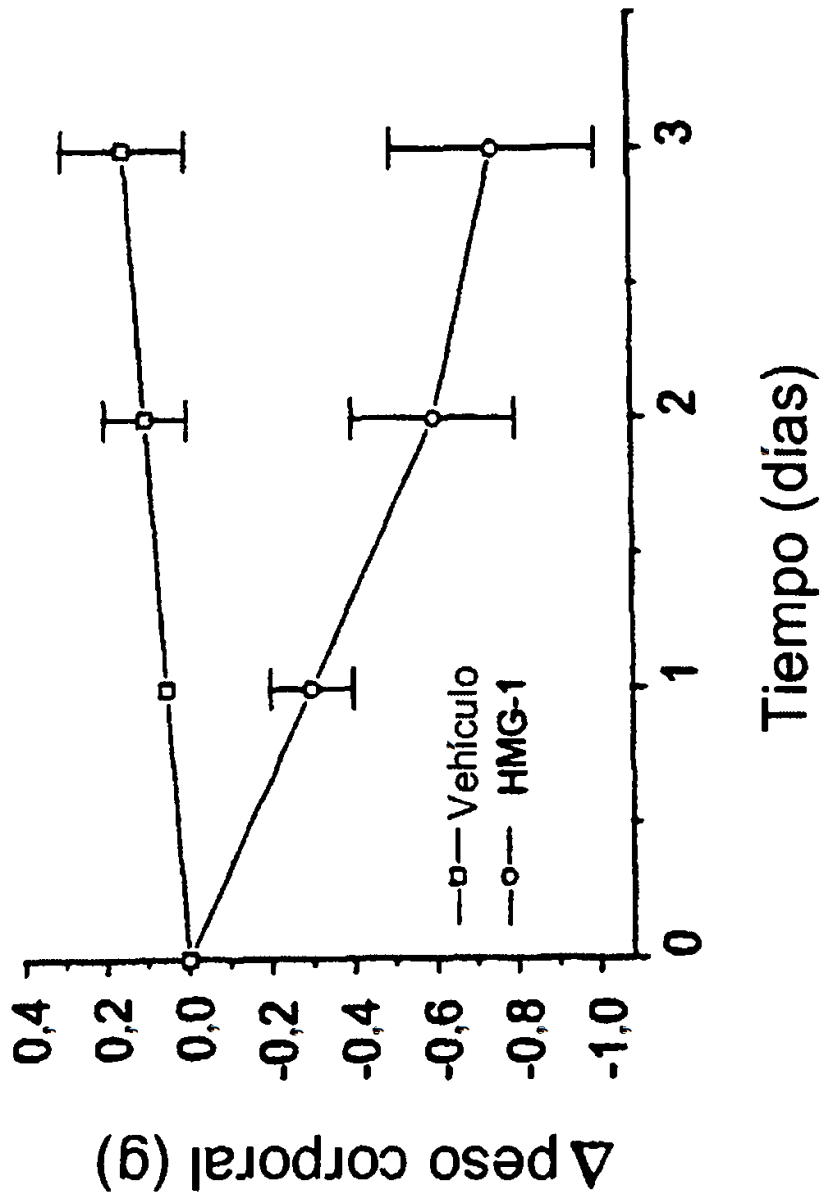


Fig. 4

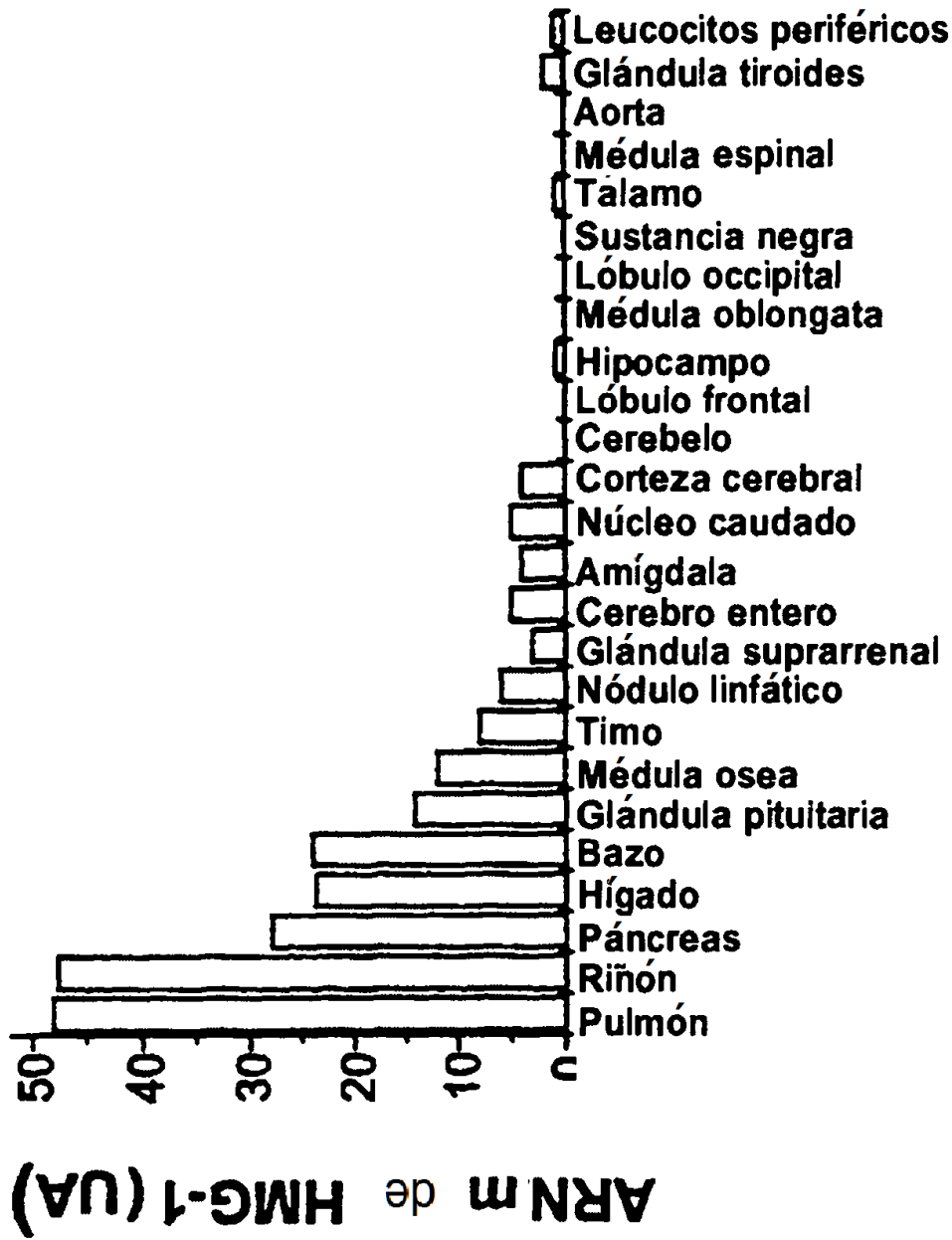


Fig. 5

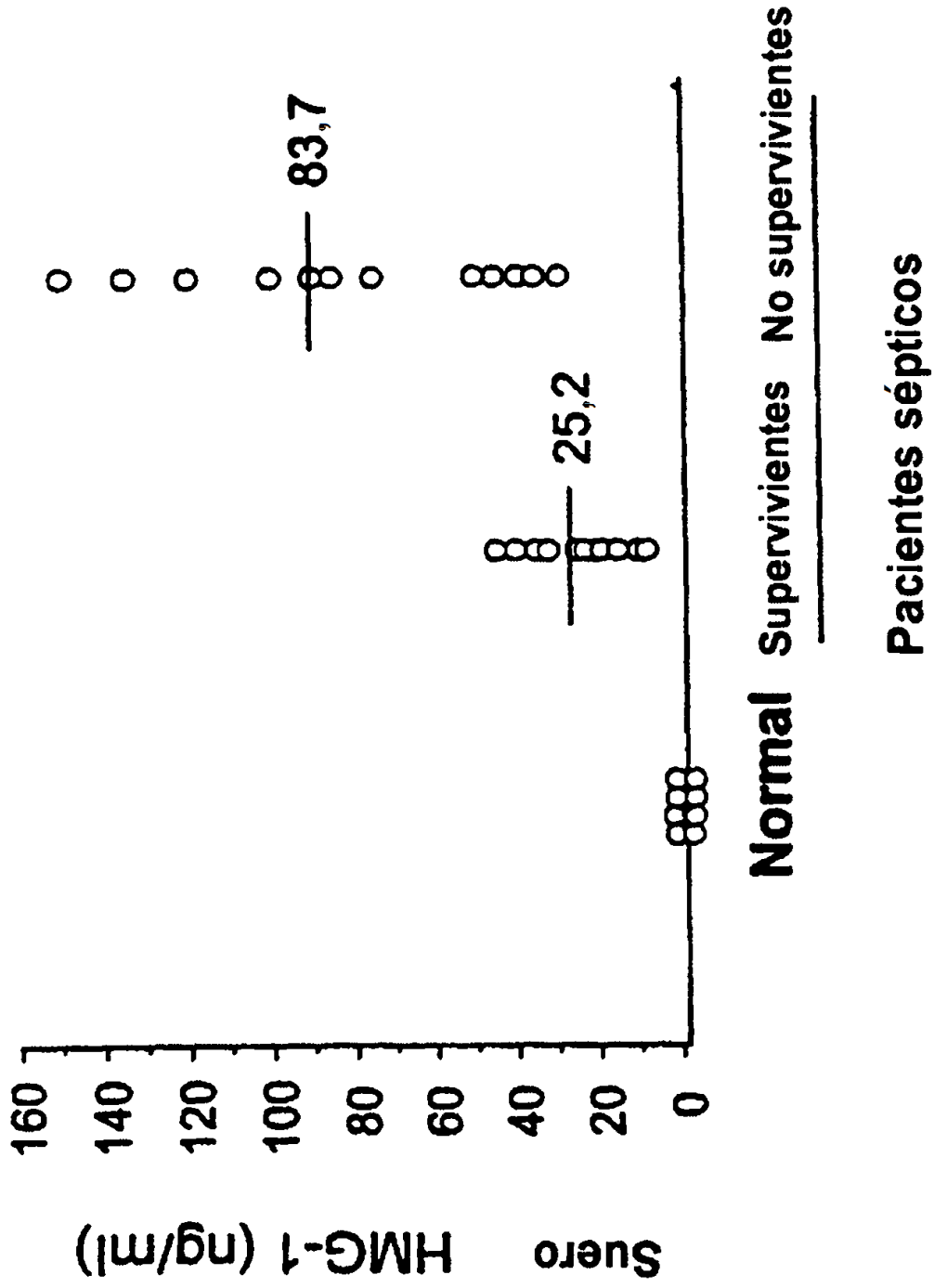


Fig. 6