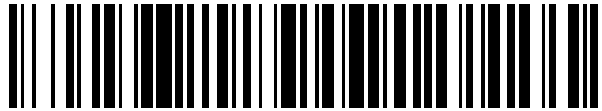


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 494 191**

51 Int. Cl.:

C07K 16/26 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2012 E 12193121 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2594588**

54 Título: **Anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o fragmento de anticuerpo anti-ADM o andamiaje proteico sin Ig anti-ADM para su utilización en tratamientos**

30 Prioridad:

16.11.2011 EP 11189448

16.03.2012 EP 12160018

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

15.09.2014

73 Titular/es:

ADRENOMED AG (100.0%)

Neuendorfstrasse 15a

16761 Hennigsdorf, DE

72 Inventor/es:

BERGMANN, ANDREAS

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 494 191 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

Anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o fragmento de anticuerpo anti-ADM o andamiaje proteico sin Ig anti-ADM para su utilización en tratamientos.

5

Campo de la invención

Es objeto de la presente exposición un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM, en los que dicho anticuerpo, fragmento o andamiaje es un anticuerpo no neutralizante.

10

Es objeto de la presente exposición un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM, en los que dicho anticuerpo, fragmento o andamiaje es

15 • un anticuerpo estabilizante de ADM o un fragmento de anticuerpo estabilizante de ADM o un andamiaje proteico sin Ig estabilizante de ADM que aumenta la vida media ($t_{1/2}$ tiempo medio de retención) de adrenomedulina en el suero, sangre, plasma, por lo menos el 10%, preferentemente por lo menos, el 50%, más preferentemente > 50%, aún más preferentemente > 100% y/o

20 • en el que dicho anticuerpo estabilizante de ADM o un fragmento de anticuerpo estabilizante de adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig estabilizante de ADM bloquea la bioactividad de ADM hasta menos del 80%, preferentemente menos del 50%.

Lo expuesto anteriormente se refiere al sentido de bloquear la bioactividad de ADM no superior al 80% ni superior al 50%, respectivamente, y por lo tanto debe entenderse como bloqueo limitado de la bioactividad de ADM o reducción de la bioactividad de ADM por el respectivo enlazador de ADM, que es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo o un andamiaje proteico sin Ig estabilizante de ADM. Por implicación, esto significa que continúa habiendo bioactividad de ADM. Por ejemplo, en caso de bloqueo de la bioactividad de ADM no superior al 80%, es decir aproximadamente el 20% de la bioactividad restante de ADM presente. En caso de bloqueo de la bioactividad de ADM no superior al 50%, es decir aproximadamente el 50% de la bioactividad restante de ADM presente.

25

30

Es objeto de la presente exposición un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM, en los que dicho anticuerpo, fragmento o andamiaje se une a la parte del terminal N (aa 1-21) de adrenomedulina humana.

35

En una forma de realización preferida el objeto de la presente exposición es un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM, en los que dicho anticuerpo, fragmento o andamiaje se une a la parte del terminal N (aa 1) de adrenomedulina humana.

Antecedentes

40

El péptido adrenomedulina (ADM) se describió por primera vez en 1993 (Kitamura, K., *et al.*, "Adrenomedullin: A Novel Hypotensive Peptide Isolated From Human Pheochromocytoma", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 192 (2), págs. 553-560 (1993)) como nuevo péptido hipotensor que comprende 52 aminoácidos, que había sido aislado a partir de un feocromocitoma humano; SEC. ID. nº 21. En el mismo año, se describieron también el ADNc que codifica un péptido precursor que comprende 185 aminoácidos y la secuencia de aminoácidos completa de este péptido precursor. El péptido precursor, que comprende, entre otras cosas, una secuencia señal de 21 aminoácidos en el extremo del terminal en N, es conocido como "preoadrenomedulina" (pre-proADM). En la presente descripción, todas las posiciones de los aminoácidos especificados por lo general se refieren a la pre-proADM que comprende los 185 aminoácidos. El péptido adrenomedulina (ADM) es un péptido que comprende 52 aminoácidos (SEC. ID. nº 21) y que comprende los aminoácidos 95 a 146 de la pre-proADM, de la que se forma por escisión proteolítica. Hasta la fecha, sustancialmente sólo unos pocos fragmentos de los fragmentos peptídicos formados en la escisión de la pre-proADM se han caracterizado más exactamente, en particular, la péptidos fisiológicamente activos adrenomedulina (ADM) y "MAPP", un péptido que comprende 20 aminoácidos (22-41) que sigue a los 21 aminoácidos del péptido señal en la pre-proADM. El descubrimiento y caracterización de ADM en 1993 desencadenó intensa actividad de investigación, cuyos resultados se han resumido en diversos artículos de revistas, en el contexto de la presente descripción, haciendo referencia en particular a los artículos que se encuentran en un número de "Peptides" dedicado a ADM en particular (Editorial, Takahashi, K., "Adrenomedullin: from a pheochromocytoma to the eyes", *Peptides*, vol. 22, pág. 1691 (2001)) y (Eto, T., "A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (MAPP), hypotensive and vasodilating peptides", *Peptides*, vol. 22, págs. 1693-1711 (2001)). Una nueva reseña es (Hinson, *et al.*, "Adrenomedullin, a Multifunctional Regulatory Peptide", *Endocrine Reviews*, vol. 21(2), págs. 138-167 (2000)). En las investigaciones científicas hasta la fecha, se ha descubierto, entre otras cosas, que ADM puede considerarse como un péptido regulador polifuncional. Se libera en la circulación en una forma inactiva extendida por la glicina (Kitamura, K., *et al.*, "The intermediate form of glycine-extended adrenomedullin is the major circulating molecular form in human plasma", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 244 (2), págs. 551-555 (1998)). Sólo

65

resumen). Existe también una proteína de unión (Pio, R., *et al.*, "Complement Factor H is a Serum-binding Protein for adrenomedullin, and the Resulting Complex Modulates the Bioactivities of Both Partners", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276(15), págs. 12292-12300 (2001)) que es específico para ADM y probablemente del mismo modo modula el efecto de ADM. Esos efectos fisiológicos de ADM, así como de MAPP, que son de vital importancia en las investigaciones hasta la fecha eran los efectos que influyen en la presión arterial.

Por consiguiente, ADM es un vasodilatador eficaz, y por lo tanto es posible asociar el efecto hipotensor con los segmentos peptídicos específicos en la parte del terminal C de ADM. Además, se ha constatado que el péptido MAPP más fisiológicamente activo mencionado anteriormente formado a partir de pre-proADM presenta asimismo un efecto hipotensor, incluso si parece que tiene un mecanismo de acción diferente del de ADM (véase además de los artículos de la reseña antes citados (Eto, T., "A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (MAPP), hypotensive and vasodilating peptides", *Peptides*, vol. 22, págs. 1693-1711 (2001)) y (Hinson, *et al.*, "Adrenomedullin, a Multifunctional Regulatory Peptide", *Endocrine Reviews*, vol. 21(2), págs. 138-167 (2000)) también (Kuwasako, K., *et al.*, "Purification and characterization of MAPP-12 (MAPP-20) in porcine adrenal medulla as a major endogenous biologically active peptide", *FEBS Lett*, vol. 414(1), págs. 105-110 (1997). Resumen solamente), (Kuwasaki, K., *et al.*, "Increased plasma proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in patients with essential hypertension", *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 36 (Pt. 5), págs. 622-628 (1999). Resumen solamente) o (Tsuruda, T., *et al.*, "Secretion of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide from cultured neonatal rat cardiac cells", *Life Sci.*, vol. 69 (2), págs. 239-245 (2001). Resumen solamente) y el documento EP-A2 0 622 458). Además, se ha constatado que las concentraciones de ADM que se pueden medir en la circulación y otros líquidos biológicos son, en numerosos estados patológicos, significativamente superiores a las concentraciones que se encuentran en las personas de referencia sanas. Por lo tanto, la concentración de ADM en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, enfermedades renales, trastornos de hipertensión, diabetes mellitus, en la fase aguda de choque y en la septicemia y el choque septicémico aumentan significativamente, aunque en diferentes grados. Las concentraciones MAPP también aumentan en algunos de dichos estados patológicos, pero las concentraciones en el plasma son inferiores en relación con ADM ((Eto, T., "A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (MAPP), hypotensive and vasodilating peptides", *Peptides*, vol. 22, págs. 1693-1711 (2001)); página 1702). Se sabe además que raras veces se observan altas concentraciones de ADM en septicemia, y las mayores concentraciones en el choque septicémico (véase (Eto, T., "A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (MAPP), hypotensive and vasodilating peptides", *Peptides*, vol. 22, págs. 1693-1711 (2001)) e (Hirata, *et al.*, "Increased Circulating Adrenomedullin, a Novel Vasodilatory Peptide, in Sepsis", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 81(4), págs. 1449-1453 (1996.)), (Ehlenz, K., *et al.*, "High levels of circulating adrenomedullin in severe illness: Correlation with C-reactive protein and evidence against the adrenal medulla as site of origin", *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, vol. 105, págs. 156-162 (1997)), (Tomoda, Y., *et al.*, "Regulation of adrenomedullin secretion from cultured cells", *Peptides*, vol. 22, págs. 1783-1794 (2001)), (Ueda, S., *et al.*, "Increased Plasma Levels of Adrenomedullin in Patients with Systemic Inflammatory Response Syndrome", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Vol. 160, págs. 132-136 (1999)) y (Wang, P., "Adrenomedullin and cardiovascular responses in sepsis", *Peptides*, vol. 22, págs. 1835-1840 (2001)).

Es conocido en la técnica además un método para identificar inmunorreactividad de adrenomedulina en líquidos biológicos para diagnóstico y, en particular en el ámbito del diagnóstico de septicemia, diagnóstico cardíaco y diagnóstico de cáncer. Según la invención, el péptido parcial mediorregional de la proadrenomedulina, que contiene los aminoácidos (45-92) de la preproadrenomedulina, se mide, en particular, con un inmunoanálisis que funciona con por lo menos un anticuerpo marcado que reconoce específicamente una secuencia de la mid-proADM (documento WO 2004/090546).

El documento WO-A1 2004/097423 describe el empleo de un anticuerpo contra la adrenomedulina para el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de trastornos cardiovasculares. Los tratamientos de enfermedades por bloqueo del receptor de ADM también se describen en la técnica, (por ejemplo, los documentos WO-A1 2006/027147, WO/2007/062676) dichas enfermedades pueden ser la septicemia, choque septicémico, enfermedades cardiovasculares, infecciones, enfermedades dermatológicas, enfermedades endocrinas, enfermedades metabólicas, enfermedades gastrointestinales, cáncer, inflamación, enfermedades hematológicas, enfermedades respiratorias, enfermedades del esqueleto muscular, enfermedades neurológicas o enfermedades urológicas.

Para la fase inicial de la septicemia se ha publicado que ADM mejora la función cardíaca y el suministro de sangre en el hígado, el bazo, los riñones y el intestino delgado. Los anticuerpos neutralizantes de ADM neutralizan los efectos anteriormente mencionados durante la fase inicial de la septicemia (Wang, P., "Adrenomedullin and cardiovascular responses in sepsis", *Peptides*, vol. 22, págs. 1835-1840 (2001)).

En la última fase de la septicemia, la fase hipodinámica de la septicemia, ADM constituye un factor de riesgo que está fuertemente asociado a la mortalidad de los pacientes en choque septicémico. (Schütz *et al.*, "Circulating Precursor levels of endothelin-1 and adrenomedullin, two endothelium-derived, counteracting substances, in sepsis", *Endothelium*, 14:345-351, (2007)). Los procedimientos para el diagnóstico y tratamiento de pacientes en estado crítico, por ejemplo en las fases muy tardías de la septicemia, y el empleo de endotelina y de agonistas de

endotelina con actividad vasoconstrictora para la preparación de medicamentos para el tratamiento de pacientes en estado crítico se han descrito en el documento WO-A1 2007/062676. Se describe además en el documento WO-A1 2007/062676 la utilización, en lugar de endotelina y/o agonistas de endotelina, o en combinación con los mismos, antagonistas de adrenomedulina, es decir, moléculas que impiden o atenúan la acción vasodilatadora de la adrenomedulina, por ejemplo, bloqueando sus receptores relevantes, o sustancias que impiden la unión de adrenomedulina a su receptor (por ejemplo enlazadores específicos como por ejemplo, anticuerpos que se unen a la adrenomedulina y que bloquean sus puntos de uniones al receptor; "neutralización inmunológica"). Dicha utilización, o utilización combinada, con la inclusión de una utilización por separado posterior o anterior, se ha descrito en determinados casos que es deseable por ejemplo para mejorar el éxito terapéutico, o para evitar el estrés fisiológico indeseable o efectos secundarios. Por lo tanto, se ha publicado que los anticuerpos neutralizantes de ADM pueden emplearse para el tratamiento de la septicemia en la etapa tardía de la septicemia.

La administración de ADM en combinación con proteína-1 de unión a ADM se describe para el tratamiento de la septicemia y el choque septicémico en la técnica. Se supone que el tratamiento de animales septicémicos con ADM y proteína-1 de unión a ADM impide la transición a la fase tardía de la septicemia. Se ha de señalar que, en un organismo vivo la proteína de unión a ADM (factor H del complemento) está presente en la circulación de dicho organismo en altas concentraciones (Pio *et al.*: Identification, characterization, and physiological actions of factor H as an Adrenomedullin binding Protein present in Human Plasma; *Microscopy Res. and Technique*, 55:23-27 (2002) y Martínez *et al.*:. Mapping of the Adrenomedullin-Binding domains in Human Complement factor H; *Hypertens Res.* vol. 26, Supl. (2003), S56-59).

Según la invención la proteína-1 de unión a ADM puede denominarse también proteína-1 de unión a ADM (factor H del complemento).

La administración de ADM puede de este modo ser útil en la fase inicial de una enfermedad como por ejemplo la septicemia puede ser perjudicial en una fase tardía de la septicemia. Lo contrario puede ser el caso con la administración de anticuerpos anti-ADM. Además, la administración puede ser crítica cuando se aplica ADM o anticuerpos anti-ADM.

Para otras enfermedades de bloqueo de ADM puede ser útil en cierta medida. Sin embargo, también podría ser perjudicial si ADM está totalmente neutralizada ya que una determinada cantidad de ADM puede ser necesaria para varias funciones fisiológicas. En muchas publicaciones se subrayó que la administración de ADM puede ser útil en determinadas enfermedades. A diferencia de esto en otras publicaciones se informó que ADM es potencialmente mortal cuando se administra en determinadas condiciones. El inconveniente de la técnica anterior puede superarse con los anticuerpos anti-ADM o los fragmentos de anticuerpos anti-ADM o los andamiajes sin Ig anti-ADM proporcionados por la presente invención.

Descripción de la invención

Es objeto de la invención un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para su utilización como un medicamento, en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento o dicho andamiaje es un anticuerpo no neutralizante, fragmento o andamiaje que se denomina anticuerpo, fragmento o andamiaje que se une a la parte del terminal N, aa 21, de adrenomedulina:

YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTC; (SEC. ID. nº 23).

En toda la memoria, los "anticuerpos", o "fragmentos de anticuerpo" o "andamiaje proteico sin Ig" según la invención son capaces de unirse a ADM, y por lo tanto dirigirse contra ADM, y por lo tanto pueden denominarse "anticuerpos anti-ADM", "fragmentos de anticuerpos anti-ADM" o "andamiajes proteicos sin Ig anti-ADM".

En otra forma de realización de la invención, los anticuerpos anti-ADM, los fragmentos de anticuerpos anti-ADM, o los andamiajes proteicos sin Ig anti-ADM proporcionados por la invención son capaces de unirse a ADM circulante, y por lo tanto se dirigen contra ADM circulante.

En una forma de realización específica dicho anticuerpo anti-ADM, fragmento de anticuerpo anti-ADM o andamiaje proteico sin Ig anti-ADM es un anticuerpo, fragmento o andamiaje proteico sin Ig no neutralizante. Un anticuerpo anti-ADM, fragmento de anticuerpo anti-ADM o andamiaje proteico sin Ig anti-ADM neutralizante bloquearía la bioactividad de ADM a casi el 100%, a por lo menos a más del 90%, preferentemente hasta por lo menos más de 95%.

Por el contrario, un anticuerpo anti-ADM, o fragmento de anticuerpo anti-ADM o andamiajes proteicos sin Ig anti-ADM no neutralizante bloquea la bioactividad de ADM menos del 100%, preferentemente a menos de 95%, preferentemente a menos del 90%, más preferentemente a menos del 80% e incluso más preferentemente menos del 50% (valor de referencia). Esto significa que la bioactividad restante de ADM unida al anticuerpo anti-ADM no neutralizante, o del fragmento de anticuerpo anti-ADM o del andamiaje proteico sin Ig anti-ADM sería más del 0%,

preferentemente más del 5%, preferentemente más del 10%, más preferentemente más del 20%, más preferentemente más del 50%. Esto es en el sentido de bloquear la bioactividad de ADM no más de 80% o no más del 50%, respectivamente, y por lo tanto se ha de entender como bloqueo limitado de la bioactividad de ADM por el respectivo enlazador ADM, que es un anticuerpo anti-ADM o anti-ADM fragmento de anticuerpo o andamiaje proteico sin Ig anti-ADM.

Se ha entendido que dicho bloqueo limitado de la bioactividad de ADM se produce incluso en exceso de concentración del anticuerpo, fragmento de anticuerpo o andamiaje proteico sin Ig, lo que significa un exceso del anticuerpo, fragmento o andamiaje con relación a ADM. Dicho bloqueo limitado es una propiedad intrínseca del propio enlazador de ADM. Esto significa que dicho anticuerpo, fragmento o andamiaje presenta una inhibición máxima del 80% o 50%, respectivamente. En una forma de realización preferida dicho anticuerpo anti-ADM, fragmento de anticuerpo anti-ADM o andamiaje sin Ig anti-ADM bloquearían la bioactividad de ADM hasta por lo menos 5%. Esto significa - implícitamente - que aproximadamente el 95% de bioactividad de ADM restante está presente.

Es objeto de la presente exposición un anticuerpo contra adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo contra adrenomedulina para su utilización en un tratamiento de una enfermedad crónica o aguda, en el que dicho anticuerpo o fragmento es

- un anticuerpo estabilizante de ADM o un fragmento de anticuerpo contra adrenomedulina que aumenta el tiempo medio de retención $t_{1/2}$ de adrenomedulina en el suero, la sangre, el plasma, por lo menos el 10%, preferentemente por lo menos, el 50%, más preferentemente > 50%, aún más preferentemente el 100% y/o
- en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de anticuerpo contra adrenomedulina bloquea la bioactividad de ADM a menos del 80%, preferentemente a menos del 50%.

Es objeto de la presente invención un anticuerpo contra adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo contra adrenomedulina para su utilización en un tratamiento de una enfermedad crónica o aguda, en el que dicho anticuerpo o fragmento se une a la parte del terminal en N (aa 1-21) de adrenomedulina humana.

En una forma de realización preferida, el objeto de la presente invención es un anticuerpo contra adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo contra adrenomedulina para su utilización en un tratamiento de una enfermedad crónica o aguda, en el que dicho anticuerpo o fragmento se une al extremo del terminal en N de la adrenomedulina humana.

En este contexto una(s) molécula(s), que es/son un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo o un andamiaje proteico sin Ig con "actividad no neutralizante anti-ADM", denominados en conjunto en la presente memoria por simplicidad anticuerpo anti-ADM, fragmento de anticuerpo, o andamiaje proteico sin Ig "no neutralizante", que por ejemplo bloquea la bioactividad de ADM a menos del 80%, se define como

- una molécula o moléculas que se unen a ADM, que tras la adición de un cultivo de una línea celular eucariota, que expresa el receptor ADM recombinante humano funcional integrado por CRLR (receptor semejante al receptor de calcitonina) y RAMP3 (proteína 3 modificadora de la actividad del receptor), reduce la cantidad de cAMP producido por la estirpe celular mediante la acción del péptido sintético de ADM humana añadido en paralelo, en el que dicha ADM sintética humana se añade en una cantidad que, en ausencia del anticuerpo no neutralizante que debe analizarse, conduce a la estimulación mitad de la máxima de la síntesis de cAMP, en el que la reducción de cAMP por dicha(s) molécula(s) que se unen a ADM tiene lugar en una medida, que no es más del 80%, incluso cuando la(s) molécula(s) no neutralizante(s) que se unen a ADM que deben analizarse se añade en una cantidad, que es 10 veces más que la cantidad, que es necesaria para obtener la reducción máxima de la síntesis de cAMP que puede obtenerse con el anticuerpo no neutralizante que debe analizarse.

La misma definición se aplica a los otros intervalos; 95%, 90%, 50% etc.

La bioactividad se define como el efecto que una sustancia recibe en un organismo vivo, tejido, órgano o unidad funcional *in vivo* o *in vitro* (por ejemplo, en un análisis) después de su interacción. En caso de bioactividad de ADM éste puede ser el efecto de ADM en un análisis funcional de cAMP receptor de adrenomedulina recombinante humana. Por lo tanto, según la presente invención bioactividad se define a través de un análisis funcional de cAMP receptor de adrenomedulina. Las siguientes etapas se pueden realizar para determinar la bioactividad de ADM en dicho análisis:

- Las curvas de respuesta a la dosis se realizan con ADM en dicho análisis funcional de cAMP receptor de adrenomedulina recombinante humana.
- La concentración de ADM de la estimulación de la mitad máxima de cAMP puede calcularse.

- En las curvas de respuesta a la dosis las concentraciones de ADM que estimulan la mitad máxima constante de cAMP (hasta 100 µg/ml de concentración final) se llevan a cabo por un anticuerpo estabilizante contra ADM o un fragmento de anticuerpo estabilizante contra adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig estabilizante de adrenomedulina, respectivamente.

5 Una inhibición máxima en dicho bioanálisis de ADM del 50% significa que dicho anticuerpo anti-ADM o dicho fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o dicho andamiaje proteico sin Ig anti-adrenomedulina, respectivamente, bloquea la bioactividad al 50% de los valores de referencia. Una inhibición máxima en dicho bioanálisis de ADM del 80% significa que dicho anticuerpo anti-ADM o dicho fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o dicho andamiaje proteico sin Ig anti-adrenomedulina, respectivamente, bloquea la bioactividad de ADM al 80%. Esto es en el sentido de bloquear la bioactividad de ADM a no más del 80%. Esto significa que aproximadamente el 20% de bioactividad de ADM restante continúa estando presente.

15 Sin embargo, por la presente memoria y en el contexto anterior la expresión "bloquea la bioactividad de ADM" en relación con los anticuerpos anti-ADM, fragmentos de anticuerpos anti-ADM y andamiajes proteicos sin Ig anti-ADM expuestos en la presente memoria debe entenderse como mera disminución de la bioactividad de ADM, preferentemente disminuyendo la bioactividad administración circulante desde el 100% al 20% de bioactividad de ADM restante al máximo, preferentemente disminuyendo la bioactividad de ADM desde el 100% al 50% de bioactividad de ADM restante; pero en cualquier caso hay bioactividad de ADM restante que puede determinarse como se detalló anteriormente.

La bioactividad de ADM puede determinarse en un análisis funcional de cAMP receptor de adrenomedulina recombinante humana (bioanálisis de adrenomedulina) según el ejemplo 2.

25 El anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) es un anticuerpo que se une específicamente a ADM, el fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina es un fragmento de un anticuerpo contra ADM en el que dicho fragmento se une específicamente a ADM. Un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM es un andamiaje proteico sin Ig que se une específicamente a ADM. Específicamente la unión a ADM permite también la unión a otros antígenos. Esto quiere decir que esta especificidad no excluye que el anticuerpo pueda reaccionar en cruz con otros polipéptidos que aquellos contra los que se ha producido. Esto corresponde también a la especificidad del fragmento de anticuerpo anti-ADM o al andamiaje proteico sin Ig anti-ADM según la invención.

35 Sorprendentemente, se ha comprobado que los anticuerpos anti-ADM no neutralizantes o los fragmentos de anticuerpo anti-ADM no neutralizante o unos andamiajes proteicos sin Ig anti-ADM no neutralizantes ofrecen una ventaja terapéutica significativa con respecto a los neutralizantes.

40 En una forma de realización específica se prefiere utilizar un anticuerpo anti-ADM, un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM según la presente invención, en la que dicho anticuerpo anti-adrenomedulina o dicho fragmento de anticuerpo contra adrenomedulina o el andamiaje proteico sin Ig anti-ADM es un anticuerpo estabilizante de administración, un fragmento de anticuerpo estabilizante de adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM estabilizante de adrenomedulina que aumenta la vida media ($t_{1/2}$; tiempo medio de retención) de adrenomedulina en el suero, la sangre, el plasma, por lo menos el 10%, preferentemente por lo menos, el 50%, más preferentemente > 50%, aún más preferentemente > 100%.

45 La vida media (tiempo medio de retención) de ADM puede determinarse en el plasma humano en ausencia y presencia de un anticuerpo estabilizante de ADM, un fragmento de anticuerpo estabilizante de adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig estabilizante de adrenomedulina, respectivamente, utilizando un inmunoanálisis para el análisis cuantitativo de ADM.

50 Las etapas siguientes pueden llevarse a cabo:

- La ADM puede diluirse en plasma humano en citrato en ausencia y presencia de un anticuerpo estabilizante de ADM o un andamiaje proteico sin Ig estabilizante de adrenomedulina, respectivamente, y puede incubarse a 24°C.
- Se toman alícuotas en puntos de tiempo seleccionados (por ejemplo en 24 horas) y la degradación de ADM puede detenerse en dichas alícuotas por congelación a -20°C.
- La cantidad de ADM puede determinarse directamente por un inmunoanálisis de hADM, si el análisis seleccionado no está influido por el anticuerpo estabilizante. Alternativamente, la alícuota puede tratarse con agentes desnaturalizantes (como HCl) y, después de la depuración (por ejemplo por centrifugación) el pH de la muestra puede neutralizarse y la ADM analizarse cuantitativamente por un inmunoanálisis de ADM. Alternativamente, pueden emplearse tecnologías distintas del inmunoanálisis (por ejemplo rpHPLC) para análisis cuantitativo de ADM.

- La vida media de ADM se calcula para ADM incubada en ausencia y presencia de un anticuerpo estabilizante de ADM, de un fragmento de anticuerpo estabilizante de adrenomedulina o de un andamiaje proteico sin Ig estabilizante de adrenomedulina, respectivamente.

- 5
- El aumento de la vida media se calcula para la ADM estabilizada en comparación con la ADM que se ha incubado en ausencia de un anticuerpo estabilizante de ADM, de un fragmento de anticuerpo estabilizante de adrenomedulina o de un andamiaje proteico sin Ig estabilizante de adrenomedulina.

10 Un incremento al doble de la vida media de ADM es un aumento de la vida media del 100%.

La vida media (tiempo medio de retención) se define como el período durante el cual la concentración de un producto químico o fármaco especificado tarda en reducirse a la mitad de su concentración de referencia en el fluido o sangre especificado.

- 15 Un análisis que puede utilizarse para la determinación de la vida media (tiempo medio de retención) de adrenomedulina en el suero, la sangre y el plasma se describe en el ejemplo 3.

Un anticuerpo según la presente invención es una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos comprenden los genes de la región constante kappa, lambda, alfa (IgA), gamma (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), delta (IgD), épsilon (IgE) y mu (IgM), así como los innumerables genes de la región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras de inmunoglobulina completa son generalmente de aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos de longitud. Las cadenas pesadas de inmunoglobulina completa son generalmente de aproximadamente 50 Kd o de 446 aminoácidos de longitud. Las cadenas ligeras están codificadas por un gen de la región variable en el terminal NH₂ (aproximadamente de 110 aminoácidos de longitud) y un gen de la región constante kappa o lambda en el terminal COOH. Las cadenas pesadas están codificadas de manera similar por un gen de la región variable (aproximadamente 116 aminoácidos de longitud) y uno de los demás genes de región constante.

30 La unidad estructural básica de un anticuerpo es generalmente un tetrámero que consiste en dos pares idénticos de cadenas de inmunoglobulina, teniendo cada par una cadena ligera y una cadena pesada. En cada par, las regiones variables de cadena ligera y pesada se unen a un antígeno, y las regiones constantes intervienen como mediadoras de funciones efectoras. Las inmunoglobulinas también existen en diversas otras formas incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y (Fab')₂, así como anticuerpos híbridos bifuncionales y cadenas individuales (por ejemplo, Lanzavecchia *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 17:105,1987; Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:5879-5883, 1988; Bird *et al.*, *Science* 242:423-426, 1988; Hood *et al.*, *Immunology*, Benjamin, NY, 2^a ed., 1984; Hunkapiller y Hood, *Nature* 323:15-16,1986). Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina incluye una región marco interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR) (véase, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, E. Kabat *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, 1983). Como se señaló anteriormente, las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Un inmunocomplejo es un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo híbrido, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano o fragmento de anticuerpo funcional, unido específicamente al antígeno.

45 Los anticuerpos híbridos son anticuerpos cuyos genes de la cadena ligera y pesada se han construido, por lo general por ingeniería genética, a partir de genes de la región variable y constante de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos, tales como kappa y gamma 1 o gamma 3. En un ejemplo, un anticuerpo híbrido terapéutico es por tanto una proteína híbrida compuesta de la variable o dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de ratón y la constante o dominio efector de un anticuerpo humano, aunque pueden utilizarse otras especies de mamíferos o la región variable se pueden producir por técnicas moleculares. Los procedimientos de preparación de anticuerpos híbridos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, véase la patente US n° 5.807.715. Una inmunoglobulina "humanizada" es una inmunoglobulina que incluye una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (tal como un ratón, rata o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco que se denomina "receptor". En una forma de realización, todas las CDR son de la inmunoglobulina donante en una inmunoglobulina humanizada. Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir, por lo menos aproximadamente 85-90%, tal como aproximadamente 95% o más de identidad. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de secuencias naturales de inmunoglobulina humana. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina con cadena ligera humanizada y una cadena pesada humanizada. Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno como anticuerpo donante que proporciona las CDR. El marco receptor de una inmunoglobulina humanizada o anticuerpo puede tener un número limitado de sustituciones por aminoácidos tomados del marco donante. Los anticuerpos humanizados u otros monoclonales pueden tener sustituciones conservadoras adicionales de aminoácidos que no tienen sustancialmente

ningún efecto sobre la unión de antígeno u otras funciones de la inmunoglobulina. Las sustituciones conservadoras a modo de ejemplo son aquellas tales como gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; y phe, tyr. Las inmunoglobulinas humanizadas se pueden construir por ingeniería genética (por ejemplo, véase la patente US nº 5.585.089.). Un anticuerpo humano es un anticuerpo en el que los genes de las cadenas ligera y pesada son de origen humano. Los anticuerpos humanos pueden generarse utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Los anticuerpos humanos pueden producirse por inmortalización de un linfocito B humano que segrega el anticuerpo de interés. La inmortalización puede llevarse a cabo, por ejemplo, por infección por EBV o por fusión de un linfocito B humano con una célula de mieloma o hibridoma para producir una célula de trioma. Los anticuerpos humanos también pueden producirse por métodos de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Dower *et al.*, publicación PCT nº WO91/17271; McCafferty *et al.*, publicación PCT nº WO92/001047; y Winter, publicación PCT nº WO92/20791), o se selecciona de una biblioteca combinatoria de anticuerpos monoclonales humanos (véase la página web Morphosys). Los anticuerpos humanos también se pueden preparar mediante el empleo de animales transgénicos portadores de un gen de inmunoglobulina humana (por ejemplo, véase Lonberg *et al.*, publicación PCT nº WO93/12227; y Kucherlapati, publicación PCT nº WO 91/10741).

Por lo tanto, el anticuerpo anti-ADM puede tener los formatos conocidos en la técnica. Son ejemplos los anticuerpos humanos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos híbridos, anticuerpos injertados a CDR. En una forma de realización preferida, los anticuerpos según la presente invención son anticuerpos producidos de forma recombinante como por ejemplo, IgG, un inmunoglobulina completa típica o fragmentos de anticuerpos que contienen por lo menos el dominio F variable de la cadena pesada y/o ligera como por ejemplo anticuerpos acoplados químicamente (fragmento de unión a antígeno) entre otros pero sin limitarse a fragmentos Fab, incluyendo minicuerpos Fab, anticuerpo Fab de una sola cadena, anticuerpo Fab monovalente con etiquetas de epítipo, por ejemplo, Fab-V5Sx2; Fab bivalente (mini-anticuerpo) dimerizado con el dominio CH3; Fab bivalente o Fab polivalente, por ejemplo, formados por polimerización con la ayuda de un dominio heterólogo, por ejemplo, por dimerización de dominios dHLX, por ejemplo Fab-dHLX-FSx2; fragmentos F(ab')₂, fragmentos scFv polivalentes polimerizados y/o multiespecíficos, diacuerpos bivalentes y/o biespecíficos, BITE[®] (acoplador biespecífico de linfocitos T), anticuerpos trifuncionales, anticuerpos polivalentes, por ejemplo, de una clase diferente de G; anticuerpos de un solo dominio, por ejemplo, derivados de inmunoglobulinas de camélidos o peces y muchos otros.

Además de los anticuerpos anti-ADM otros andamiajes de biopolímero son bien conocidas en la técnica para acomplejar una molécula diana y se han utilizado para la generación de biopolímeros diana muy específicos. Son ejemplos aptámeros, espiégelmeros, anticalins y conotoxinas. Para ilustración de formatos de anticuerpos véanse las Fig. 1a, 1b y 1c.

En una forma de realización preferida, el formato de anticuerpo anti-ADM se selecciona de entre el grupo que comprende el fragmento Fv, el fragmento scFv, el fragmento Fab, el fragmento scFab, el fragmento F(ab)₂ y la proteína de fusión scFv-Fc. En otra forma de realización preferida, el formato de anticuerpo se selecciona de entre el grupo que comprende el fragmento scFab, el fragmento Fab, el fragmento scFv y conjugados optimizados en biodisponibilidad de los mismos, tales como los fragmentos PEGilados. Uno de los formatos más preferidos es el formato scFab.

Andamiajes proteicos sin Ig pueden ser andamiajes proteicos y pueden utilizarse como miméticos de anticuerpos ya que son capaces de unirse a ligandos o antígenos. Los andamiajes proteicos sin Ig pueden seleccionarse de entre el grupo que comprende andamiajes proteicos sin Ig a base de tetranectina (por ejemplo, descritos en el documento de EE.UU. 2010/0028995), andamiajes de fibronectina por ejemplo descritos en la patente EP 1.266.025; andamiajes de lipocalina ((por ejemplo, descritos en el documento WO 2011/154420); andamiajes de ubiquitina (por ejemplo, descritos en el documento WO 2011/073214), andamiajes de transferencia (por ejemplo, descritos en el documento de EE.UU. nº 2004/0023334), andamiajes de proteína A (por ejemplo, descritos en la patente EP 2231860), andamiajes a base de repeticiones de anquirina (por ejemplo, descritos en el documento WO 2010/060748), andamiajes de microproteínas preferentemente microproteínas que forman un nudo de cistina) (por ejemplo, descritos en la patente EP 2314308), andamiajes del dominio Fyn SH3 (por ejemplo descritos en el documento WO 2011/023685), andamiajes del dominio EGFR-A (por ejemplo, descritos en el documento WO 2005/040229) y andamiajes del dominio Kunitz (por ejemplo descritos en la patente EP 1941867).

En una forma de realización preferida de la invención se pueden producir anticuerpos según la presente invención de la manera siguiente.

Se inmunizó un ratón Balb/c con 100 µg de conjugado ADM-péptido-BSA los días 0 y 14 (emulsionado en 100 µl de adyuvante completo de Freund) y 50 µg los días 21 y 28 (en 100 µl de adyuvante incompleto de Freund). Tres días antes de realizar el experimento de fusión, el animal recibió 50 µg de conjugado disuelto en 100 µl de solución salina, administrada en forma de una inyección intraperitoneal y una intravenosa.

Los esplenocitos de ratón inmunizado y células de la estirpe celular de mieloma SP2/0 se fusionaron con 1 ml de polietilenglicol al 50% durante 30 s a 37°C. Después del lavado, las células se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Se seleccionaron clones híbridos por cultivo en medio HAT [medio de cultivo RPMI 1640 enriquecido con 20% de suero de ternera fetal y complemento HAT]. Después de dos semanas se reemplazó el medio HAT con

medio HT durante tres pasajes seguido de vuelta al medio de cultivo celular normal.

En los sobrenadantes del cultivo celular se detectaron en primer lugar anticuerpos de IgG específicos tres semanas después de la fusión. Los microcultivos que dieron positivos se transfirieron a placas de 24 pocillos para la propagación. Después de volver a analizar, los cultivos seleccionados se clonaron y se volvieron a clonar utilizando la técnica de dilución limitante y se determinaron los isotipos. (Véase también Lane, R.D. (1985) A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas. *J. Immunol. Meth.* 81: 223-228; Ziegler, B. *et al.* (1996) glutamato descarboxilasa (GAD) no es detectable en la superficie de células de los islotes de rata examinados por citofluorometría y citotoxicidad mediada por anticuerpos dependiente de complemento de anticuerpos monoclonal GAD, *Horm. Metab. Res.* 28: 11-15).

Pueden producirse anticuerpos mediante la presentación en fagos según el procedimiento siguiente:

Se utilizaron las bibliotecas HAL7/8 de genes de anticuerpos humanos sin tratamiento previo para el aislamiento de dominios F variables (scFv) monocatenarios recombinantes contra el péptido adrenomedulina. Las bibliotecas de genes de anticuerpos se cribaron con una estrategia adhesión celular sobre plástico que comprende el empleo de péptidos que contienen una etiqueta de biotina unida mediante dos espaciadores diferentes a la secuencia del péptido adrenomedulina. Una mezcla de rondas de adhesión celular sobre plástico utilizando antígeno unido de manera no específica y antígeno unido a estreptavidina se utiliza para minimizar el fondo de enlazadores no específicos. Los fagos eluidos de la tercera ronda de adhesión celular sobre plástico se han utilizado para la generación de cepas de *E. coli* que expresan scFv monoclonal. El sobrenadante de cultivo de estas cepas clonales se ha utilizado directamente para un ensayo de ELISA para antígenos (véase también Hust, M., Meyer, T., Voedisch, B., Rülker, T., Thie, H., El-Ghezal, A., Kirsch, M.I., Schütte, M., Helmsing, S., Meier, D., Schirrmann, T., Dübel, S., 2011. A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. *Journal of Biotechnology* 152, 159-170; Schütte, M., Thullier, P., Pelat, T., Wezler, X., Rosenstock, P., Hinz, D., Kirsch, M.I., Hasenberg, M., Frank, R., Schirrmann, T., Gunzer, M., Hust, M., Dübel, S., 2009. Identification of a putative Crf splice variant and generation of recombinant antibodies for the specific detection of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 4, e6625).

La humanización de anticuerpos murinos puede llevarse a cabo según el procedimiento siguiente:

Para la humanización de un anticuerpo de origen murino en la secuencia del anticuerpo se analiza la interacción estructural de las regiones marco (FR) con las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y el antígeno. Basándose en el modelado estructural se selecciona una FR apropiada de origen humano y las secuencias de CDR murinas se trasplantan en la FR humana. Las variaciones en la secuencia de aminoácidos de las CDR o FR se pueden introducir para recuperar las interacciones estructurales, que fueron suprimidas por el cambio de especie para las secuencias de FR. Esta recuperación de las interacciones estructurales se puede conseguir mediante un método al azar utilizando bibliotecas de presentación en fagos o mediante un método dirigido guiado por modelado molecular. (Almagro J.C., Fransson J., 2008. Humanization of antibodies. *Front Biosci.* 1 de enero 2008; 13:1619-33).

En una forma de realización preferida, el formato de anticuerpo contra ADM se selecciona de entre el grupo que comprende el fragmento Fv, el fragmento scFv, el fragmento Fab, el fragmento scFab, el fragmento F(ab)₂ y la proteína de fusión scFv-Fc. En otra forma de realización preferida, el formato de anticuerpo se selecciona de entre el grupo que comprende el fragmento scFab, el fragmento Fab, el fragmento scFv y conjugados optimizados en biodisponibilidad de los mismos, tales como fragmentos PEGilados. Uno de los formatos más preferidos es el formato scFab.

En otra forma de realización preferida, el anticuerpo anti-ADM, el fragmento de anticuerpo anti-ADM o el andamiaje proteico sin Ig anti-ADM es un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo o un andamiaje proteico sin Ig.

En una forma de realización preferida, el anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM se dirige a un epítipo de por lo menos 5 aminoácidos de longitud contenidos en ADM y puede unirse al mismo.

En una forma de realización específica, el anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM se dirige a un epítipo de por lo menos 4 aminoácidos de longitud contenidos en ADM y puede unirse al mismo.

En una forma de realización específica de la invención, se proporciona el anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para su utilización como medicamento en el que dicho anticuerpo, fragmento o andamiaje no es una proteína -1 de unión a ADM (factor H del complemento).

En una forma de realización de la invención, se proporciona el anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que se

une a adrenomedulina para su utilización como medicamento en el que dicho anticuerpo, fragmento o andamiaje se une a una región de preferentemente por lo menos 4, o por lo menos 5 aminoácidos en la secuencia de aa 1-21 de la ADM humana madura.

5 SEC. ID. nº 23
YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC.

10 Por lo tanto, en la forma de realización de la presente invención dicho anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM se une a una región de ADM que se encuentra en la parte del terminal en N (aa 1-21) de adrenomedulina, (véase la Fig. 2).

15 En otra forma de realización preferida, dicho anticuerpo o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM reconoce y se une al extremo del terminal N (aa 1) de adrenomedulina. Extremo del terminal N significa que el aminoácido 1, es decir "Y" de la SEC. ID. nº 21 o nº 23; es obligatorio para la unión de anticuerpos. Dicho anticuerpo anti-ADM, fragmento de anticuerpo anti-ADM o andamiaje proteico sin Ig anti-ADM no se unirían a la adrenomedulina con el terminal N ampliado ni con el terminal N modificado ni a la adrenomedulina con el terminal N degradado.

20 Es preferible también utilizar un anticuerpo contra ADM o un fragmento de anticuerpo contra adrenomedulina según la presente invención, en el que dicho anticuerpo o un fragmento de anticuerpo contra adrenomedulina es un anticuerpo estabilizante de ADM o un fragmento de anticuerpo contra adrenomedulina estabilizante de ADM que aumenta el $t_{1/2}$; tiempo medio de retención de adrenomedulina en el suero, sangre, plasma por lo menos el 10%, preferentemente por lo menos el 50%, más preferentemente > 50%, aún más preferentemente > 100%. Un ensayo que puede utilizarse para la determinación del tiempo medio de retención de adrenomedulina en el suero, sangre, plasma se describe en el ejemplo 3.

30 Es preferible también utilizar un anticuerpo contra ADM o un fragmento de anticuerpo contra adrenomedulina según la presente invención, en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de anticuerpo contra adrenomedulina bloquea la bioactividad de ADM a menos el 80%, preferentemente menos del 50%.

35 En una forma de realización preferida un anticuerpo modulador o un fragmento de anticuerpo modulador contra adrenomedulina se utiliza en el tratamiento de la septicemia. Un anticuerpo modulador o un fragmento de anticuerpo modulador contra adrenomedulina aumenta la bioactividad de ADM en la fase inicial de la septicemia y reduce los efectos dañinos de ADM en la fase tardía de la septicemia. Un anticuerpo "modulador" o un fragmento de anticuerpo modulador contra adrenomedulina que aumenta el tiempo medio de retención $t_{1/2}$ de adrenomedulina en el suero, sangre, plasma por lo menos el 10%, preferentemente por lo menos el 50%, más preferentemente > 50%, aún más preferentemente > 100% y bloquea la bioactividad de ADM a menos el 80%, preferentemente menos del 50%.

40 En otra forma de realización específica conforme a la invención, el anticuerpo anti-ADM o fragmento de anticuerpo anti-ADM o andamiaje proteico sin Ig anti-ADM proporcionado en la presente memoria no se une a la porción del terminal C de ADM, es decir, los aa 43-52 de ADM (SEC. ID. nº 25)

45 PRSKISPQGY-NH2
(SEC. ID. nº 25)

50 En una forma de realización específica un anticuerpo anti-ADM modulador o un fragmento de anticuerpo modulador anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig moduladora anti-adrenomedulina según la presente invención se utiliza para el tratamiento de pacientes para prevenir o tratar enfermedades o afecciones, por ejemplo para su utilización en la prevención o en el tratamiento o prevención de una enfermedad aguda o crónica o estado agudo de un paciente.

55 Dicho anticuerpo anti-ADM modulador o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina modulador o un andamiaje proteico sin Ig moduladora anti-adrenomedulina puede ser especialmente útil en el tratamiento de la septicemia. Un anticuerpo anti-ADM modulador o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina modulador o un andamiaje proteico sin Ig anti-adrenomedulina modulador mejora la bioactividad de ADM en la fase temprana de la septicemia y reduce los efectos dañinos de ADM en la fase tardía de la septicemia.

60 Un anticuerpo "modulador" o un fragmento de anticuerpo modulador contra adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig modulador contra adrenomedulina es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo o un andamiaje proteico sin Ig que aumenta la vida media ($t_{1/2}$ tiempo medio de retención) de adrenomedulina en el suero, sangre, plasma, por lo menos el 10%, preferentemente por lo menos, 50%, más preferentemente > 50%, aún más preferentemente > 100% y bloquea la bioactividad de ADM a menos del 80%, preferentemente menos de 50% y en el que la bioactividad de administración está bloqueada a por lo menos el 5%. Estos valores relacionados con la vida media y el bloqueo de la bioactividad han de entenderse en relación con los análisis anteriormente mencionados a fin de determinar estos valores. Debe entenderse que dicho anticuerpo modulador o un fragmento de anticuerpo modulador contra adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig modulador contra adrenomedulina es un anticuerpo o un fragmento

de anticuerpo o un andamiaje proteico sin Ig que se une a ADM.

Cabe destacar que el bloqueo de la bioactividad de ADM es en el sentido de no superar el 80%, y por lo tanto el 20% de bioactividad de ADM restante. Lo mismo se aplica al bloqueo de la bioactividad de ADM a no más del 50%, y por lo tanto al 50% de bioactividad de ADM restante.

Es objeto de la presente exposición un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM, en el que dicho anticuerpo, fragmento o andamiaje es

- un anticuerpo estabilizante de ADM, un fragmento de anticuerpo estabilizante contra adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig estabilizante contra ADM que aumenta el tiempo medio de retención $t_{1/2}$ de adrenomedulina en el suero, la sangre, el plasma, por lo menos el 10%, preferentemente por lo menos, el 50%, más preferentemente > 50%, aún más preferentemente el 100% y/o
- en el que dicho anticuerpo anti-adrenomedulina, dicho fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o dicho andamiaje proteico sin Ig anti-ADM bloquea la bioactividad de ADM a menos del 80%, preferentemente a menos del 50%.

Lo indicado anteriormente hace referencia al sentido de bloquear la bioactividad de ADM de no más del 80% o no más del 50%, respectivamente, y por lo tanto debe entenderse como bloqueo limitado de la bioactividad de ADM por el respectivo enlazador de ADM, que es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un andamiaje proteico sin Ig estabilizador contra ADM, respectivamente.

Dicho anticuerpo modulador o un fragmento de anticuerpo modulador contra adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig contra adrenomedulina moduladora ofrece la ventaja de que se facilita la posología de administración. La combinación de bloquear parcialmente o reducir parcialmente la bioactividad de adrenomedulina y aumentar la vida media *in vivo* (aumentando la bioactividad de adrenomedulina) conduce a la simplicidad beneficiosa de la posología del anticuerpo anti-adrenomedulina o de un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o del andamiaje proteico sin Ig anti-adrenomedulina. En una situación de exceso de adrenomedulina endógena (estimulación máxima, fase de la septicemia tardía, choque, fase hipodinámica) el efecto de disminución de la actividad es el mayor impacto del anticuerpo, fragmento o andamiaje, lo que limita el efecto (negativo) de la adrenomedulina. En caso de concentraciones bajas o normales de adrenomedulina endógena, el efecto biológico de un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM es una combinación de reducción (por bloqueo parcial) y aumento al aumentar la vida media de la adrenomedulina. Si el efecto de la vida media es más fuerte que el efecto de bloqueo, la actividad biológica neta de la adrenomedulina endógena se aumenta favorablemente en las fases iniciales de la septicemia (adrenomedulina baja, fase hiperdinámica). Por lo tanto, el anticuerpo anti-adrenomedulina o el fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o el andamiaje proteico sin Ig anti-adrenomedulina no neutralizantes y moduladores actúa como un tampón de bioactividad de ADM para mantener la bioactividad de ADM dentro de un determinado intervalo fisiológico.

Por lo tanto, la dosis del anticuerpo/fragmento/andamiaje en por ejemplo la septicemia puede seleccionarse de entre una concentración excesiva, debido a que ambas fases de la septicemia (fases temprana y tardía) se benefician de tratamiento excesivo con un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM en el caso de un efecto modulador. Medios excesivos: La concentración de anticuerpo anti-adrenomedulina o de un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o del andamiaje proteico sin Ig anti-ADM es superior a la adrenomedulina endógena durante la fase tardía (choque) de, por ejemplo septicemia. Esto quiere decir, en el caso de la posología de un anticuerpo modulador o de un fragmento de anticuerpo modulador o de un andamiaje proteico sin Ig modulador en la septicemia puede ser la siguiente:

La concentración de adrenomedulina en el choque septicémico es de 226 ± 66 fmol/ml (Nishio *et al.*, "Increased plasma concentrations of adrenomedullin correlate with relaxation of vascular tone in patients with septic shock.", *Crit. Care Med.* 1997, 25(6):953-7), una concentración equimolar de anticuerpo o fragmento o andamiaje es $42,5 \mu\text{g/l}$ de sangre, (referido a un volumen de 6 l de sangre/80 kg de peso corporal) $3,2 \mu\text{g/kg}$ peso corporal. El exceso quiere decir por lo menos el doble (media) de la concentración de adrenomedulina del choque septicémico, por lo menos > $3 \mu\text{g}$ de anticuerpo anti-adrenomedulina o de un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o de andamiaje proteico sin Ig anti-ADM/kg de peso corporal, se prefiere por lo menos $6,4 \mu\text{g}$ de anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o de un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM/kg de peso corporal. Se prefiere > $10 \mu\text{g/kg}$, más preferentemente > $20 \mu\text{g/kg}$, aún más preferentemente > $100 \mu\text{g}$ de anticuerpo anti-adrenomedulina o de un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o de un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM/kg de peso corporal. Esto puede aplicarse a otras enfermedades graves y agudas además del choque septicémico.

Además, en una forma de realización de la invención un anticuerpo anti-adrenomedulina ADM, un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM es mono-específico.

Anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) mono-específico o fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina

monoespecífico o andamiaje proteico sin Ig anti-ADM significa que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo o andamiaje proteico sin Ig se une a una región específica que comprende preferentemente al menos 4, o al menos 5 aminoácidos dentro de la ADM objetivo. El anticuerpo monoespecífico anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina monoespecífico o el andamiaje proteico sin Ig anti-ADM monoespecífico son anticuerpos anti-adrenomedulina (ADM) o fragmentos de anticuerpo anti-adrenomedulina o andamiajes proteicos sin Ig anti-ADM que tienen todos afinidad con el mismo antígeno.

En otra forma de realización especial, el anticuerpo anti-ADM o el fragmento de anticuerpo que se une a ADM es un anticuerpo monoespecífico. El término "monoespecífico" significa que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a una región específica que comprende preferentemente por lo menos 4, o preferentemente por lo menos 5 aminoácidos con el ADM objetivo. Los anticuerpos o fragmentos monoclonales son anticuerpos o fragmentos que tienen todos ellos afinidad con el mismo antígeno. Los anticuerpos monoclonales son monoespecíficos, pero los anticuerpos monoespecíficos pueden ser producidos también por otros medios que no sean producirlos a partir de una célula germinal común.

En una forma de realización específica de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo. En una forma de realización de la invención, el anticuerpo anti-ADM o el fragmento de anticuerpo anti-ADM es un anticuerpo humano o humanizado o derivados de los mismos. En una forma de realización específica una o más CDR (murinas) se injertan en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humano.

Es objeto de la presente invención en un aspecto un anticuerpo injertado con CDR humana o fragmento de anticuerpo del mismo que se une a ADM, en el que el anticuerpo injertado con CDR humana o fragmento de anticuerpo del mismo comprende una cadena pesada de anticuerpo (cadena H) que comprende

SEC. ID. nº 1
GYTFSTRYW

SEC. ID. nº 2
ILPGSGST

y/o

SEC. ID. nº 3
TEGYEYDGFYD

y/o comprende además una cadena ligera de anticuerpo (cadena L) que comprende:

SEC. ID. nº 4
QSIVYSNGNTY

SEC. ID. nº 5
RVS

y/o

SEC. ID. nº 6
FQGSHIPYT.

En una forma de realización específica de la invención es objeto de la presente invención un anticuerpo monoclonal humano que se une a ADM o un fragmento de anticuerpo del mismo en el que la cadena pesada comprende por lo menos una CDR seleccionada de entre el grupo que comprende:

SEC. ID. nº 1
GYTFSTRYW

SEC. ID. nº 2
ILPGSGST

SEC. ID. nº 3
TEGYEYDGFYD

y comprendiendo la cadena ligera por lo menos una CDR seleccionada de entre el grupo que comprende:

SEC. ID. nº 4
QSIVYSNGNTY

SEC. ID. nº 5
RVS

5 SEC. ID. nº 6
FQGSHIPYT.

En una forma de realización más específica de la invención el objeto de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano que se une a ADM o un fragmento de anticuerpo del mismo en el que la cadena pesada comprende las secuencias

10 SEC. ID. nº 1
GYTFSRYW

15 SEC. ID. nº 2
ILPGSGST

SEC. ID. nº 3
TEGYEYDGFYD

20 y comprendiendo la cadena ligera las secuencias

SEC. ID. nº 4
QSIVYSNGNTY

25 SEC. ID. nº 5
RVS

SEC. ID. nº 6
FQGSHIPYT.

30 En una forma de realización muy específica el anticuerpo contra ADM tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo que comprende: las SEC. ID. nº 7, nº 8, nº 9, nº 10, nº 11, nº 12, nº 13 y nº 14:

SEC. ID. nº 7; AM-VH-C

35 QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSRYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSG
TNYNEKFKGKATITADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGFYDYGQGT
LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEC ID nº: 8; AM-VH1

40 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGRILPGSG
STNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTEGYEYDGFYDYGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEC ID nº: 9; AM-VH2-E40

45 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGRILPGSG
STNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTEGYEYDGFYDYGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEC ID nº: 10; AM-VH3-T26-E55

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKATGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGEILPGSG
 STNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFQYWGQGT
 TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKHHHHHH

SEC ID nº: 11; AM-VH4-T26-E40-E55

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKATGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSG
 STNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFQYWGQGT
 TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKHHHHHH

5

SEC ID nº: 12; AM-VL-C

DVLLSQTPLSLPVSLGDQATISCRSSQSIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRVSNR
 FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHIPYTFGGGTKLEIKRTVAAP
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

SEC ID nº: 13; AM-VL1

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYRVSN
 RDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGGGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15

SEC ID nº: 14; AM-VL2-E40

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLEWFQQRPGQSPRRLIYRVSNR
 DSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGGGTKLEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

El anticuerpo anti-ADM o el fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o el andamiaje proteico sin Ig anti-ADM según la presente invención presenta una afinidad hacia la ADM humana de tal manera que la constante de afinidad que es superior a 10^{-7} M, mejor 10^{-8} M, la afinidad preferida es superior a 10^{-9} M, aún mejor superior a 10^{-10} M. Un experto en la técnica sabe que se puede considerarse el compensar la afinidad menor aplicando una dosis mayor de compuestos y esta medida no conduciría fuera del alcance de la invención. Las constantes de afinidad pueden determinarse según el procedimiento descrito en el ejemplo 1.

25

Los anticuerpos o fragmentos según la presente invención se pueden utilizar en combinaciones con otros agentes, como por ejemplo con la denominada proteína de unión a ADM, para las utilidades descritas en las mismas.

30

Cabe destacar que la expresión "proteína de unión a ADM" comprende la proteína-1 de unión a ADM (factor H del complemento), que sin embargo no refleja un anticuerpo anti-ADM no neutralizante y/o modulador, un fragmento de anticuerpo, o un andamiaje proteico sin Ig según la invención.

35

En una forma de realización preferida, el anticuerpo anti-ADM o el fragmento de anticuerpo anti-ADM o el andamiaje proteico sin Ig anti-ADM se utiliza para reducir el riesgo de mortalidad durante una enfermedad crónica o aguda o estado agudo de un paciente.

40

Enfermedad crónica o aguda o estado agudo según la presente invención pueden ser una enfermedad o afección seleccionada entre el grupo que comprende infecciones graves como por ejemplo, la meningitis, el síndrome de respuesta inflamatoria generalizada (SIRS), la septicemia; otras enfermedades como la diabetes, el cáncer, las

angiopatías agudas y crónicas como por ejemplo la insuficiencia cardíaca, el infarto de miocardio, el accidente cerebrovascular, la aterosclerosis; el choque como por ejemplo, el choque septicémico y la disfunción de órganos como por ejemplo la disfunción renal, disfunción hepática, quemaduras, intervenciones quirúrgicas, el envenenamiento por traumatismo, por daños de la quimioterapia. Especialmente útil es el anticuerpo, fragmento o andamiaje según la presente invención para reducir el riesgo de mortalidad durante la septicemia y el choque septicémico, es decir las fases tardías de la septicemia.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM se utiliza en el tratamiento o prevención de una enfermedad aguda o crónica o estado agudo de un paciente según la presente invención, en la que dicho paciente es un paciente en la UCI. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM se utiliza en el tratamiento o prevención de una enfermedad aguda o crónica de un paciente según la presente invención en la que dicho paciente está críticamente enfermo. Críticamente enfermo significa un paciente que padece una enfermedad o está en una situación en la que la muerte es posible o inminente.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y andamiajes proteicos sin Ig según la presente invención pueden utilizarse para el tratamiento de pacientes para prevenir o tratar enfermedades o afecciones, por ejemplo, para su utilización en la prevención o el tratamiento de una enfermedad aguda o crónica o estado agudo de un paciente. Dicha enfermedad puede seleccionarse de entre el grupo que comprende infecciones graves como por ejemplo, la meningitis, síndrome de respuesta inflamatoria generalizada (SIRS), septicemia; otras enfermedades como la diabetes, el cáncer, angiopatías agudas y crónicas como por ejemplo la insuficiencia cardíaca, el infarto de miocardio, el accidente cerebrovascular, la aterosclerosis; choque como por ejemplo, choque septicémico y la disfunción de órganos como por ejemplo la disfunción renal, la disfunción hepática, quemaduras, intervenciones quirúrgicas, traumatismos. Especialmente útil es el anticuerpo o fragmento o andamiaje según la presente invención para reducir el riesgo de mortalidad durante la septicemia y el choque septicémico, es decir, las fases tardías de la septicemia.

En lo que sigue a continuación se definirán criterios clínicos para SIRS, septicemia, septicemia grave, choque septicémico.

1) La respuesta inflamatoria generalizada del huésped (SRIS) se caracteriza por al menos dos de los síntomas siguientes

- los pacientes presentan hipotensión (presión arterial media es < 65 mm Hg)
- siendo la concentración de lactato sérico elevada > 4 mmol/l
- glucosa en sangre $> 7,7$ mmol/l (en ausencia de diabetes)
- la presión venosa central no está en el intervalo de 8-12 mm Hg
- la diuresis es $< 0,5$ ml \times kg⁻¹ \times h⁻¹
- la saturación de oxígeno venosa central (vena cava superior) es $< 70\%$ o la venosa mixta $< 65\%$
- la frecuencia cardíaca es > 90 latidos/min
- temperatura $< 36^{\circ}\text{C}$ o $> 38^{\circ}\text{C}$
- frecuencia respiratoria > 20 /min
- recuento de leucocitos < 4 o $> 12 \times 10^9$ /l (leucocitos); $> 10\%$ de neutrófilos inmaduros

2) Septicemia

Después de al menos dos de los síntomas mencionados en 1), y, además de una sospecha clínica de nueva infección, que es:

- tos/esputo/dolor en el pecho
- dolor abdominal/distensión/diarrea
- infección por catéter
- endocarditis
- disuria
- dolor de cabeza con rigidez en el cuello
- celulitis/herida/infección en las articulaciones
- microbiología positiva para cualquier infección

3) Septicemia grave

A condición de que la septicemia se manifiesta en el paciente, y, además, una sospecha clínica de cualquier disfunción de órganos, que es:

- presión arterial sistólica < 90 /media; < 65 mm Hg
- lactato > 2 mmol/l

- bilirrubina > 34 µmol/l
 - diuresis <0,5 ml/kg/h durante 2 h
 - creatinina > 177 µmol/l
 - plaquetas <100x10⁹/l
- 5 • SpO₂ > 90% excepto el O₂ dado

4) Choque septicémico

10 Se manifiesta al menos un signo de la disfunción de órganos terminal como se ha mencionado en el punto 3). El choque septicémico se indica, si hay hipotensión resistente que no responde al tratamiento y la administración de fluidos por vía intravenosa por sí sola es insuficiente para mantener la presión arterial de un paciente de volverse hipotensor también proporciona una administración de un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM según la presente invención.

15 En una forma de realización de la presente invención, el paciente no padece SIRS, una infección grave, septicemia, choque, como por ejemplo choque septicémico. Dicha infección grave indica por ejemplo, meningitis, síndrome de respuesta inflamatoria generalizada (SIRS), septicemia, septicemia grave y choque como por ejemplo, choque septicémico. En este sentido, una septicemia grave se caracteriza por que la septicemia se manifiesta en dicho paciente, y, además una sospecha clínica de cualquier disfunción de órganos está presente, que es:

- 20
- presión arterial sistólica < 90/media; < 65 mm Hg
 - lactato > 2 mmol/l
 - Bilirrubina > 34 µmol/l
 - diuresis < 0,5 ml/kg/h durante 2 h
- 25
- creatinina > 177 µmol/l
 - plaquetas < 100x10⁹/l
 - SpO₂ > 90% excepto el O₂ dado

30 En otra forma de realización específica dicha enfermedad aguda o estado agudo no es la septicemia, la septicemia grave ni es SIRS ni es el choque o el choque septicémico.

En otra forma de realización dicha enfermedad aguda o estado agudo no es la septicemia.

35 Los anticuerpos, fragmentos o andamiajes según la presente invención se pueden utilizar en combinaciones con otros agentes, como por ejemplo con la denominada proteína de unión a ADM, para los usos descritos en la presente memoria. La proteína de unión a ADM también está presente de forma natural en la circulación de dicho paciente.

40 Cabe destacar que la expresión "proteína de unión ADM" comprende la proteína-1 de unión a ADM (factor H del complemento), que sin embargo no refleja un anticuerpo anti-ADM, fragmento de anticuerpo, o andamiaje proteico sin Ig no neutralizante y/o modulador según la invención.

45 Es objeto de la presente invención además un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM para su utilización en el tratamiento o prevención de una enfermedad aguda o crónica o de una estado agudo de un paciente según la presente invención, en el que dicho anticuerpo, fragmento o andamiaje debe utilizarse en combinación con otros principios activos.

50 Es objeto de la invención también un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que debe utilizarse en combinación con otro fármaco activo, por ejemplo, utilizado como medicamento principal, en el que dicha combinación es para el uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad aguda o crónica o una estado agudo de un paciente para estabilizar la circulación de dicho paciente, en particular la circulación general de dicho paciente.

55 Medicamento principal significa un medicamento que actúa contra la causa principal de dicha enfermedad o afección. Dicho medicamento principal puede ser antibiótico en caso de infecciones.

60 En una forma de realización específica de las combinaciones anteriormente mencionadas dichas combinaciones deben utilizarse en combinación con vasopresores por ejemplo, catecolaminas, en la que dicha combinación adicional es para su utilización en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección crónica o aguda de un paciente.

65 En una forma de realización de la invención, dicho paciente que padece una enfermedad crónica o aguda o una afección crónica se caracteriza por la necesidad del paciente de recibir la administración de vasopresores por ejemplo, la administración de catecolaminas.

Es, por lo tanto, objeto de la invención en una forma de realización específica un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que debe utilizarse en combinación con la proteína de unión de ADM y/o más principios activos para su utilización en el tratamiento o la prevención de un paciente que necesita un tratamiento de vasopresores por ejemplo, tratamiento con catecolaminas.

En una forma de realización específica de las combinaciones anteriormente mencionadas dichas combinaciones deben utilizarse en combinación con fluidos administrados por vía intravenosa, en la que dicha combinación es para su utilización en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección crónica o aguda de un paciente para la estabilización de la circulación, en particular la circulación general.

En una forma de realización de la invención, dicho paciente que padece una enfermedad crónica o aguda o un estado agudo que está necesitado de estabilización de la circulación se caracteriza por la necesidad del paciente para recibir fluidos intravenosos.

Es, por lo tanto, objeto de la invención en una forma de realización específica un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM), un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM en combinación con la proteína de unión de ADM y/o otros principios activos para su utilización en el tratamiento o la prevención de un paciente en necesidad de fluidos intravenosos. Esto es en el sentido de que el paciente está necesitado de fluidos por vía intravenosa para regular el balance general de líquidos.

Cabe destacar que la expresión proteína de unión a ADM también indica proteína-1 de unión a ADM (factor H del complemento), que sin embargo no es un anticuerpo anti-ADM no neutralizante y modulador, fragmento de anticuerpo anti-ADM o andamiaje proteico sin Ig anti-ADM según la invención.

Según la invención la proteína-1 de unión a ADM también puede denominarse proteína de unión ADM-1 (factor H del complemento).

Dicho anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM o combinaciones de los mismos con la proteína de unión a ADM y/o principios activos adicionales pueden utilizarse en combinación con vasopresores por ejemplo catecolaminas y/o con fluidos administrados por vía intravenosa para su utilización en una enfermedad crónica o aguda o estado agudo de un paciente para la estabilización de la circulación, en especial para la estabilización de la circulación general.

Es también objeto de la invención un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM según la presente invención para su utilizarse en combinación con anticuerpos contra TFN-alfa. Los anticuerpos contra TFN-alfa están disponibles en el mercado para el tratamiento de los pacientes.

En una forma de realización preferida, el anticuerpo anti-ADM o el fragmento de anticuerpo anti-ADM o el andamiaje proteico sin Ig anti-ADM se utiliza para reducir el riesgo de mortalidad durante dicha enfermedad crónica o aguda de un paciente en la que dicha enfermedad se selecciona de entre el grupo que comprende la septicemia, la diabetes, el cáncer, las angiopatías agudas y crónicas como por ejemplo la insuficiencia cardíaca, el choque como por ejemplo el choque septicémico y la disfunción de órganos como por ejemplo la disfunción renal. Es especialmente útil el anticuerpo, fragmento o andamio según la presente invención para reducir el riesgo de mortalidad durante la septicemia y el choque séptico, es decir, en las fases tardías de la septicemia.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, andamiajes y combinaciones de la presente invención pueden utilizarse en el tratamiento o prevención de una enfermedad aguda o crónica de un paciente:

- para la prevención de la disfunción de órganos o la insuficiencia de órganos, especialmente de la disfunción renal o la insuficiencia renal y/o,
- para la estabilización de la circulación, por ejemplo, para reducir las necesidades de vasopresores por ejemplo necesidades de catecolaminas de dicho paciente y/o,
- para la regulación del balance hídrico en dicho paciente.
- para reducir el riesgo de mortalidad de dicho paciente.

En una forma de realización el anticuerpo anti-ADM, un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM se utiliza en el tratamiento o prevención de una enfermedad aguda o crónica de un paciente según la presente invención en la que dicho paciente es un paciente en la UCI. En otra forma de realización el anticuerpo anti-ADM, un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM se utiliza en el tratamiento o prevención de una enfermedad aguda o crónica o de un estado agudo de un paciente según la presente invención, en la que dicho paciente está en estado crítico. Enfermo en estado crítico

significa que un paciente está padeciendo una enfermedad o está en un estado en el que la muerte es posible o inminente.

5 Es objeto de la presente invención además un anticuerpo anti-ADM, un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM para su utilización en el tratamiento o prevención de una enfermedad aguda o crónica o de un estado agudo de un paciente según la presente invención en el que dicho anticuerpo, fragmento o andamiaje debe utilizarse en combinación con la proteína de unión a ADM.

10 Es objeto de la presente invención además una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM según la presente invención.

Es objeto de la presente invención además una formulación farmacéutica según la presente invención, en la que dicha formulación farmacéutica es una solución, preferentemente una solución lista para su uso.

15 Dicha formulación farmacéutica puede administrarse por vía intramuscular. Dicha formulación farmacéutica puede administrarse por vía intravascular. Dicha formulación farmacéutica se puede administrar por infusión intravenosa.

20 En otra forma de realización objeto de la presente invención existe además una formulación farmacéutica según la presente invención, en la que dicha formulación farmacéutica está en estado seco para ser redisuelta antes de su uso.

En otra forma de realización objeto de la presente invención es además una formulación farmacéutica según la presente invención, en la que dicha formulación farmacéutica está en estado liofilizado.

25 En otra forma de realización de la invención la formulación farmacéutica según la invención, tal como puede administrarse por vía intramuscular, intravascular o por infusión intravenosa se administra preferentemente por vía generalizada a un paciente.

30 Por lo tanto, en otra forma de realización de la presente invención la formulación farmacéutica según la presente invención debe administrarse por vía generalizada a un paciente.

Ejemplos

35 Cabe destacar que los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y andamiajes proteicos sin Ig de la porción de ejemplos según la invención se unen a ADM, y por lo tanto deben considerarse como anticuerpos anti-ADM/fragmentos de anticuerpos/andamiajes proteicos sin Ig.

Los siguientes ejemplos ilustrarán la invención.

40 Ejemplo 1

Generación de anticuerpos y determinación de sus constantes de afinidad

45 Se produjeron varios anticuerpos humanos y murinos y se determinaron sus constantes de afinidad (véanse las Tablas 1 y 2).

Péptidos/conjugados para inmunización:

50 Se sintetizaron péptidos para inmunización, véase la Tabla 1, (JPT Technologies, Berlín, Alemania) con un resto de cisteína con terminal N adicional (si no hay cisteína presente dentro de la secuencia-ADM seleccionada) para la conjugación de los péptidos a albúmina de suero bovino (BSA). Los péptidos se unen por enlace covalente a BSA mediante utilizando gel de acoplamiento Sulfolink (Perbio-science, Bonn, Alemania). El procedimiento de acoplamiento se llevó a cabo según el manual de Perbio.

55 Los anticuerpos murinos se generaron según el siguiente procedimiento:

60 Un ratón Balb/c se inmunizó con 100 µg de conjugado péptido-BSA los días 0 y 14 (emulsionado en 100 µl de adyuvante completo de Freund) y 50 µg los días 21 y 28 (en 100 µl de adyuvante incompleto de Freund). Tres días antes de realizar el experimento de fusión, el animal recibió 50 µg de conjugado disuelto en 100 µl de solución salina, administrada en una inyección intraperitoneal y otra intravenosa.

65 Los esplenocitos del ratón inmunizado y células de la estirpe celular de mieloma SP2/0 se fusionaron con 1 ml de polietilenglicol al 50% durante 30 s a 37°C. Después del lavado, las células se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Se seleccionaron clones híbridos por cultivo en medio HAT [medio de cultivo RPMI 1640 enriquecido con 20% de suero de ternera fetal y complemento HAT]. Después de dos semanas se reemplazó el medio HAT con medio HT durante tres pases seguido de retorno al medio de cultivo celular normal.

En los sobrenadantes de cultivo celular se detectaron en primer lugar anticuerpos de IgG específicos para el antígeno tres semanas después de la fusión. Los microcultivos positivos se transfirieron a placas de 24 pocillos para su propagación. Después de una nueva prueba, los cultivos seleccionados se clonaron y se volvieron a clonar utilizando la técnica de dilución restrictiva y se determinaron los isotipos. (Véase también Lane, R.D. "A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas", *J. Immunol. Meth.* 81: 223-228; (1985), Ziegler, B. *et al.* "Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies", *Horm. Metab. Res.* 28:11-15, (1996)).

Producción de anticuerpos monoclonales de ratón:

Se produjeron anticuerpos por procedimientos convencionales de producción de anticuerpos (Marx *et al.*, *Monoclonal Antibody Production*, ATLA 25, 121, 1997) y se purificaron con Proteína A. Las purezas de los anticuerpos fueron > 95% en base al análisis de electroforesis en gel de SDS.

Anticuerpos Humanos

Se produjeron anticuerpos humanos por medio de la presentación en fagos según el siguiente procedimiento:

Se utilizaron bibliotecas de genes HAL7/8 de anticuerpos humanos sin tratamiento previo para el aislamiento de dominios variables F (scFv) monocatenarios recombinantes contra el péptido adrenomedulina. Las bibliotecas de genes de anticuerpos se cribaron con una estrategia panorámica que comprende el empleo de péptidos que contienen una etiqueta de biotina unida por dos espaciadores diferentes a la secuencia peptídica de adrenomedulina. Una mezcla de rondas panorámicas utilizando antígeno unido de manera no específica y antígeno unido a estreptavidina se utilizó para minimizar el fondo de enlazadores no específicos. Los fagos eluidos de la tercera ronda panorámica se han utilizado para la generación de cepas de *E. coli* que expresan scFv monoclonal. El sobrenadante de cultivo de estas cepas clonales se ha utilizado directamente para un ensayo de ELISA con antígeno (véase también Hust, M., Meyer, T., Voedisch, B., Rülker, T., Thie, H., El-Ghezal, A., Kirsch, M.I., Schütte, M., Helmsing, S., Meier, D., Schirrmann, T., Dübel, S., 2011. A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. *Journal of Biotechnology* 152, 159- 170; Schütte, M., Thullier, P., Pelat, T., Wezler, X., Rosenstock, P., Hinz, D., Kirsch, M.I., Hasenberg, M., Frank, R., Schirrmann, T., Gunzer, M., Hust, M., Dübel, S., 2009. Identification of a putative Crf splice variant and generation of recombinant antibodies for the specific detection of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 4, e6625).

Se han seleccionado clones positivos basándose en la señal positiva de ELISA para antígenos y negativa para placas de microvaloración recubiertas con estreptavidina. Para más caracterizaciones el marco de lectura abierto de scFv se ha clonado en el plásmido de expresión pOPE107 (Hust *et al.*, *J. Biotechn.* 2011), capturado del sobrenadante de cultivo por cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados y purificado una cromatografía de exclusión por tamaño.

Constantes de afinidad

Para determinar la afinidad de los anticuerpos a adrenomedulina, la cinética de unión de adrenomedulina al anticuerpo inmovilizado se determinó por medio de resonancia de plasmón en superficie sin etiqueta libre de utilizando un sistema Biacore 2000 (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Alemania). Se realizó inmovilización reversible de los anticuerpos con un anticuerpo Fc anti-ratón acoplado por enlace covalente en alta densidad a una superficie del detector CM5 según las instrucciones del fabricante (kit de captura de anticuerpo de ratón; GE Healthcare). (Lorenz *et al.*, "Functional Antibodies Targeting IsaA of *Staphylococcus aureus* Augment Host Immune Response and Open New Perspectives for Antibacterial Therapy"; *Antimicrob. Agents Chemother.* enero 2011; 55(1):165-173).

Los anticuerpos monoclonales se produjeron contra las regiones de ADM representadas a continuación de ADM humana y murina, respectivamente. La tabla siguiente representa una selección de anticuerpos obtenidos utilizados en experimentos adicionales. La selección se basó en la región de destino:

Tabla 1:

Número de secuencia	Antígeno/Inmunógeno	Región de ADM	Denominación	Constantes de afinidad Kd (M)
SEC. ID. nº 15	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC	1-21	NT-H	5,9 x 10 ⁻⁹
SEC. ID. nº 16	CTVQKLAHQIQ	21-32	MR-H	2 x 10 ⁻⁹
SEC. ID. nº 17	CAPRSKISPQGY-NH2	C-42-52	CT-H	1,1 x 10 ⁻⁹
SEC. ID. nº 18	YRQSMNQGSRSNGCRFGTC	1-19	NT-M	3,9 x 10 ⁻⁹
SEC. ID. nº 19	CTFQKLAHQIQ	19-31	MR-M	4,5 x 10 ⁻¹⁰

ES 2 494 191 T3

Número de secuencia	Antígeno/Inmunógeno	Región de ADM	Denominación	Constantes de afinidad Kd (M)
SEC. ID. nº 20	CAPRNKISPQGY-NH2	C-40-50	CT-M	9×10^{-9}

La siguiente es una lista de más anticuerpos monoclonales obtenidos:

Lista de anticuerpos anti-ADM

5

Tabla 2:

Objetivo	Fuente	Número de clon	Afinidad (M)	Bioanálisis de máx. inhibición (%) (véase el ejemplo 2)
NT-M	Ratón	ADM/63	$5,8 \times 10^{-9}$	45
	Ratón	ADM/364	$2,2 \times 10^{-8}$	48
	Ratón	ADM/365	$3,0 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/366	$1,7 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/367	$1,3 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/368	$1,9 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/369	$2,0 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/370	$1,6 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/371	$2,0 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/372	$2,5 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/373	$1,8 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/377	$1,5 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/378	$2,2 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/379	$1,6 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/380	$1,8 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/381	$2,4 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/382	$1,6 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/383	$1,8 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/384	$1,7 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/385	$1,7 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/403	$1,2 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/395	$1,2 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/396	$3,0 \times 10^{-8}$	
	Ratón	ADM/397	$1,5 \times 10^{-8}$	
MR-M	Ratón	ADM/38	$4,5 \times 10^{-10}$	68
MR-M	Ratón	ADM/39	$5,9 \times 10^{-9}$	72
CT-M	Ratón	ADM/65	$9,0 \times 10^{-9}$	100
CT-M	Ratón	ADM/66	$1,6 \times 10^{-8}$	100
NT-H	Ratón	ADM/33	$5,9 \times 10^{-8}$	38
NT-H	Ratón	ADM/34	$1,6 \times 10^{-8}$	22
MR-H	Ratón	ADM/41	$1,2 \times 10^{-8}$	67
MR-H	Ratón	ADM/42	$<1 \times 10^{-8}$	
MR-H	Ratón	ADM/43	$2,0 \times 10^{-9}$	73
MR-H	Ratón	ADM/44	$<1 \times 10^{-8}$	
CT-H	Ratón	ADM/15	$<1 \times 10^{-8}$	
CT-H	Ratón	ADM/16	$1,1 \times 10^{-9}$	100
CT-H	Ratón	ADM/17	$3,7 \times 10^{-9}$	100
CT-H	Ratón	ADM/18	$<1 \times 10^{-8}$	
hADM	Exposición en fagos	ADM/A7	$<1 \times 10^{-8}$	
	Exposición en fagos	ADM/B7	$<1 \times 10^{-8}$	
	Exposición en fagos	ADM/C7	$<1 \times 10^{-8}$	
	Exposición en fagos	ADM/G3	$<1 \times 10^{-8}$	
	Exposición en fagos	ADM/B6	$<1 \times 10^{-8}$	
	Exposición en fagos	ADM/B11	$<1 \times 10^{-8}$	
	Exposición en fagos	ADM/D8	$<1 \times 10^{-8}$	
	Exposición en fagos	ADM/D11	$<1 \times 10^{-8}$	
	Exposición en fagos	ADM/G12	$<1 \times 10^{-8}$	

Generación de fragmentos de anticuerpo por digestión enzimática:

10

La generación de fragmentos Fab y F(ab)₂ se hizo por digestión enzimática del anticuerpo NT-M murino completo. El

anticuerpo NT-M se digirió utilizando a) el kit de preparación de F(ab)₂ a base de pepsina (Pierce 44988) y b) el kit de preparación de Fab a base de papaína (Pierce 44985). Los procedimientos de fragmentación se realizaron según las instrucciones proporcionadas por el proveedor. La digestión se llevó a cabo en el caso de la fragmentación de F(ab)₂ durante 8 h a 37°C. La digestión con fragmentación de Fab se llevó a cabo durante 16 h, respectivamente.

5

Procedimiento para generación y purificación de Fab:

La papaína inmovilizada se equilibró lavando la resina con 0,5 ml de tampón de digestión y centrifugando la columna a 5000 x g durante 1 minuto. El tampón se desechó después. La columna de desalado se preparó eliminando la solución de almacenamiento y lavándola con tampón de digestión, centrifugando cada vez posteriormente a 1000 x g durante 2 minutos. Se añadieron 0,5 ml de la muestra de IgG preparada al tubo de la columna de centrifugación que contenía la papaína inmovilizada equilibrada. El tiempo de incubación de la reacción de digestión se realizó durante 16 h en un balancín de sobremesa a 37°C. La columna se centrifugó a 5000 x g durante 1 minuto para separar el producto de la digestión de la papaína inmovilizada. Después se lavó la resina con 0,5 ml de PBS y se centrifugó a 5000 x g durante 1 minuto. La fracción de lavado se añadió al anticuerpo digerido que el volumen total de la muestra era 1,0 ml. La columna con NAb Proteína A se equilibró con PBS y tampón de elución de IgG a temperatura ambiente. La columna se centrifugó durante 1 minuto para eliminar la solución de almacenamiento (contiene azida de sodio al 0,02%) y se equilibró añadiendo 2 ml de PBS, se volvió a centrifugar durante 1 minuto y se desechó flujo a través. La muestra se aplicó a la columna y se volvió a poner en suspensión por inversión. La incubación se realizó a temperatura ambiente con mezclado en tambor vertical durante 10 minutos. La columna se centrifugó durante 1 minuto, ahorrando el flujo a través con los fragmentos Fab.

10

15

20

25

30

(Referencias: Coulter, A. y Harris, R. (1983) *J. Immunol Meth.* 59, 199-203; Lindner I. *et al.* (2010) {alpha}2-Macroglobulin inhibits the malignant properties of astrocytoma cells by impeding {beta}-catenin signaling. *Cancer Res.* 70, 277-87; Kaufmann B. *et al.* (2010) Neutralization of West Nile virus by cross-linking of its surface proteins with Fab fragments of the human monoclonal antibody CR4354. *PNAS.* 107, 18950-5.; Chen X. *et al.* (2010) Requirement of open headpiece conformation for activation of leukocyte integrin $\alpha\beta 2$. *PNAS.* 107, 14727-32.; Uysal H. *et al.* (2009) Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. *J. Exp. Med.* 206, 449-62.; Thomas G. M. *et al.* (2009) Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation *in vivo*. *J. Exp. Med.* 206, 1913-27.; Kong F. *et al.* (2009) Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. *J. Cell Biol.* 185, 1275-84).

Procedimiento para la generación y purificación de fragmentos de F(ab')₂:

La pepsina inmovilizada se equilibró lavando la resina con 0,5 ml de tampón de digestión y centrifugando la columna a 5000 x g durante 1 minuto. El tampón se desechó después. La columna de desalado se preparó eliminando la solución de almacenamiento y lavándola con tampón de digestión, centrifugándola cada vez luego a 1000 x g durante 2 minutos. Se añadieron 0,5 ml de la muestra preparada de IgG al tubo de columna de centrifugación que contenía la pepsina inmovilizada equilibrada. El tiempo de incubación de la reacción de digestión se realizó durante 16 h en un balancín de sobremesa a 37°C. La columna se centrifugó a 5000 x g durante 1 minuto para separar digerir de la papaína inmovilizada. Después la resina se lavó con 0,5 ml de PBS y se centrifugó a 5000 x g durante 1 minuto. La fracción de lavado se añadió al anticuerpo digerido que el volumen total de la muestra era de 1,0 ml. La columna con Nab Proteína A se equilibró con PBS y tampón de elución de IgG a temperatura ambiente. La columna se centrifugó durante 1 minuto para eliminar la solución de almacenamiento (contiene azida de sodio al 0,02%) y se equilibró añadiendo 2 ml de PBS, se volvió a centrifugar durante 1 minuto y el flujo a través se desechó. La muestra se aplicó a la columna y se volvió a poner en suspensión por inversión. La incubación se realizó a temperatura ambiente con mezclado en tambor vertical durante 10 minutos. La columna se centrifugó durante 1 minuto, ahorrando el flujo a través con los fragmentos Fab.

35

40

45

50

55

60

65

(Referencias: Mariani, M., *et al.* (1991). A new enzymatic method to obtain high-yield F(ab')₂ suitable for clinical use from mouse IgG1. *Mol. Immunol.* 28: 69-77; Beale, D. (1987). Molecular fragmentation: Some applications in immunology. *Exp. Comp. Immunol.* 11:287-96.; Ellerson, J.R., *et al.* (1972). A fragment corresponding to the CH2 region of immunoglobulin G (IgG) with complement fixing activity. *FEBS Letters* 24(3):318-22.; Kerbel, R.S. y Elliot, B.E. (1983). Detection of Fc receptors. *Meth. Enzymol.* 93:113-147; Kulkarni, P.N., *et al.* (1985). Conjugation of methotrexate to IgG antibodies and their F(ab')₂ fragments and the effect of conjugated methotrexate on tumor growth *in vivo*. *Cancer Immunol. Immunotherapy* 19:211-4.; Lamoyi, E. (1986). Preparation of F(ab')₂ Fragments from mouse IgG of various subclasses. *Meth. Enzymol.* 121:652-663.; Parham, P., *et al.* (1982). Monoclonal antibodies: purification, fragmentation and application to structural and functional studies of class I MHC antigens. *J. Immunol. Meth.* 53:133-73.; Raychaudhuri, G., *et al.* (1985). Human IgG1 and its Fc fragment bind with different affinities to the Fc receptors on the human U937, HL-60 and ML-1 cell lines. *Mol Immunol* 22(9):1009-19.; Rousseaux, J., *et al.* (1980). The differential enzyme sensitivity of rat immunoglobulin G subclasses to papain and pepsin. *Mol. Immunol.* 17:469-82.; Rousseaux, J., *et al.* (1983). Optimal condition for the preparation of Fab and F(ab')₂ fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses. *J. Immunol. Meth.* 64:141-6.; Wilson, K.M., *et al.* (1991). Rapid whole blood assay for HIV-1 seropositivity using an Fab-peptide conjugate. *J. Immunol. Meth.* 138:111-9.)

Humanización del fragmento de anticuerpo NT-H

El fragmento de anticuerpo se humanizó por el método de injerto de CDR (Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., y Winter, G. (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-525).

Para conseguir la secuencia humanizada se llevaron a cabo las etapas siguientes:

Extracción de ARN completo: El ARN completo se extrajo de hibridomas de NT-H utilizando el kit de Qiagen.

Primera ronda de RT-PCR: Se utilizó el kit OneStep RT-PCR de QIAGEN® (Cat. nº 210210). Se realizó RT-PCR con conjuntos de cebadores específicos para las cadenas pesada y ligera. Para cada muestra de ARN, se montaron las reacciones de RT-PCR de cada una de las 12 cadenas pesadas y de 11 cadenas ligeras utilizando mezclas de cebadores directos degenerados que cubren las secuencias principales de las regiones variables. Los cebadores inversos se encuentran en las regiones constantes de las cadenas pesadas y ligeras. No se diseñaron secuencias de restricción en los cebadores.

Plan de la reacción: 5 veces 5,0 µl de tampón OneStep RT-PCR de QIAGEN®, 0,8 µl de mezcla de dNTP (que contiene 10 mM de cada dNTP), 0,5 µl de conjunto de cebadores, 0,8 µl de OneStep RT-PCR Enzyme Mix de QIAGEN®, 2,0 µl de plantilla de ARN, agua sin RNasa hasta 20,0 µl, volumen total 20,0 µl

Condiciones de PCR: Transcripción inversa: 50°C, 30 min; Activación de PCR inicial: 95°C, 15 min

Ciclación: 20 ciclos de 94°C, 25 seg; 54°C, 30 seg; 72°C, 30 seg; prolongación final: 72°C, 10 min

Segunda ronda de PCR semianidada: Los productos de RT-PCR de las reacciones de la primera ronda se ampliaron aún más en la PCR de la segunda ronda. Se montaron las reacciones de RT-PCR de cada una de las 12 cadenas pesadas y 11 cadenas ligeras utilizando conjuntos de cebadores semianidados específicos para las regiones variables de anticuerpos.

Plan de la reacción: 2 veces 10 µl de mezcla de PCR; 2 µl de conjunto de cebadores; 8 µl del producto de PCR de la primera ronda; 20 µl de volumen total; Informe de clonación de anticuerpos de hibridomas

Condición de la PCR: Desnaturalización inicial de 5 min. a 95°C; 25 ciclos de 95°C durante 25 s., 57°C durante 30 s., 68°C durante 30 s.; la prolongación final es de 10 min. a 68°C.

Una vez terminada la PCR, las muestras de la reacción de PCR se introdujeron en gel de agarosa para visualizar los fragmentos ampliados de ADN. Tras la secuenciación de más de 15 fragmentos clonados de ADN ampliados por RT-PCR anidada, varias cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de ratón se han clonado y parecen correctas. La alineación de secuencias de proteínas y el análisis de CDR identifica una cadena pesada y una cadena ligera. Después de la alineación con secuencias con marco humano homólogo la secuencia humanizada resultante para la cadena pesada variable es la siguiente: véase la figura 6 (como los aminoácidos en las posiciones 26, 40 y 55 de la cadena pesada variable y el aminoácido en la posición 40 en la ligera variable son críticos para las propiedades de unión, pueden revertirse al original murino. Los candidatos resultantes se muestran a continuación) (Padlan, E. A. (1991) A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. *Mol. Immunol.* 28, 489-498.; Harris, L. y Bajorath, J. (1995) Profiles for the analysis of immunoglobulin sequences: Comparison of V gene subgroups. *Protein Sci.* 4, 306-310.).

Anotación para las secuencias de fragmentos de anticuerpos (SEC. ID. nº 7 a nº 14): en negrita y subrayadas están las CDR 1, 2, 3 en orden cronológico; en cursiva están las regiones constantes; las regiones bisagra se destacan con letras en negrita y la etiqueta de histidina con letras en negrita y cursiva; la mutación puntual del marco tiene un fondo de letra gris.

SEC. ID. nº 7; AM-VH-C

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSRYWIEWVKQRP***GHGLEWIG******EILPGSGS***
TNYNEKFKGKATITADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGF***FDYWGQGT***
LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEC ID nº: 8; AM-VH1

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGRILPGSG
STNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFQDYWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEC ID nº: 9; AM-VH2-E40

5

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGRILPGSG
STNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFQDYWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEC ID nº: 10; AM-VH3-T26-E55

10

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCATGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGEILPGSG
STNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFQDYWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEC ID nº: 11; AM-VH4-T26-E40-E55

15

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCATGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSG
STNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFQDYWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEC ID nº: 12; AM-VL-C

DVLLSQTPSLPVS LGDQATISCRSSQSIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHIPYTFGGGTKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
STYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

SEC ID nº: 13; AM-VL1

DVVMQSPSLPVT LGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYRVS
RDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGGGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

25

SEC ID nº: 14; AM-VL2-E40

DVVMQSPSLPVT LGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLEWFQQRPGQSPRRLIYRVS
DSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGGGTKLEIKRTVA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Ejemplo 2

Efecto de los anticuerpos anti-ADM seleccionados sobre la bioactividad anti-ADM

5 El efecto de los anticuerpos contra ADM seleccionados sobre la bioactividad de ADM se probó en un análisis funcional de cAMP receptor de adrenomedulina recombinante humana (bioanálisis de adrenomedulina).

Pruebas de anticuerpos objetivo humanos o de adrenomedulina de ratón en el análisis funcional de cAMP receptor de adrenomedulina recombinante humana (bioanálisis de adrenomedulina)

10

Materiales:

Estirpe celular: CHO-K1

Receptor: Adrenomedulina (CRLR + RAMP3)

15

Número de registro del receptor; estirpe celular: CRLR: U17473; RAMP3: AJ001016

Células CHO-K1 que expresan el receptor recombinante humano adrenomedulina (FAST-027C) cultivadas antes de la prueba en medios sin antibiótico se desprendieron por lavado suave con PBS-EDTA (EDTA 5 mM), se recuperaron por centrifugación y se volvieron a poner en suspensión en tampón de análisis (KRH: KCl 5 mM, MgSO₄ 1,25 mM, NaCl 124 mM, HEPES 25 mM, glucosa 13,3 mM, KH₂PO₄ 1,25 mM, CaCl₂ 1,45 mM, 0,5 g/l de BSA).

20

Se realizaron en paralelo curvas de respuesta a la dosis con los agonistas de referencia (hADM o mADM).

Prueba de antagonistas (96 pocillos):

25

Para la prueba de antagonistas, se mezclaron 6 µl del agonista de referencia (adrenomedulina humana (5,63 nM) o de ratón (0,67 nM)) con 6 µl de las muestras de ensayo en diferentes diluciones de antagonistas; o con 6 µl de tampón. Tras la incubación durante 60 min. a temperatura ambiente, se añadieron 12 µl de células (2.500 células/pocillo). Las placas se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente. Después de la adición del tampón de lisis, se estimará el porcentaje de DeltaF, según las especificaciones del fabricante, con el kit HTRF de Cis-Bio International (Cat. n°62AM2 PEB). hADM 22-52 se utilizó como antagonista de referencia.

30

Análisis de cAMP por HTRF de pruebas en anticuerpos

35

En los anticuerpos anti-hADM (NT-H, MR-H, CT-H) se determinó la actividad antagonista en el análisis funcional de cAMP receptor de adrenomedulina recombinante humana (FAST-027C) en presencia de ADM 1-52 humana 5,63 nM, en las siguientes concentraciones finales de anticuerpos: 100 µg/ml, 20 µg/ml, 4 µg/ml, 0,8 µg/ml y 0,16 µg/ml.

En los anticuerpos anti-mADM (NT-M, MR-M, CT-M) se determinó la actividad antagonista en el análisis funcional de cAMP receptor de adrenomedulina recombinante humana (FAST-027C) en presencia de ADM 1-50 de ratón 0,67nM, en las siguientes concentraciones finales de anticuerpos: 100 µg/ml, 20 µg/ml, 4 µg/ml, 0,8 µg/ml y 0,16 µg/ml. Los datos representaban gráficamente la inhibición relativa frente a la concentración de antagonista (véanse las fig. 3a a 31). La inhibición máxima por cada anticuerpo se da en la tabla 3.

40

45 Tabla 3:

Anticuerpo	Inhibición máxima de bioactividad de ADM (Bioanálisis de ADM) (%)
NT-H	38
MR-H	73
CT-H	100
NT-M FAB	26
NT-M FAB2	28
NT-M	45
MR-M	66
CT-M	100
PBS	0
IgG no específica de ratón	0

Ejemplo 3

50 Datos para la estabilización de hADM por el anticuerpo anti-ADM

Se probó el efecto estabilizante de ADM humana por los anticuerpos contra ADM humana utilizando un inmunoanálisis de hADM.

Inmunoanálisis para la determinación cuantitativa de adrenomedulina humana

La tecnología utilizada fue un inmunoanálisis de luminiscencia con tubo revestido en sándwich, basada en el marcaje con éster de acridinio.

5 Compuesto marcado (trazador): Se mezclaron 100 µg (100 µl) CT-H (1 mg/ml en PBS, pH 7,4, AdrenoMed AG Alemania) con 10 µl de NHS-éster de acridinio (1mg/ml en acetonitrilo, InVent GmbH, Alemania) (patente EP 0353971) y se incubaron durante 20 min. a temperatura ambiente. CT-H marcado se purificó por HPLC de filtración en gel en Bio-Sil[®] SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., EE.UU.) El CT-H purificado se diluyó en (300 mmol/l de fosfato potásico, 100 mmol/l de NaCl, 10 mmol/l de Na-EDTA, 5 g/l de albúmina de suero bovino, pH 7,0). La concentración final fue de aprox. 800.000 unidades relativas de luz (RLU) de compuesto marcado (20 ng aprox. de anticuerpo marcado) por cada 200 µl. Se midió la quimioluminiscencia del éster de acridinio con un AutoLumat LB 953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG).

15 Fase sólida: Tubos de poliestireno (Greiner Bio-One International AG, Austria) se recubrieron (18 h a temperatura ambiente) con MR-H (AdrenoMed AG, Alemania) (1,5 µg de MR-H/0,3 ml 100 mmol/l de NaCl, 50 mmol/l de Tris/HCl, pH 7,8). Tras el bloqueo con 5% de albúmina de suero bovino, los tubos se lavaron con PBS, pH 7,4 y se secaron al vacío.

20 Calibración:
Se calibró el análisis, utilizando diluciones de hADM (BACHEM AG, Suiza) en 250 mmol/l de NaCl, 2 g/l de Triton X-100, 50 g/l de albúmina de suero bovino, 20 lengüetas/l de mezcla de inhibidor de proteasa (Roche Diagnostics AG, Suiza)

25 Inmunoanálisis de hADM:
Se pipetearon 50 µl de muestra (o calibrador) en tubos recubiertos, después de añadir CT-H marcado (200µl), se incubaron los tubos durante 4 horas a 4°C. El trazador no unido se eliminó lavando 5 veces (1 ml cada vez) con solución de lavado (PBS 20 mM, pH 7,4, Triton X-100 al 0,1%).

La quimioluminiscencia unida al tubo se midió utilizando la LB 953

35 La figura 4 muestra una curva dosis/señal típica de hADM. Y una curva de dosis/señal de hADM en presencia de 100 µg/ml de anticuerpo NT-H.

NT-H no afectó al inmunoanálisis de hADM descrito.

40 Estabilidad de adrenomedulina humana:
ADM humana se diluyó en plasma humano con citrato (10 nM de concentración final) y se incubó a 24°C. En los puntos de tiempo seleccionados, la degradación de hADM se detuvo por congelación a -20°C. La incubación se llevó a cabo en ausencia y presencia de NT-H (100µg/ml). La hADM restante se analizó cuantitativamente utilizando el inmunoanálisis de hADM descrito anteriormente.

45 La figura 5 muestra la estabilidad de hADM en el plasma humano (citrato) en ausencia y en presencia del anticuerpo NT-H. La vida media de hADM solo fue de 7,8 h y en presencia de NT-H, la vida media fue 18,3 h. (2,3 veces mayor estabilidad).

50 **Ejemplo 4**

Mortalidad por septicemia (tratamiento inicial)

55 Modelo animal

Para el estudio se utilizaron ratones C57B1/6 macho de 12-15 semanas (Charles River Laboratories, Alemania). Se había provocado quirúrgicamente peritonitis bajo ligera anestesia de isoflurano. Las incisiones se realizaron en el cuadrante superior izquierdo de la cavidad peritoneal (posición normal del intestino ciego). Se expuso el intestino ciego y se colocó una ligadura apretada alrededor del ciego con suturas distales a la inserción del intestino delgado. Se hizo una herida por punción con una aguja de calibre 24 en el ciego y pequeñas cantidades de contenido cecal se expresaron a través de la herida. El intestino ciego fue sustituido en la cavidad peritoneal y se cerró el punto de laparotomía. Por último, los animales fueron devueltos a sus jaulas con libre acceso a la comida y al agua. Se les administró por vía sc. 500 µl de solución salina como reposición de fluidos.

65 Aplicación y posología del compuesto (NT-M, M-MR, CT-M)

Los ratones se trataron inmediatamente después de la CLP (tratamiento inicial). CLP es la abreviatura de la ligadura y punción cecal (CLP).

Grupos en estudio

5 Se ensayaron tres compuestos frente al vehículo y frente al tratamiento del compuesto de referencia. Cada grupo contenía 5 ratones para la extracción de sangre después de 1 día para determinación BUN (análisis de nitrógeno ureico en suero sanguíneo). Se siguieron diez ratones más por cada grupo durante un período de 4 días.

10 Dosis de tratamiento del grupo (10 µl/g de peso corporal)/seguimiento:

- 1 NT-M, 0,2 mg/ml más de 4 días de supervivencia
- 2 MR-M, 0,2 mg/ml más de 4 días de supervivencia
- 3 CT-M, 0,2 mg/ml más de 4 días de supervivencia
- 15 4 IgG de ratón no específica, 0,2 mg/ml más de 4 días de supervivencia
- 5 referencia - PBS 10µl/g de peso corporal más de 4 días de supervivencia

Bioquímica clínica

20 Para la función renal se midieron concentraciones de nitrógeno ureico en sangre (BUN) de referencia y el día 1 después de CLP. Se extrajeron muestras de sangre del seno cavernoso con un capilar bajo anestesia ligera con éter. Se realizaron mediciones utilizando un Multianalyser AU 400 Olympus. La mortalidad a los 4 días se da en la tabla 4. Las concentraciones medias de BUN se dan en la tabla 5.

25 Tabla 4:

Mortalidad a los 4 días	supervivencia (%)
PBS	0
IgG no específica de ratón	0
CT-M	10
MR-M	30
NT-M	70

Tabla 5:

Media de 5 animales	BUN pre-CLP (nM)	BUN día 1 (mM)
PBS	8,0	23,2
IgG de ratón no específica	7,9	15,5
CT-M	7,8	13,5
MR-M	8,1	24,9
NT-M	8,8	8,2

30 Se puede observar en la Tabla 4 que el anticuerpo de NT-M redujo la mortalidad considerablemente. Después de 4 días el 70% de los ratones sobrevivieron cuando se trataron con anticuerpo NT-M. Cuando se trató con anticuerpo MR-M el 30% de los animales sobrevivió y cuando se trataban con anticuerpo CT-M el 10% de los animales sobrevivió después de 4 días. A diferencia de esto todos los ratones habían muerto después de 4 días cuando se trataban con IgG no específica de ratón. El mismo resultado se obtuvo en el grupo de referencia donde se administró PBS (solución salina tamponada con fosfato) a ratones.

35 El análisis de nitrógeno de urea en sangre o BUN se utiliza para evaluar la función renal, para ayudar a diagnosticar la enfermedad renal, y para controlar a los pacientes con disfunción o insuficiencia renal aguda o crónica. Los resultados del análisis S-BUN pusieron de manifiesto que el anticuerpo NT-M fue el más eficaz para proteger el riñón.

Mortalidad por septicemia (tratamiento tardío)

45 Modelo animal

Para el estudio se utilizaron ratones C57B1/6 macho de 12-15 semanas (Charles River Laboratories, Alemania). Se había provocado quirúrgicamente peritonitis bajo ligera anestesia de isoflurano. Las incisiones se realizaron en el cuadrante superior izquierdo de la cavidad peritoneal (posición normal del intestino ciego). Se expuso el intestino ciego y se colocó alrededor del ciego una ligadura apretada con suturas distales a la inserción del intestino delgado. Se hizo una herida por punción con una aguja de calibre 24 en el ciego y pequeñas cantidades de contenido cecal se expresaron a través de la herida. El intestino ciego se reemplazó en la cavidad peritoneal y se cerró el punto de laparotomía. Por último, los animales fueron devueltos a sus jaulas con libre acceso a la comida y al agua. Se les

administró por vía sc. 500 µl de solución salina como reposición de fluidos.

Aplicación y posología del compuesto (NT-M FAB2)

5 Se ensayó NT-M Fab2 frente al vehículo y frente al tratamiento del compuesto de referencia. El tratamiento se llevó a cabo después del desarrollo completo de la septicemia, 6 horas después de CLP (tratamiento tardío). Cada grupo contenía 4 ratones y se siguieron durante un período de 4 días.

Dosis de tratamiento del grupo (10 µl/g de peso corporal)/seguimiento:

10

Grupos en estudio

- 15
1. NT-M, 0,2 mg/ml de FAB2 más de 4 días de supervivencia
 2. referencia: IgG no específica de ratón, 0,2 mg/ml más de 4 días de supervivencia
 3. vehículo: - PBS 10µl/g de peso corporal más de 4 días de supervivencia

Tabla 6:

Mortalidad de 4 días	supervivencia (%)
PBS	0
IgG no específica de ratón	0
NT-M FAB2	75

20 En la Tabla 6 se puede observar que el anticuerpo de NT-M FAB 2 redujo la mortalidad considerablemente. Después de 4 días el 75% de los ratones sobrevivieron cuando se trataron con anticuerpos NT-M FAB 2. A diferencia de estos todos los ratones habían muerto después de 4 días cuando se trataron con IgG no específica de ratón. El mismo resultado se obtuvo en el grupo de referencia donde PBS (solución salina tamponada con fosfato) se administró a los ratones.

25

Ejemplo 5

Efecto del incremento de anticuerpos anti-ADM en animales con CLP en la parte superior del tratamiento con antibióticos y estabilización de la circulación con catecolaminas, así como regulación del balance hídrico.

30

Modelo animal

35 En este estudio se utilizaron ratones C57B1/6 macho (8-12 semanas, 22-30 g). Una septicemia polimicrobiana provocada por la ligadura y punción cecal (CLP) se utilizó como modelo para el estudio de choque septicémico ((Albuszies G., *et al.*: Effect of increased cardiac output on hepatic and intestinal microcirculatory blood flow, oxygenation, and metabolism in hyperdynamic murine septic shock. *Crit. Care Med.* 2005;33:2332-8), (Albuszies G., *et al.*: The effect of iNOS deletion on hepatic gluconeogenesis in hyperdynamic murine septic shock. *Intensive Care Med.* 2007; 33:1094-101), (Barth E., *et al.*: Role of iNOS in the reduced responsiveness of the myocardium to catecholamines in a hyperdynamic, murine model of septic shock. *Crit. Care Med.* 2006; 34:307-13), (Baumgart K., *et al.*: Effect of SOD-1 over-expression on myocardial function during resuscitated murine septic shock. *Intensive Care Med.* 2009; 35:344-9), (Baumgart K., *et al.*: Cardiac and metabolic effects of hypothermia and inhaled H₂S in anesthetized and ventilated mice. *Crit. Care Med.* 2010;38:588-95), (Simkova V., *et al.*: The effect of SOD-1 over-expression on hepatic gluconeogenesis and whole-body glucose oxidation during resuscitated, normotensive murine septic shock. *Shock* 2008; 30:578-84), (Wagner F., *et al.*: Inflammatory effects of hypothermia and inhaled H₂S during resuscitated.), (Wagner F., *et al.*: Effects of intravenous H₂S after murine blunt chest trauma: a prospective, randomized controlled trial. *Crit. Care* 2011, presentado para su publicación)).

45

50 Después de la pesada, los ratones se anestesiaron por inyección intraperitoneal de 120 µg/g de cetamina, 1,25 µg/g de Midazolam y 0,25 µg/g de Fentanilo. Durante el procedimiento quirúrgico, la temperatura corporal se mantuvo entre 37 y 38°C. Una sección abdominal en la línea media de 1 cm se practicó para acceder al ciego. A continuación se ligó el ciego con sutura de seda 3-0 cerca de la base y se aplicó un solo pinchazo con una aguja de calibre 18. El ciego se devolvió y la incisión se cerró de nuevo (sutura 4-0). Para la compensación de la pérdida perioperatoria de líquidos, se inyectaron por vía subcutánea en la dermis dorsal 0,5 ml de solución de lactato de Ringer con 1 µg/g de buprenorfina como analgésico. Para antibiosis se administró a los ratones 30µg/g de Ceftriaxona y 30µg/g de Clindamicina por vía subcutánea en las extremidades inferiores.

55

Después de la intervención quirúrgica CLP los animales se mantuvieron en un entorno adecuadamente climatizado con agua y comida a discreción.

60 La provisión de las necesidades de líquidos se aseguró mediante inyecciones subcutáneas dorsales con 0,5 ml de solución de lactato de Ringer con 4 µg/g de glucosa y 1µg/g de buprenorfina, que se aplicaron en un ciclo de 8 horas, después de la anestesia con isoflurano de corta duración. Además, se mantuvo la antibiosis mediante

inyecciones subcutáneas de 30 µg/g de Ceftriaxona y 30 µg/g de Clindamicina en las extremidades inferiores.

Administración de las sustancias de ensayo

5 Tratamiento inicial

10 Inmediatamente después de la intervención quirúrgica CLP y del cierre de la incisión, se aplicó el anticuerpo NT-M sustancia de ensayo en una concentración de 500 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS) mediante inyección en la vena del pene para una dosis de 2 mg por kg de peso corporal (volumen de dosis 88-120 µl) (5 animales).

Tratamiento tardío

15 Después del desarrollo completo de la septicemia, 15,5 h después de la intervención quirúrgica CLP, los animales se anestesiaron como se describió anteriormente y se aplicó NT-M a una concentración de 500 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS) por inyección en la vena del pene para una dosis de 2 mg por kg de peso corporal (volumen de dosis 88-120 µl) (3 animales).

20 El grupo de referencia (6 animales) recibió una cantidad correspondiente de la solución PBS vehículo sin anticuerpos (4 µl/g, 88-120 µl) inmediatamente después de la intervención quirúrgica CLP.

Grupos en estudio y marco experimental

Modelo murino de choque septicémico con seguimiento de cuidados intensivos:

25 Se hizo seguimiento a tres grupos con 3, 5 y 6 animales. El grupo 1 (5 animales) recibió el anticuerpo de NT-M 15,5 h después de CLP, el grupo 2 recibió el anticuerpo NT-M inmediatamente después de la intervención quirúrgica CLP y el grupo 3 recibió una cantidad comparable de PBS (4 µl/g). 16 horas de incubación después de CLP (para permitir que evolucione la septicemia polimicrobiana), el experimento se continuó con seguimiento e intervenciones comparables a un régimen de atención médica intensiva. Por lo tanto, después de pesar los animales se anestesiaron como se describe en la parte de la intervención quirúrgica CLP (excepto los animales tratados tarde, que fueron anestesiados antes del tratamiento). La temperatura corporal se mantuvo entre 37 y 38°C durante el resto del experimento. Después de una traqueotomía e intubación, se controló la respiración y asistida por el ventilación pulmonar Flexivent® para animales de laboratorio, (Emka Technologies, FiO2 0,5, PEEP 10 H2O, VT 8 µl/g, I:E 1:1,5, AF 70-140 dependiendo de la temperatura).

40 La anestesia se mantuvo durante todo el experimento a través de la vena yugular externa derecha canulada con una infusión intravenosa continua de 30 µg/gxh de cetamina y 0,3 µg/gxh de Fentanilo. Además, la aorta carótida derecha común se canuló para el seguimiento continuo de la frecuencia cardíaca y la presión arterial media (MAP). La presión arterial media se mantuvo en MAP > 65 mm Hg por infusión intravenosa (V. yugular) de coloides (80 µl/gxh, Hextend®) y, si es necesario, Noradrenalina disuelta en coloides como vasopresor. Se extrajeron muestras de sangre (120 µl) a través de la A. carótida canulada a las 0 y 4 horas para la determinación de creatinina. Se pinchó la vejiga y se recogió la orina a través de un catéter en la vejiga. El experimento se terminó después de 6 horas o antes de este período, si la MAP > 65 mm Hg (V. yugular) no pudo mantenerse con la dosis de vasopresor.

45 Parámetros medidos

50 Se midieron y analizaron los siguientes parámetros: Consumo total de la noradrenalina (µg NA/g), tasa de consumo de noradrenalina (µg NA/g/h), volumen total de orina recogida durante el experimento, concentración de creatinina (µg/ml) a la final del experimento y el depuración media de creatinina (µl/min).

Tabla 7:

	Consumo total de noradrenalina (µg NA/g) (promedio)	Tasa de consumo de noradrenalina (µg NA/g/h) (Promedio)
Referencia (IgG de ratón) (N = 6)	0,17 µg/g	0,032 µg/h/g
NT-M (N = 5) tratamiento inicial	0,07 µg/g	0,012 µg/h/g
Cambio relativo (tratamiento precoz, mejora)	59%	62,5%
	(59%)	(62,5%)
NT-M (N = 3) tratamiento tardío	0,04 µg/g	0,0075 µg/h/g
Cambio relativo (tratamiento tardío, mejora)	76,5%	76,5%
	(76,5%)	(76,5%)

Se midieron los requisitos de catecolaminas después de la administración de cualquiera de IgG de ratón no específica a un total de 6 ratones como grupo de referencia, anticuerpo NT murino a un grupo de 5 ratones inmediatamente después de CLP (tratamiento inicial) o anticuerpo NT murino a un grupo de 3 ratones 15,5 h después de CLP (tratamiento tardío).

La reducción de los requisitos de catecolaminas es una medida para la estabilización de la circulación. Por lo tanto, los datos demuestran que el anticuerpo contra ADM, especialmente el anticuerpo NT-M, conduce a una estabilización considerable de la circulación y a una reducción considerable de los requisitos de catecolaminas. El efecto estabilizante de la circulación se dio en el tratamiento precoz (inmediatamente después de la CLP) y el tratamiento después del desarrollo completo septicemia (tratamiento tardío) (véase la fig. 7).

Regulación del balance hídrico

El balance hídrico más positivo tanto precoz en reanimación como de forma acumulada durante 4 días se asoció a un mayor riesgo de mortalidad en el choque septicémico. El control del balance hídrico es de suma importancia para el curso de la enfermedad de los pacientes con septicemia. (S. Boyd *et al.*, 2011). Controlar el balance hídrico de los pacientes enfermos críticos se mantiene como un reto importante en la medicina de cuidados intensivos. Como se puede ver en la tabla 8 el tratamiento de ratones después de CLP (procedimientos experimentales véase "Modelo animal") con anticuerpo NT-M conducen a una mejora del volumen total de orina excretada. La orina segregada era aprox. tres veces mayor en los animales tratados con NT-M en comparación con los ratones no tratados. El efecto positivo del tratamiento se dio tanto en el tratamiento inicial como en el tardío. El balance hídrico se mejoró en aproximadamente un 20-30%, también en ambos, tratamiento inicial y tardío. Por lo tanto, los datos demuestran que la utilización de anticuerpos contra ADM, especialmente la utilización de anticuerpos NT ADM, es favorable para la regulación del balance hídrico en pacientes. (Véase la tabla 8 y las figuras 8 y 9).

Tabla 8

	Volumen medio de orina/g de peso corporal	Volumen medio de balance hídrico/g de peso corporal
Referencia (IgG de ratón) (N = 6)	0,042 ml/g	0,23 ml/g
NT-M temprana (N = 5)	0,12 ml	0,18 ml/g
Cambio relativo tratamiento inicial	+ 186%	-21,7%%
NT-M tardío (N = 3)	0,125 ml	0,16 ml/g
Cambio relativo tratamiento tardío	+ 198%	-30,5%

Mejora de la función renal

La combinación de la insuficiencia renal aguda y la septicemia está asociada a una mortalidad del 70 por ciento, en comparación con una mortalidad del 45 por ciento entre los pacientes con insuficiencia renal aguda sola. (Schrier y Wang, "Mechanisms of Disease Acute Renal Failure and Sepsis", *The New England Journal of Medicine*; 351:159-69, 2004). Creatinine concentration and creatinine clearance are standard laboratory parameters for monitoring kidney (dys)function (Jacob, "Acute Renal Failure", *Indian J. Anaesth.*; 47 (5): 367-372; 2003). La creatinina y los datos de depuración de creatinina de los experimentos con animales descritos anteriormente (tratamiento inicial) se dan en la tabla 9.

Tabla 9

Función renal:

	concentración de creatinina (µg/ml)	depuración media de creatinina (µl/min)
IgG de ratón de referencia (PM)	2,6 µg/ml	174 µl/min
NT-M (PM)	1,5 µg/ml	373 µl/min
Cambio relativo (mejora)	-42% (42%)	+114% (114%)

En comparación con los animales septicémicos de referencia, la concentración de creatinina se redujo en un 42% y la depuración de creatinina mejoró más de un 100% como resultado del tratamiento con NT-M (Tabla 9). Los datos demuestran que la administración de anticuerpos contra ADM, especialmente de NT-M, conduce a una mejora de la función renal.

Mejora del estado inflamatorio del hígado

El tejido hepático para el control de los animales tratados inicialmente se homogeneizó y se lisó en tampón de lisis. Para la preparación del extracto celular, las células se volvieron a poner en suspensión, se lisaron en hielo y se centrifugaron. El sobrenadante (extracto proteico) se almacenó a -80°C. La activación del potenciador génico de la cadena ligera kappa del factor nuclear en linfocitos B (NF-κB) se determinó como se ha descrito anteriormente utilizando un ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)^{1,2}. Los extractos celulares (10 µg) se incubaron en hielo con ácido poli-desoxi-inosínico-desoxi-citídílico (poli-dI-dC) y oligonucleótido bicatenario marcado con ³²P (Biomers, Ulm, Alemania) que contiene el NF-κB (VIH κBsite) (5'-GGATCCTCAACAGAGGGGACTTTCCGAGGCCA-3'). Los complejos se separaron en geles de poliacrilamida naturales, se secaron y se expusieron a películas de rayos X. Se utilizó una placa de fósforo fotoestimulable y un programa informático analizador de imágenes (Raytest AIDA Image Analyzer) para cuantificar por densitometría el NF-κB marcado con radiactividad. Para la comparación entre cada uno de los geles, la intensidad de cada banda se relacionó con la de los animales de referencia cargados simultáneamente que no se habían sometido a la instrumentación quirúrgica y CLP. Por consiguiente, los datos EMSA se expresan como aumento de varias veces sobre los valores de referencia. Estadística: Todos los datos se presentan como mediana (intervalo) a menos que de lo contrario se expongan diferencias entre los dos grupos que se analizaron con la prueba del orden sumatorio de Mann-Whitney para muestras independientes. Resultados: Los animales tratados con NT-M presentaban activación por NF-κB del tejido hepático significativamente atenuada (2,27 (1,97 a 2,53)) en comparación con los animales con vehículo (2,92 (2,50 a 3,81)) (p<0,001) (véase la figura 10).

Referencias:

1. Wagner F., Wagner K., Weber S., Stahl B., Knöferl M.W., Huber-Lang M., Seitz D.H., Asfar P., Calzia E., Senftleben U., Gebhard F., Georgieff M., Radermacher P, Hysa V.: Inflammatory effects of hypothermia and inhaled H₂S during resuscitated, hyperdynamic murine septic shock. *Shock* 2011; 35(4):396-402

2. Wagner F., Scheuerle A., Weber S., Stahl B., McCook O., Knöferl M.W., Huber-Lang M., Seitz D.H., Thomas J., Asfar P., Szabó C., Möller P., Gebhard F., Georgieff M., Calzia E., Radermacher P., Wagner K.: Cardiopulmonary, histologic, and inflammatory effects of intravenous Na₂S after blunt chest trauma-induced lung contusion in mice. *J. Trauma* 2011; 71(6):1659-67

Ejemplo 6

Determinación de efectos secundarios *in vivo* de anticuerpos NT-M

Para el estudio se utilizaron ratones C57B1/6 macho de 12 a 15 semanas (Charles River Laboratories, Alemania). Se trataron 6 ratones con dosis (10 µl/g de peso corporal) de NT-M, 0,2 mg/ml. Como referencia, se trataron 6 ratones con (10 µl/g de peso corporal) de PBS. La supervivencia y el estado físico se siguió durante 14 días. La mortalidad fue 0 en ambos grupos, no hubo diferencias en el estado físico entre NT-M y el grupo de referencia.

Ejemplo 7

Nefrotoxicidad provocada por gentamicina

Se ha creado un modelo de lesión renal aguda no septicémica, que hace uso de la nefrotoxicidad provocada por gentamicina (Chiu P.J.S. Models used to assess renal functions. *Drug. Develop. Res.* 32:247-255, 1994). Este modelo se utilizó para evaluar si el tratamiento con anticuerpo anti-adrenomedulina puede mejorar la función renal.

El experimento se realizó de la manera siguiente:

Efecto de un NT-M sobre la nefrotoxicidad provocada por gentamicina en ratas						
Diseño del estudio:						
Grupo	Prueba Artículo	Vía	Conc. mg/ml	Dosis		Ratas ^a (macho)
				ml/kg	mg/kg	
1	Gentamicina ^a + vehículo ^b	IV			NA x 4 ^c	8
2	Gentamicina una + NT-M	IV			x 4 ^c	8
^a Gentamicina a 120 mg/kg por vía intramuscular durante 7 días (días 0-6).						
^b Vehículo; inyectado por vía intravenosa (IV) 5 min. antes de la gentamicina el día 0, seguido de inyecciones los días 2, 4, y 6.						
^c NT-M a 4 mg/kg se inyectó por vía intravenosa (IV) 5 min. antes de la gentamicina el día 0, seguido de 2 mg/kg iv. los días 2, 4, y 6.						
^d Las muestras de plasma se recogieron en tubos con EDTA (días 1 y 3 antes del artículo de prueba y de referencia: 100 µl; Día 7:120 µl 24 h de recogida de orina en hielo se inicia después de la gentamicina el día 0, seguido de los días 2 y 6; extracción de sangre los días 1, 3, y 7.						

Se emplearon grupos de 8 ratas macho Sprague-Dawley con un peso de 250 ± 20 g. Los animales se sometieron a

la prueba de provocación con gentamicina a 120 mg/kg por vía intramuscular durante siete días consecutivos (grupos 1 y 2). El compuesto de ensayo (anticuerpo anti-adrenomedulina NT-M) y vehículo (solución salina tamponada con fosfato) se inyectaron por vía intravenosa 5 min. antes de la gentamicina el día 0, seguido de inyecciones los días 2, 4, y 6. Los pesos corporales y los signos clínicos se controlaron diariamente. Se obtuvieron muestras de orina en hielo de 24 horas los días 0, 2 y 6. En las muestras de orina se analizaron las concentraciones de Na⁺ y K⁺ y de creatinina. Se extrajeron muestras de sangre para análisis clínico los días 1 (antes de la gentamicina), 3 (antes de la gentamicina) y 7. Electrolitos séricos (Na⁺ y K⁺), creatinina y BUN fueron los analitos principales que se controlaron para evaluar la función renal. Se recogieron muestras de plasma en tubos con EDTA (días 1 y 3:100 µl; Día 7: 120 µl). Se calculó la depuración de creatinina. El volumen de orina, los electrolitos urinarios y la creatinina se expresan en cantidad excretada por 100 g de peso corporal del animal. Todos los animales se sacrificaron el día 7. Se pesaron los riñones.

Obtención de muestras de orina. Los animales se colocaron en jaulas individuales en las que se recogió la orina durante 24 horas el día 0, el día 2, y el día 6. Se midió el volumen de orina, Na⁺, K⁺ y creatinina urinarios.

La depuración de la creatinina endógena se calculó de la manera siguiente:

$$CCr \text{ (ml/24 h)} = [UCr \text{ (mg/ml)} \times V \text{ (ml/24 h)}] / SCr \text{ (mg/ml)}$$

La excreción urinaria de sodio (Na⁺) en 24 h se calculó de la manera siguiente:

$$UNaV \text{ (}\mu\text{Eq/24 h)} = UNa \text{ (}\mu\text{Eq/ml)} \times V \text{ (ml/24 h)}$$

La excreción urinaria de NAG y NGAL en 24 h se calculó de manera similar.

La excreción fraccionaria de Na⁺ (FE_{Na}), o el porcentaje de sodio filtrado que se excreta en la orina final, es una medida de la función de reabsorción de Na⁺ tubular. Se calculó de la manera siguiente:

$$FE_{Na} \text{ (\%)} = 100 \times [UNa \text{ (}\mu\text{Eq/ml)} \times V \text{ (ml/24 h)}] / P_{Na} \text{ (}\mu\text{Eq/ml)} \times C_{Cr} \text{ (ml/24 h)}$$

El tratamiento con anticuerpos anti-adrenomedulina mejoró varias medidas de la función renal el día 7 en comparación con el vehículo: 1,01 mg/dl de creatinina sérica (NT-M) frente a 1,55 mg/dl (vehículo) (Fig. 11), 32,08 mg/dl de BUN (NT-M) frente a 52,41 mg/dl (vehículo) (Fig. 12), 934,43 ml/24 h de depuración de creatinina endógena (NT-M) frente a 613,34 ml/24 h (vehículo) (Fig. 13), 0,98% de secreción fraccionaria de Na⁺ (NT-M) frente a 1,75% (vehículo) (Fig.14).

Ejemplo 8

En el modelo CLP de ratones descrito anteriormente, se investigó el efecto del tratamiento con anticuerpo NT-M anti-adrenomedulina sobre varios parámetros de la función renal.

NT-M causó una diuresis mayor de tres y dos veces y el depuración de creatinina, respectivamente, en última instancia produciendo menores concentraciones en sangre de creatinina, urea y NGAL al final del experimento (véase la Tabla 10). Además, las concentraciones de quimiocinas (KC) procedentes de queratinocitos en el riñón se redujeron significativamente por tratamiento con NT-M (Fig. 15).

Tabla 10: Parámetros de la función renal en el vehículo (n = 11) y en animales tratados con NT-M (n = 9). Las concentraciones en sangre se midieron en muestras tomadas al final del experimento. NGAL = lipocalina asociada a neutrofil gelatinasa. Todos los datos son medianas (cuartiles).

	Vehículo	NT-M	Valor P
Diuresis [$\mu\text{l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]	4,4 (3,5; 16,5)	15,2 (13,9; 22,5)	0,033
Depuración de creatinina [$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$]	197 (110; 301)	400 (316; 509)	0,006
Creatinina [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	1,83 (1,52; 3,04)	1,28 (1,20; 1,52)	0,010
Urea [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	378 (268; 513)	175 (101; 184)	0,004
NGAL [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	16 (15, 20)	11 (10, 13)	0,008

Los experimentos se realizaron de la manera siguiente:

Creatinina, urea y lipocalina asociada a neutrofil-gelatinasa (NGAL)

Se midieron concentraciones de NGAL en sangre utilizando un ELISA comercial (NGAL de ratón, RUO 042, BioPorto Diagnostics A/S, Dinamarca, Gentofte). Se midieron las concentraciones de urea y creatinina con un sistema de cromatografía de gases en columna capilar/espectrometría de masas (Optima-5MS, Macherey-Nagel, Düren, Alemania)(Agilent 5890/5970, Böblingen, Alemania), utilizando ²H₃-creatinina (isótopos CDN, Point-Claire,

QU, Canadá) y metil-urea (FlukaChemikalien, Buchs, Suiza) como patrones internos. Después de la desproteinización con acetonitrilo, centrifugación y evaporación a sequedad, el sobrenadante se redisolvió en ácido fórmico, y se extrajo a través de una columna de intercambio aniónico débil (WCX, Phenomenex, Aschaffenburg, Alemania). Acetonitrilo más N,O-bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida y N-(terc-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida permitió la formación de los derivados terc-butildimetilsilil- y creatinintrimetilsilil- de urea, respectivamente. En los iones m/z 231 y 245 y m/z 329 y 332 se controlaron los analitos urea y creatinina y patrones internos, respectivamente. A partir de la uremia y de las concentraciones de creatinina en el plasma y en la orina se calculó la depuración creatinina utilizando la fórmula estándar.

10 Preparación de muestras

El riñón que se almacenó a -80°C se disgregó con un homogeneizador en PBS y se lisó con un tampón concentrado 2 veces para un lisado de células enteras (Tris 100 mM pH 7,6; NaCl 500 mM; EDTA 6 mM; EGTA 6 mM; Triton-X-100 al 1%; NP 40 al 0,5%; glicerol al 10%; inhibidores de proteasa (β -glicerofosfato 2 mM; DTT 4 mM; leupeptina 20 mM; ortovanadato sódico 0,2 mM)) y posteriormente se centrifugó. El lisado de células enteras se separó del sobrenadante; se descartó el sedimento consistente en restos de células. La cantidad de proteína se determinó por fotometría con un análisis de proteínas disponible en el mercado (Bio-Rad, Hercules, CA) y las muestras se ajustaron de manera que la concentración final de proteínas fue de 4 μ g/l. Las muestras para el análisis Multiplex- y EMSA se diluyeron 1:1 con tampón EMSA (Hepes 10 mM; KCl 50 mM; glicerol al 10%; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM), las muestras para las inmunotransferencias 1:1 con el doble de tampón de muestra (SDS al 2%; Tris-HCl 125 mM (pH 6,8 a 25°C); glicerol al 10%; DTT 50 mM; azul de bromofenol al 0,01%).

Las concentraciones de quimiocinas (KC) en queratinocitos se determinaron utilizando un kit de citocinas múltiple de ratón (Bio-Plex Pro Cytokine Assay, Bio-Rad, Hercules, CA), el ensayo se realizó utilizando el sistema de chips en suspensión Bio-Plex con las instrucciones del fabricante (véase también Wagner F., Wagner K., Weber S., Stahl B., Knöferl M.W., Huber-Lang M., Seitz D.H., Asfar P., Calzia E., Senftleben U., Gebhard F., Georgieff M., Radermacher P., Hysa V. Inflammatory effects of hypothermia and inhaled H₂S during resuscitated, hyperdynamic murine septic shock. *Shock* 2011; 35:396-402; y Wagner F., Scheuerle A., Weber S., Stahl B., McCook O., Knöferl M.W., Huber-Lang M., Seitz D.H., Thomas J., Asfar P., Szabó C., Möller P., Gebhard F., Georgieff M., Calzia E., Radermacher P., Wagner K. Cardiopulmonary, histologic, and inflammatory effects of intravenous Na₂S after blunt chest trauma-induced lung contusion in mice. *J. Trauma* 2011, 71:1659-1667). En resumen, se añadieron los patrones y las muestras de citocinas adecuadas a una placa filtrante. Las muestras se incubaron con anticuerpos químicamente unidos a microperlas marcadas con fluorescencia. A continuación, se añadieron a cada pocillo anticuerpos de detección premezclados, y posteriormente, se añadió estreptavidina-ficoeritrina. Las perlas se volvieron a poner en suspensión, y la mezcla de reacción de las citocinas se analizó cuantitativamente utilizando el lector de chips de proteínas Bio-Plex. Los datos fueron procesados y analizados automáticamente por el programa informático Manager 4.1 de Bio-Plex utilizando la curva patrón generada a partir de patrones de citocinas recombinantes. Las concentraciones por debajo del límite de detección de los ensayos se ajustaron a cero para fines estadísticos.

40 Ejemplo 9

En el modelo CLP de ratones descrito anteriormente, se investigó el efecto del tratamiento con anticuerpo NT-M anti-adrenomedulina en el hígado.

NT-M produjo una disminución significativa de las concentraciones de quimiocinas (KC) de queratinocitos en el hígado (Fig. 16).

Medición de quimiocinas de queratinocitos (KC) se hizo de manera análoga a la del ejemplo 8 (riñón).

50 Ejemplo 10

En el modelo CLP en ratones descrito anteriormente, se investigó el efecto del tratamiento con anticuerpo NT-M anti-adrenomedulina en varias citocinas y quimiocinas en la circulación sanguínea (plasma).

55 *Concentraciones de citocinas y quimiocinas*

Se determinaron las concentraciones en el plasma del factor de necrosis tumoral (TFN)- α , interleucina (IL)-6, proteína quimiotaxina de monocitos (MCP)-1 y quimiocinas (KC) de queratinocitos utilizando un kit de citocinas múltiple de ratón (Bio-Plex Pro Cytokine Assay, Bio-Rad, Hercules, CA), el ensayo se realizó utilizando el sistema de chips en suspensión Bio-Plex con las instrucciones del fabricante (véase también Wagner F., Wagner K., Weber S., Stahl B., Knöferl M.W., Huber-Lang M., Seitz D.H., Asfar P., Calzia E., Senftleben U., Gebhard F., Georgieff M., Radermacher P., Hysa V. Inflammatory effects of hypothermia and inhaled H₂S during resuscitated, hyperdynamic murine septic shock. *Shock* 2011;35:396-402; y Wagner F., Scheuerle A., Weber S., Stahl B., McCook O., Knöferl M.W., Huber-Lang M., Seitz D.H., Thomas J., Asfar P., Szabó C., Möller P., Gebhard F., Georgieff M., Calzia E., Radermacher P., Wagner K. Cardiopulmonary, histologic, and inflammatory effects of intravenous Na₂S after blunt

chest trauma-induced lung contusion in mice. *J. Trauma* 2011;71:1659-1667). En resumen, se añadieron los patrones y las muestras de citocinas adecuadas a una placa filtrante. Las muestras se incubaron con anticuerpos químicamente unidos a microperlas marcadas con fluorescencia. A continuación, se añadieron a cada pocillo anticuerpos de detección premezclados, y posteriormente, se añadió estreptavidina-ficoeritrina. Las perlas se

volvieron a poner en suspensión, y la mezcla de reacción de citocinas se analizó cuantitativamente utilizando el lector de chips de proteínas Bio-Plex. Los datos fueron procesados y analizados automáticamente con el programa informático Manager 4.1 de Bio-Plex utilizando la curva patrón generada a partir de patrones de citocinas recombinantes. Los niveles por debajo del límite de detección de los análisis se ajustaron a cero con fines estadísticos.

Se determinaron las concentraciones en el plasma y las concentraciones en el tejido renal de factor de necrosis tumoral (TFN)- α , interleucina (IL)-6 e IL-10, proteína quimiotaxina de monocitos (MCP)-1 y quimiocinas (KC) de queratinocitos utilizando un "Multiplex Cytokine Kit" disponible en el mercado (Bio-Plex Pro Precision Pro Cytokine Assay, Bio-Rad, Hercules, CA), que permite recoger varios parámetros de una sola muestra. Las etapas de trabajo individuales del ensayo se realizaron según las instrucciones del fabricante (véase también Wagner F., Wagner K., Weber S., Stahl B., Knöferl M.W., Huber-Lang M., Seitz D.H., Asfar P., Calzia E., Senftleben U., Gebhard F., Georgieff M., Radermacher P., Hysa V. Inflammatory effects of hypothermia and inhaled H₂S during resuscitated, hyperdynamic murine septic shock. *Shock* 2011;35:396-402; y Wagner F., Scheuerle A., Weber S., Stahl B., McCook O., Knöferl M.W., Huber-Lang M., Seitz D.H., Thomas J., Asfar P., Szabó C., Möller P., Gebhard F., Georgieff M., Calzia E., Radermacher P., Wagner K. Cardiopulmonary, histologic, and inflammatory effects of intravenous Na₂S after blunt chest trauma-induced lung contusion in mice. *J. Trauma* 2011;71:1659-1667).

En resumen, se añadieron microesferas marcadas con fluorescencia ("perlas") a una placa de 96 pocillos, seguido de dos etapas de lavado, la adición de patrones internos y la adición de muestras de homogeneizado de plasma y riñón. Durante la posterior incubación las citocinas aisladas se unen a los anticuerpos unidos a perlas de poliestireno. Después de la adición de los anticuerpos específicos de citocinas marcados con biotina, que son para la detección de las citocinas aisladas, y un tiempo adicional de incubación, posteriormente se añadió estreptavidina marcada con ficoeritrina. Después de un tiempo de incubación adicional, se volvieron a poner en suspensión las perlas, y las placas se pudieron medir con un citómetro de flujo específico (sistema de chips en suspensión Bio-Plex, Bio-Rad, Hercules, CA). Los datos fueron procesados y analizados automáticamente por el programa informático Manager 4.1 de Bio-Plex utilizando la curva patrón generada a partir de los patrones de citocinas recombinantes. Para las concentraciones en el plasma la concentración se proporcionó en pg*ml⁻¹, la concentración de los homogeneizados de riñón se convirtió en la concentración de proteína apropiada y se proporcionó en pg*mg⁻¹ de proteína.

NT-M produjo una disminución significativa de las concentraciones plasmáticas de IL-6 (Fig. 17), IL-10 (Fig.18), quimiocina (KC) de queratinocitos (Fig. 19), proteína 1 quimiotaxina de monocitos (MCP-1) (Fig. 20), TFN-alfa (Fig. 21).

Ejemplo 11

Lesión renal aguda provocada por isquemia/reperfusión

Se ha creado otro modelo de lesión renal aguda no septicémica, donde la lesión renal aguda está provocada por isquemia/reperfusión (Nakamoto M., Shapiro J.I., Shanley P.F., Chan L. y Schrier R.W.. *In vitro* and *in vivo* protective effect of atriopeptin III on ischemic acute renal failure. *J. Clin. Invest.* 80:698-705, 1987., Chintala M.S., Bernardino V., y Chiu P.J.S. Cyclic GMP but not cyclic AMP prevents renal platelet accumulation following ischemiare perfusion in anesthetized rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271:1203-1208, 1994). Este modelo se utilizó para evaluar si el tratamiento con anticuerpo anti-adrenomedulina puede mejorar la función renal.

El experimento se realizó de la manera siguiente:

Efecto de un NT-M en la lesión renal aguda provocada por isquemia/reperfusión en ratas

Diseño del estudio:						
Grupo	Artículo de prueba	Vía	Conc. mg/ml	Dosis ml/kg	mg/kg	Ratas (macho)
1	IR + vehículo ^a	IV		5	NA x 3	8
2	IR + NT-M	IV		5	x 3 ^b	8

^avehículo; inyectado por vía intravenosa (IV) 5 min. antes de la reperfusión el día 0, seguido de inyecciones los días 1 y 2.
^bNT-M a 4 mg/kg se inyectó por vía intravenosa (IV) 5 min. antes de la reperfusión el día 0, seguido de 2 mg/kg IV cada uno los días 1 y 2.
^c Obtención de muestras de orina los días -1, 0, 1 y 2, con análisis de sangre y análisis de orina los días 0, 1, 2 y 3, respectivamente. Las muestras de plasma se recogieron en tubos con EDTA (Días 0 (inmediatos antes de la intervención quirúrgica), 1, 2: 100 μ l, antes del vehículo o TA; Día 3: 120 μ l.

Observaciones clínicas: todos los días antes de la intervención quirúrgica, después de la intervención quirúrgica y durante el tratamiento.

Se utilizaron grupos de 8 ratas macho Sprague-Dawley que pesaban 250 a 280 g. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y recibieron una dieta normal con agua destilada a discreción. Los animales reciben complementos líquidos (NaCl al 0,9% y dextrosa al 5%/01:01, 10 ml/kg p.o.) 30 min. antes de la intervención quirúrgica (día 0). Las ratas se anestesiaron con pentobarbital (50 mg/kg, ip.). La cavidad abdominal se expuso a través de una incisión en la línea media, seguido de la administración intravenosa de heparina (100 U/kg, iv.) y ambas arterias renales se ocluyeron durante 45 minutos utilizando pinzas vasculares. Inmediatamente después de la retirada de los clips renales, se observaron los riñones durante 1 min. más para asegurar el cambio de color que indica la reperfusión de la sangre. El compuesto de ensayo (NT-M) y el vehículo (solución salina tamponada con fosfato) se inyectaron por vía intravenosa 5 min. antes de la reperfusión, seguido de inyecciones diarias los días 1 y 2.

Obtención de muestras de orina. La obtención de muestras de orina en hielo de 24 h se inició 24 horas antes de la isquemia/reperfusión el día -1 (-24 h a 0h), y el día 0 (0 a 24 h), el día 1 (24 a 48 h) y el día 2 (48 a 72 h) después de la reperfusión.

Extracción sanguínea: Se extrajeron 0,4 ml de sangre de la vena de la cola en tubos con EDTA a las 0 h (antes de la intervención quirúrgica I RI), 24 h (antes del vehículo o TA), 48 h (antes de vehículo o TA) y 72 h para la determinación de creatinina/ Na^+ / K^+ y BUN en el plasma; se extrajeron 2 ml de sangre de la vena cava finalmente.

Los animales se colocaron en jaulas individuales en las que se recogió orina durante 24 h el día -1 (-24 h a 0 h), día 0 (0 a 24 h), día 1 (24 a 48 h) y día 2 (48 a 72 h) después de la reperfusión el día 0. Se midieron el volumen de orina, Na^+ , K^+ y la creatinina.

La depuración de creatinina (CCr) se calculó de la manera siguiente:

$$\text{CCr (ml/24 h)} = [\text{UCr (mg/ml)} \times \text{V (ml/24 h)}] / \text{PCr (mg/ml)}$$

La excreción urinaria de sodio (Na^+) en 24 h se calculó de la manera siguiente:

$$\text{UNaV (}\mu\text{Eq/24 h)} = \text{UNa (}\mu\text{Eq/ml)} \times \text{V (ml/24 h)}$$

La excreción fraccionaria de Na^+ (FENa), o el porcentaje de sodio filtrado que se excreta en la orina final, es una medida de la función de reabsorción de Na^+ tubular. Se calculó de la manera siguiente:

$$\text{FENa (\%)} = 100 \times [\text{UNa (}\mu\text{Eq/ml)} \times \text{V (ml/24 h)}] / \text{PNa (}\mu\text{Eq/ml)} \times \text{CCr (ml/24 h)}$$

El tratamiento con anticuerpos anti-Adrenomedulina mejoró varias medidas de la función renal:

Nitrógeno ureico en sangre (BUN) presentó un fuerte incremento en el grupo del vehículo (0 h: 17,49 mg/dl, 24 h: 98,85 mg/dl, 48 h: 109,84 mg/dl, 72 h: 91,88 mg/dl), que era menos pronunciado con el tratamiento de NT-M (0 h: 16,33 mg/dl, 24 h: 84,2 mg/dl, 48 h: 82,61 mg/dl, 72 h: 64,54 mg/dl) (Fig. 22).

La creatinina sérica desarrolló igualmente: Grupo de vehículo (0 h: 0,61 mg/dl, 24 h: 3,3 mg/dl, 48 h: 3,16 mg/dl, 72 h: 2,31 mg/dl), grupo de NT-M: (0 h: 0,59 mg/dl, 24 h: 2,96 mg/dL, 48 h: 2,31 mg/dL, 72 h: 1,8 mg/dL) (Fig. 23).

La depuración de creatinina endógena disminuyó fuertemente el día uno y a partir de entonces mejoró más en el grupo NT-M que en el grupo del vehículo. Grupo del vehículo: (0 h: 65,17 ml/h, 24 h: 3,5 ml/h, 48 h: 12,61 ml/h, 72 h: 20,88 ml/h), grupo NT-M: (0 h: 70,11 ml/h, 24 h: 5,84 ml/h, 48 h: 21,23 ml/h, 72 h: 26,61 ml/h) (Fig. 24).

Descripción de las figuras

Fig. 1a:

Ilustración de formatos de anticuerpos – Variantes Fv y scFv

Fig. 1b:

Ilustración de formatos de anticuerpos - fusiones heterólogas y anticuerpos bifuncionales

Fig. 1c:

Ilustración de formatos de anticuerpos - anticuerpos bivalentes y anticuerpos biespecíficos

Fig. 2:

hADM 1-52 (SEC. ID. nº 21)
MADm 1-50 (SEC. ID. nº 22)
5 aa 1-21 de ADM humana (SEC. ID. nº 23)
aa 1-42 de ADM humana (SEC. ID. nº 24)
aa 43-52 de ADM humana (SEC. ID. nº 25)
aa 1-14 de ADM humana (SEC. ID. nº 26)
10 aa 1-10 de ADM humana (SEC. ID. nº 27)
aa 1-6 de ADM humana (SEC. ID. nº 28)
aa 1-32 de ADM humana madura (SEC. ID. nº 29)
aa 1-40 de ADM murina madura (SEC. ID. nº 30)
aa 1-31 de ADM murina madura (SEC. ID. nº 31)

Fig. 3:

a: curva de respuesta a la dosis de ADM humana. La estimulación máxima de cAMP se ajustó a la activación del 140%

20 b: Curva de dosis/inhibición de ADM humana 22-52 (antagonista del receptor de ADM) en presencia de hADM 5,63 nM.

c: Curva de dosis/inhibición de CT-H en presencia de hADM 5,63 nM.

25 d: Curva de dosis/inhibición de MR-H en presencia de hADM 5,63 nM.

e: Curva de dosis/inhibición de NT-H en presencia de hADM 5,63 nM.

30 f: Curva de dosis/respuesta de ADM de ratón. La estimulación máxima de cAMP se ajustó a la activación del 100%

g: Curva de dosis/inhibición de ADM humana 22-52 (antagonista del receptor de ADM) en presencia de MADM 0,67 nM.

35 h: Curva de dosis/inhibición de CT-M en presencia de MADM 0,67 nM.

i: Curva de dosis/inhibición de MR-M en presencia de MADM 0,67 nM.

40 j: Curva de dosis/inhibición de NT-M en presencia de MADM 0,67 nM.

k: muestra la inhibición de ADM por Fab₂ de NT-M y por Fab de NT-M

l: muestra la inhibición de ADM por Fab₂ de NT-M y por Fab de NT-M

Fig. 4:

Esta figura muestra una curva de dosis de hADM/señal típica. Y una curva de dosis hADM/señal en presencia de 100 µg/ml de anticuerpo NT-H.

Fig. 5:

Esta figura muestra la estabilidad de hADM en el plasma humano (citrato) en ausencia y en presencia de anticuerpo NT-H.

Fig. 6:

Alineación de los Fab con secuencias marco humano homólogas

Fig. 7:

Esta figura muestra los requisitos de noradrenalina para el tratamiento precoz y tardío con NT-M

Fig. 8:

Esta figura muestra la diuresis después del tratamiento precoz y tardío con NT-M

Fig. 9:

Esta figura muestra el balance hídrico después del tratamiento precoz y tardío con NT-M

5 Fig.10:

Activación de tejido hepático del potenciador génico de la cadena ligera kappa del factor nuclear en linfocitos B (NF-κB) analizada por el ensayo de cambio de movilidad electroforético (EMSA). # representa p <0,001 frente al vehículo.

10

Fig.11:

Evolución de la creatinina sérica con el tiempo. Se muestran media ± SEM.

15 Fig. 12:

Evolución de nitrógeno ureico en sangre (BUN) con el tiempo. Se muestran media ± SEM.

Fig.13:

20

Evolución de la depuración de creatinina endógena con el tiempo. Se muestran media ± SEM.

Fig. 14:

25

Evolución de la secreción fraccionada de Na⁺ con el tiempo. Se muestran media ± SEM.

Fig. 15:

30

Concentraciones de quimiocinas de queratinocitos (KC) determinadas con respecto a la proteína renal total extraída. El diagrama de caja blanca muestra los resultados obtenidos con el vehículo, el diagrama de caja gris muestra los resultados obtenidos tras el tratamiento con NT-M.

Fig. 16:

35

Concentraciones de queratinocitos de quimiocinas (KC) determinadas con respecto a la proteína total del hígado extraída. El diagrama de caja blanca muestra los resultados obtenidos con el vehículo, el diagrama de caja gris muestra los resultados obtenidos tras el tratamiento con NT-M.

Fig. 17:

40

Concentraciones de IL-6 en el plasma. El diagrama de caja blanca muestra los resultados obtenidos con el vehículo, el diagrama de caja gris muestra los resultados obtenidos tras el tratamiento con NT-M.

Fig. 18:

45

Concentraciones de IL-10 en el plasma. El diagrama de caja blanca muestra los resultados obtenidos con el vehículo, el diagrama de caja gris muestra los resultados obtenidos tras el tratamiento con NT-M.

Fig. 19:

50

Concentraciones en el plasma de quimiocinas de queratinocitos (KC). El diagrama de caja blanca muestra los resultados obtenidos con el vehículo, el diagrama de caja gris muestra los resultados obtenidos tras el tratamiento con NT-M.

Fig. 20:

55

Concentraciones en el plasma de proteína-1 (MCP-1) quimiotáctica de monocitos. El diagrama de caja blanca muestra los resultados obtenidos con el vehículo, el diagrama de caja gris muestra los resultados obtenidos tras el tratamiento con NT-M.

60

Fig. 21:

Concentraciones plasmáticas de TFN-alfa. El diagrama de caja blanca muestra los resultados obtenidos con el vehículo, el diagrama de caja gris muestra los resultados obtenidos tras el tratamiento con NT-M.

65

Fig. 22:

Evolución de nitrógeno ureico en sangre (BUN) con el tiempo. Se muestran media \pm SEM.

Fig. 23:

5

Evolución de la creatinina sérica con el tiempo. Se muestran media \pm SEM.

Fig. 24:

10

Evolución de la depuración de creatinina endógena con el tiempo. Se muestran media \pm SEM.

REIVINDICACIONES

5 1. Anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para su utilización como medicamento, en el que dicho anticuerpo, fragmento o andamiaje se une a la parte del terminal N, aminoácidos 1 a 21, de adrenomedulina:

YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC; SEC. ID. nº 23.

10 2. Anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para su utilización como medicamento según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo, fragmento de anticuerpo o andamiaje es mono-específico.

15 3. Anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para su utilización como medicamento según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho anticuerpo, fragmento o andamiaje presenta una afinidad de unión a ADM de por lo menos 10^{-7} M.

20 4. Anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para su utilización como medicamento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo, fragmento o andamiaje no es la proteína-1 de unión a ADM, factor H del complemento.

25 5. Anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para su utilización como medicamento, en el que dicho anticuerpo, dicho fragmento o dicho andamiaje según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 se une a un epítipo que contiene el extremo del terminal N; el aminoácido 1; de adrenomedulina.

30 6. Anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o el andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para su utilización como medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que dicho anticuerpo, fragmento de anticuerpo o andamiaje sin Ig no se une a la parte del terminal C de ADM, que son los aminoácidos 43-52 de ADM

PRSKISPQGY-NH2; SEC. ID. nº 25.

35 7. Anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para su utilización como medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho anticuerpo, dicho fragmento o dicho andamiaje es un anticuerpo, fragmento o andamiaje estabilizante de ADM que aumenta la vida media, el tiempo medio de retención $t_{1/2}$, de adrenomedulina en el suero, la sangre, el plasma, por lo menos el 10%, o por lo menos el 50%, o > 50%, o el 100% y/o en el que dicho anticuerpo, fragmento o andamiaje bloquea la bioactividad de ADM circulante no más del 50%, como se determina en un análisis funcional de cAMP receptor de adrenomedulina recombinante humana.

45 8. Anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para su utilización como medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho anticuerpo, fragmento o andamiaje es un anticuerpo, fragmento o andamiaje anti-ADM modulador que aumenta la vida media, el tiempo medio de retención $t_{1/2}$, de adrenomedulina en el suero, la sangre, el plasma, por lo menos el 10%, o por lo menos el 50%, o > 50%, o el 100% y que bloquea la bioactividad de ADM a no más del 50%, según se determina en un análisis funcional de cAMP receptor de adrenomedulina recombinante humana.

50 9. Anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina para su utilización como medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho anticuerpo o fragmento es un anticuerpo mono-específico o un fragmento de anticuerpo mono-específico que se une a ADM o un fragmento de anticuerpo del mismo que se une a ADM, en el que la cadena pesada comprende las secuencias:

55 SEC. ID. nº 1
GYTFSRYW

60 SEC. ID. nº 2
ILPGSGST

SEC. ID. nº 3
TEGYEYDGFYD

65 y comprendiendo la cadena ligera las secuencias

SEC. ID. nº 4
QSIVYSNGNTY

5 SEC. ID. nº 5
RVS

SEC. ID. nº 6
FQGSHIPYT.

10 10. Anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina para su utilización como medicamento según cualquiera la reivindicación 9, en el que dicho anticuerpo o fragmento es un anticuerpo o fragmento monoespecífico que se une a ADM o un fragmento de anticuerpo del mismo, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende las secuencias:

15 SEC. ID. nº 7;
AM-VH-C

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSRYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGS
TNYNEKFKGKATITADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGFYWGQGT
LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

20 SEC ID nº: 8;
AM-VH1

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGRILPGSG
STNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

25 SEC ID nº: 9;
AM-VH2-E40

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGRILPGSG
STNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

30 SEC ID nº: 10;
AM-VH3-T26-E55

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKATGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGEILPGSG
STNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

35 SEC ID nº: 11;
AM-VH4-T26-E40-E55

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKATGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSG
STNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEC ID nº: 12;
AM-VL-C

DVLLSQTPSLPLVSLGDQATISCRSSQSIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHIPYTFGGGTKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

SEC ID nº: 13;
AM-VL1

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYRVSNR
RDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGQGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

SEC ID nº: 14;
AM-VL2-E40

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLEWFQQRPGQSPRRLIYRVSNR
DSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGQGTKLEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15

11. Anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un vasopresor, por ejemplo, catecolamina para su utilización como medicamento.

20

12. Anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y una administración de fluido por vía intravenosa para su utilización como medicamento.

25

13. Anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y un anticuerpo contra el TFN-alfa para su utilización como medicamento.

30

14. Anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y antibióticos para su utilización como medicamento.

35

15. Composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un andamiaje proteico sin Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para su utilización como medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

Fig. 1a:

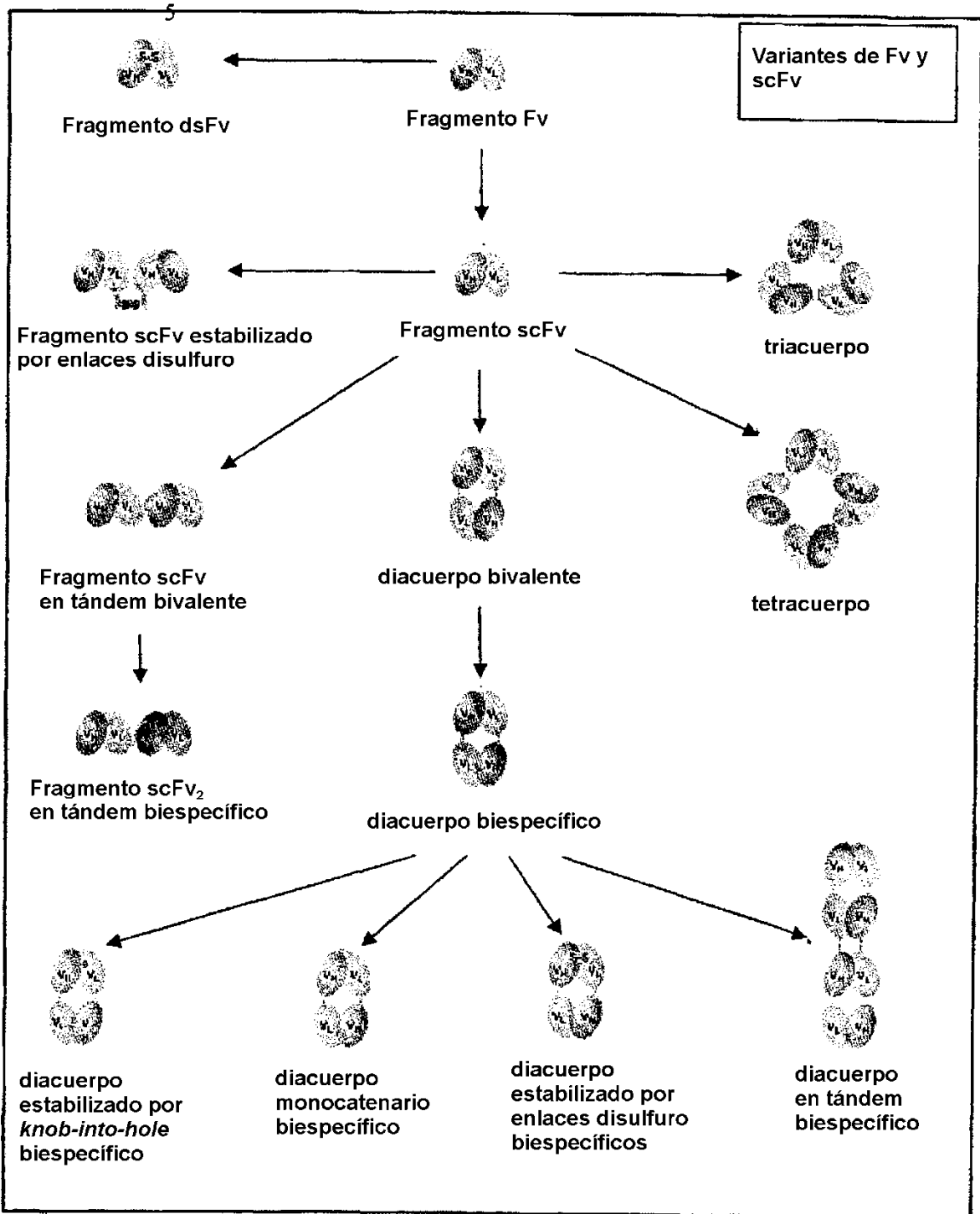


Fig 1b:

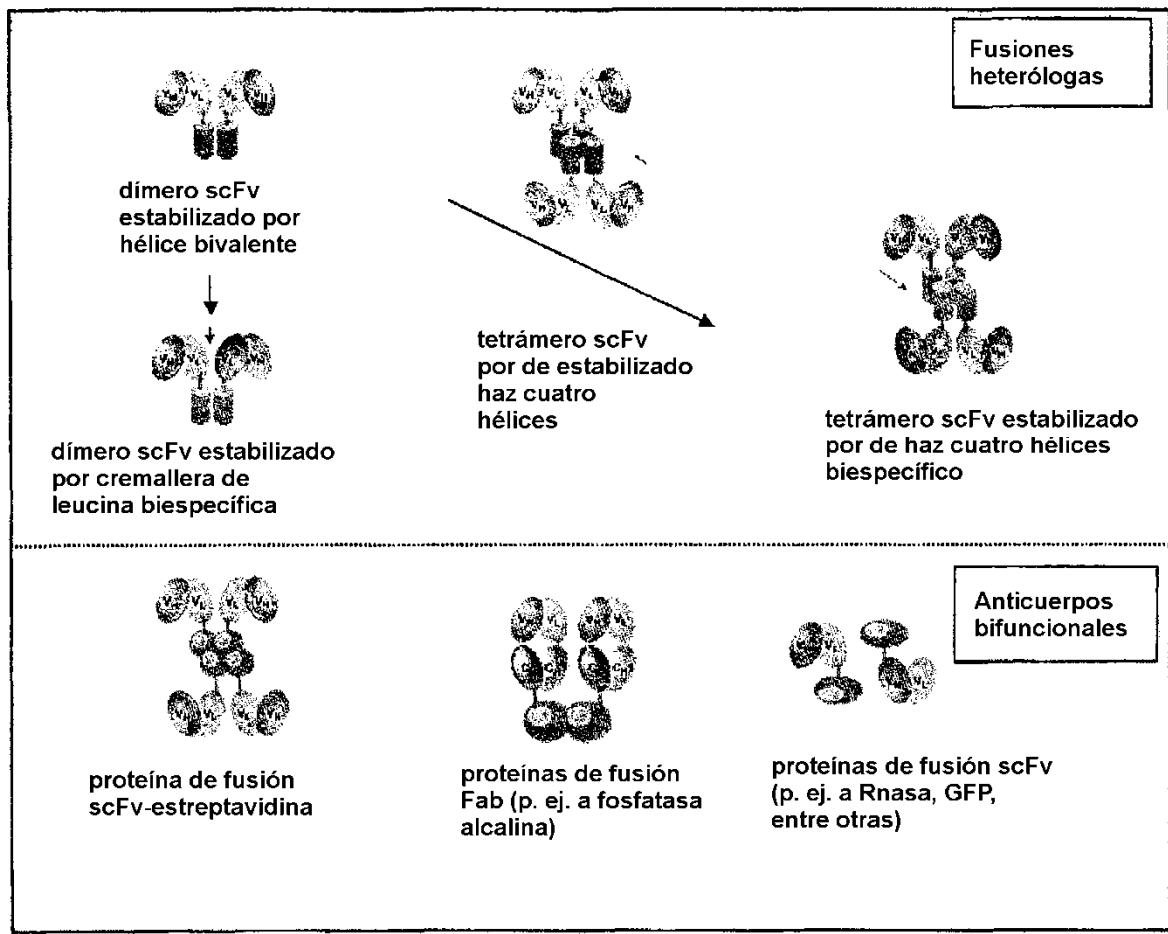


Fig. 1c:

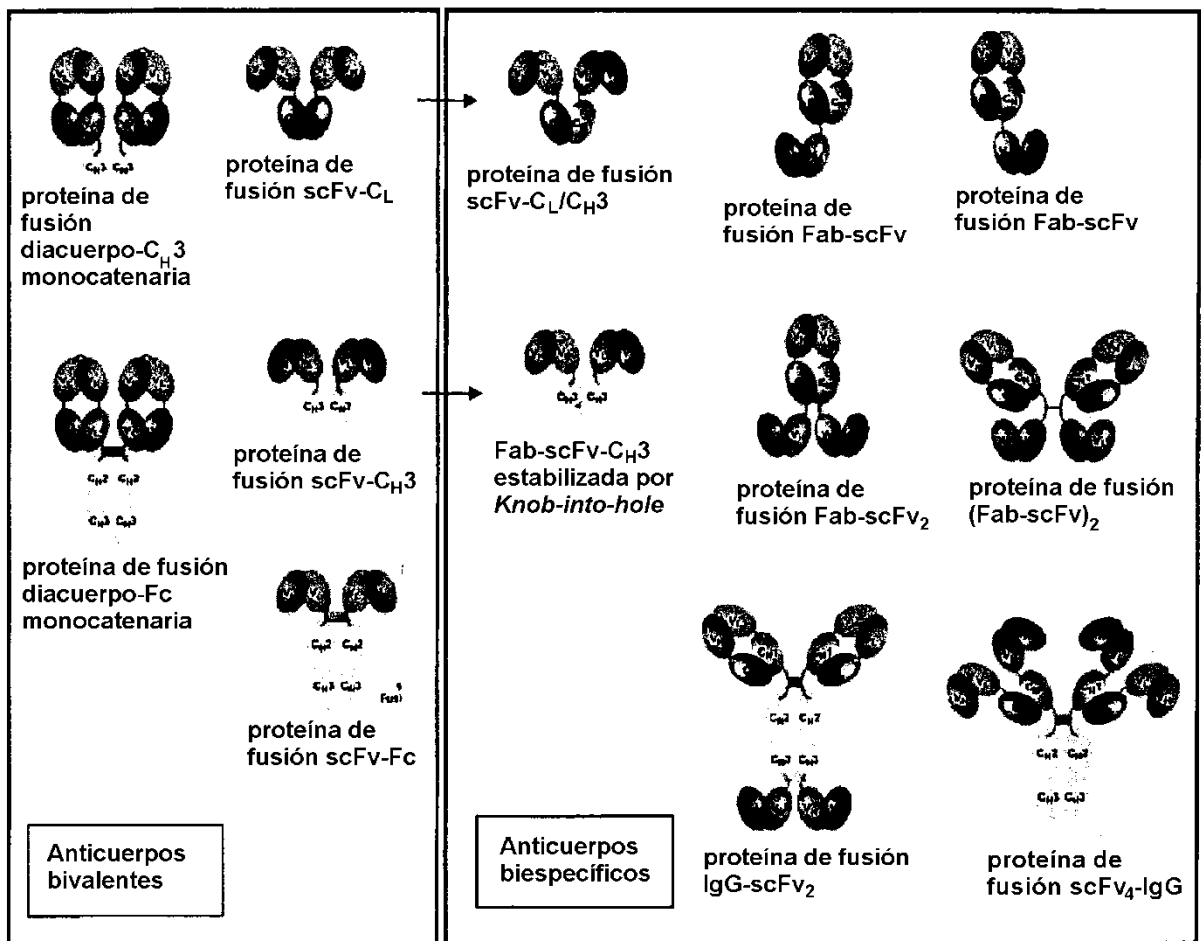


Fig. 2:

SEC. ID. n° 21

YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY-NH₂

SEC. ID. n° 22

YRQSMNQGSRSNGCRFGTCTFQKLAHQIYQLTDKDKDGMAPRNKISPQGY-NH₂

SEC. ID. n° 23

YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC

SEC. ID. n° 24

YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVA

SEC. ID. n° 25

PRSKISPQGY-NH₂

SEC. ID. n° 26

YRQSMNNFQGLRSF

SEC. ID. n° 27

YRQSMNNFQG

SEC. ID. n° 28

YRQSMN

SEC. ID. n° 29

YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQ

SEC. ID. n° 30

YRQSMNQGSRSNGCRFGTCTFQKLAHQIYQLTDKDKDGMA

SEC. ID. n° 31

YRQSMNQGSRSNGCRFGTCTFQKLAHQIYQL

Fig. 3 a:

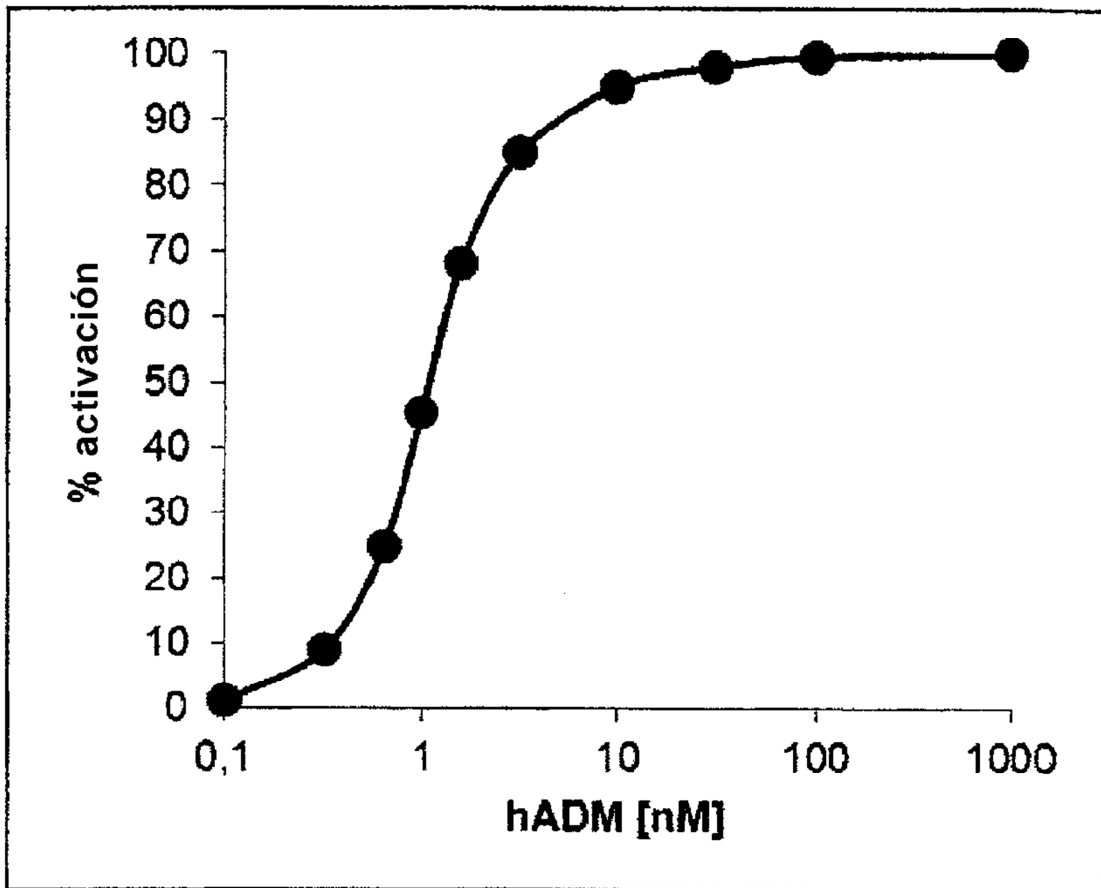


Fig. 3 b:

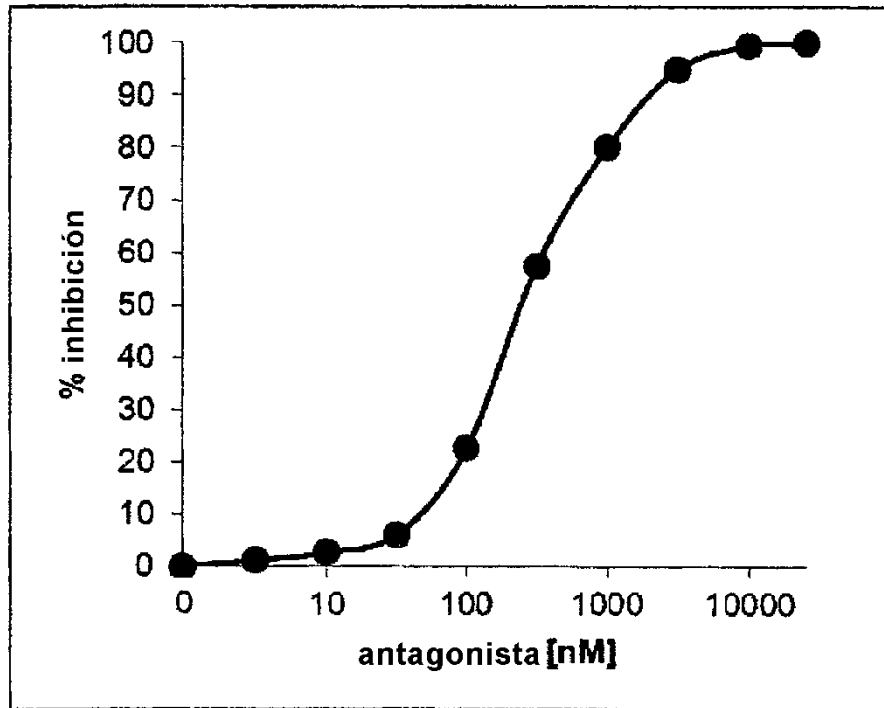


Fig. 3 c:

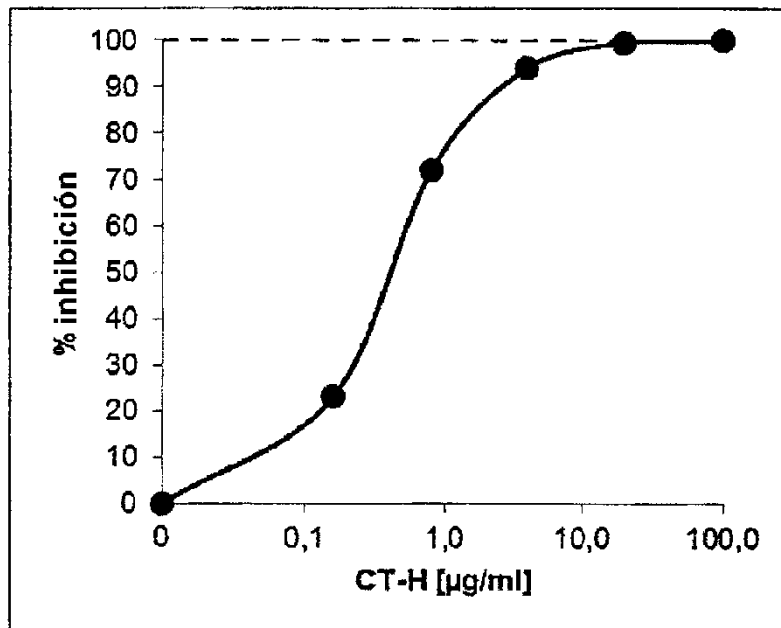


Fig. 3 d:

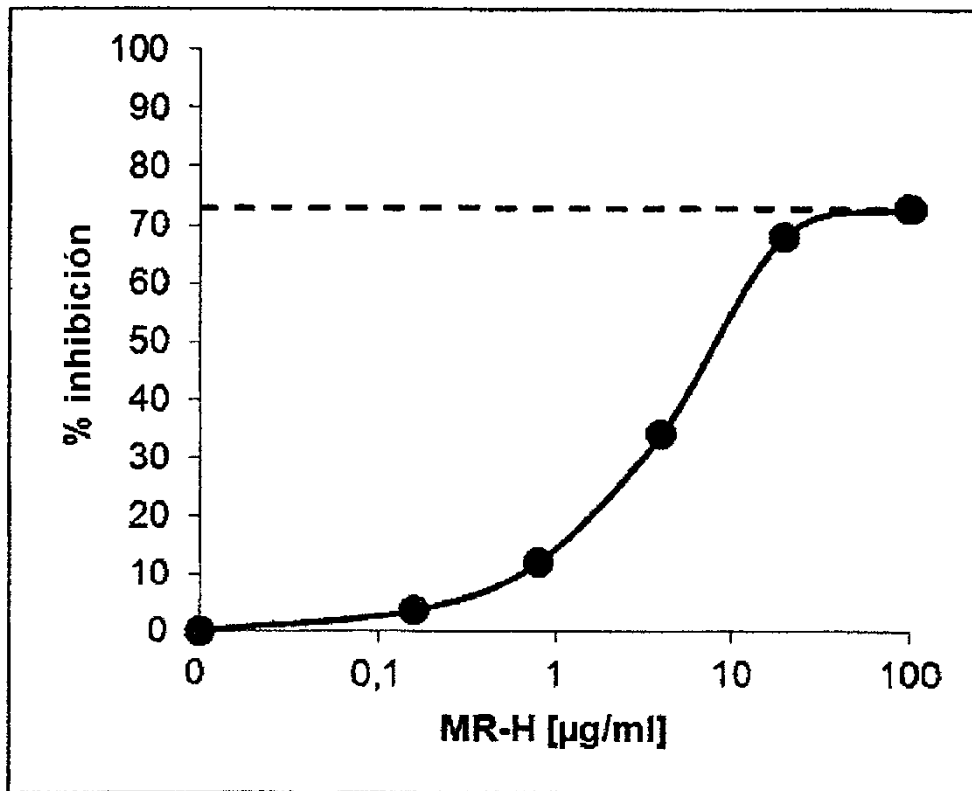


Fig. 3 e:

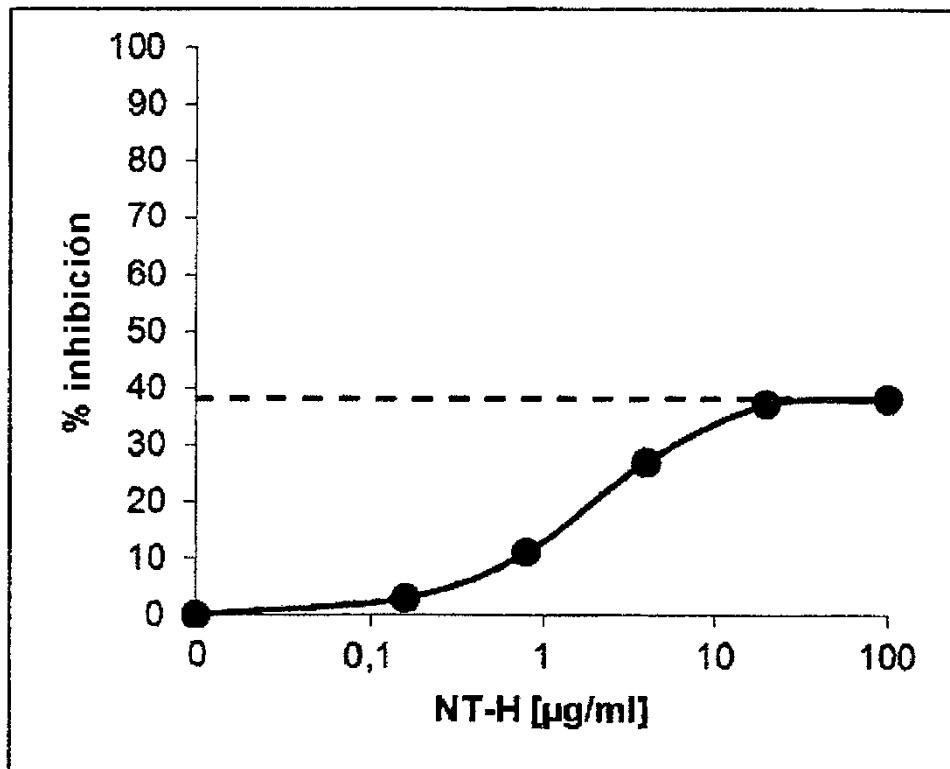


Fig. 3 f:

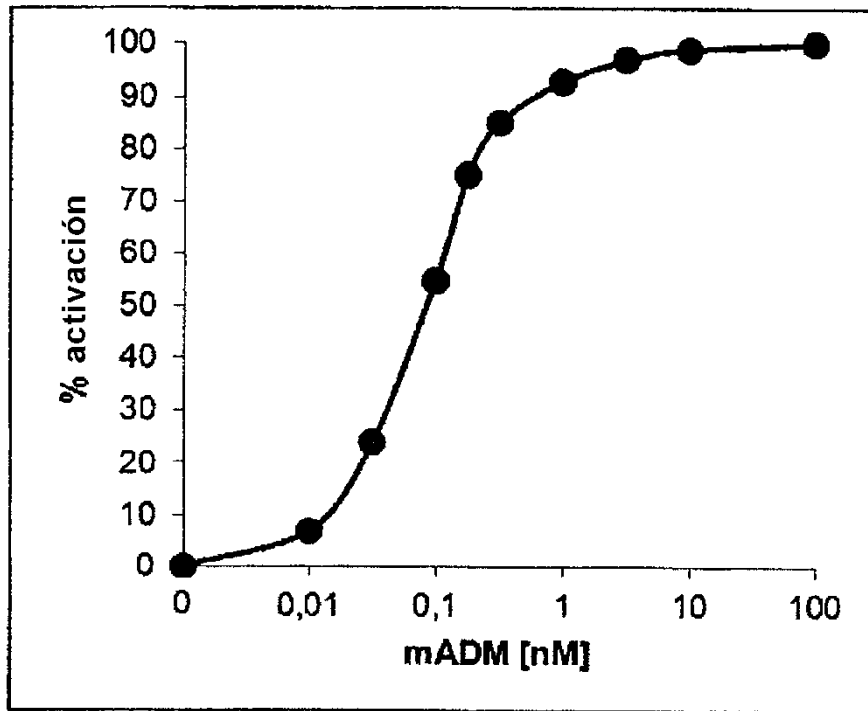


Fig. 3 g:

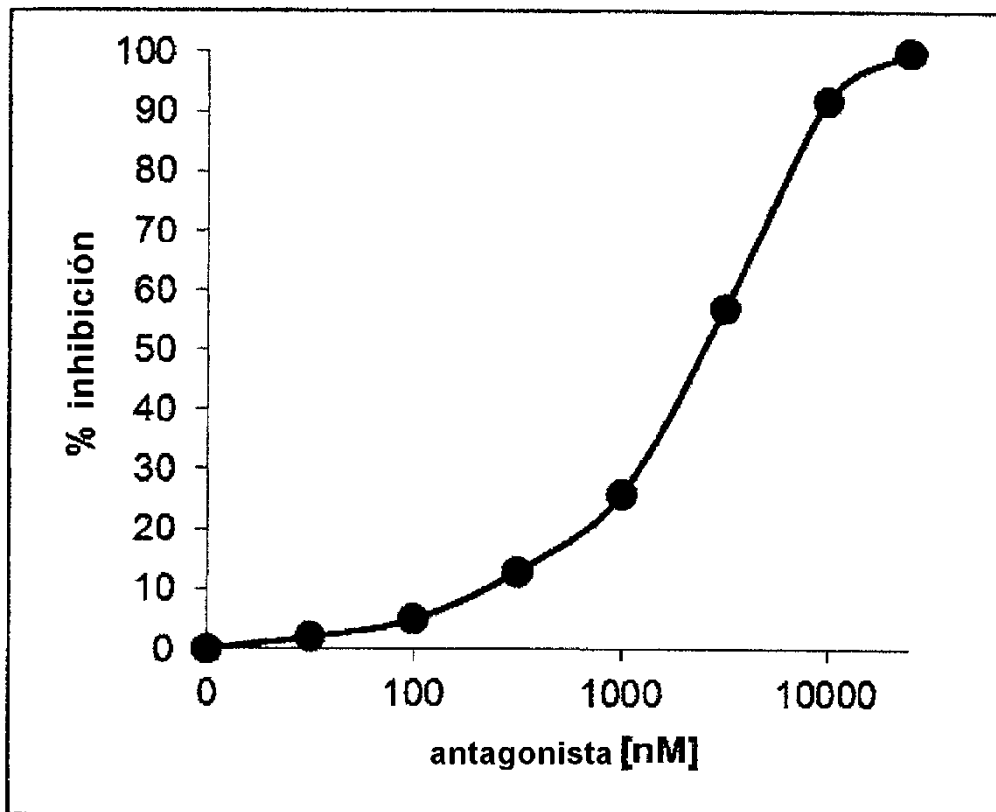


Fig. 3 h:

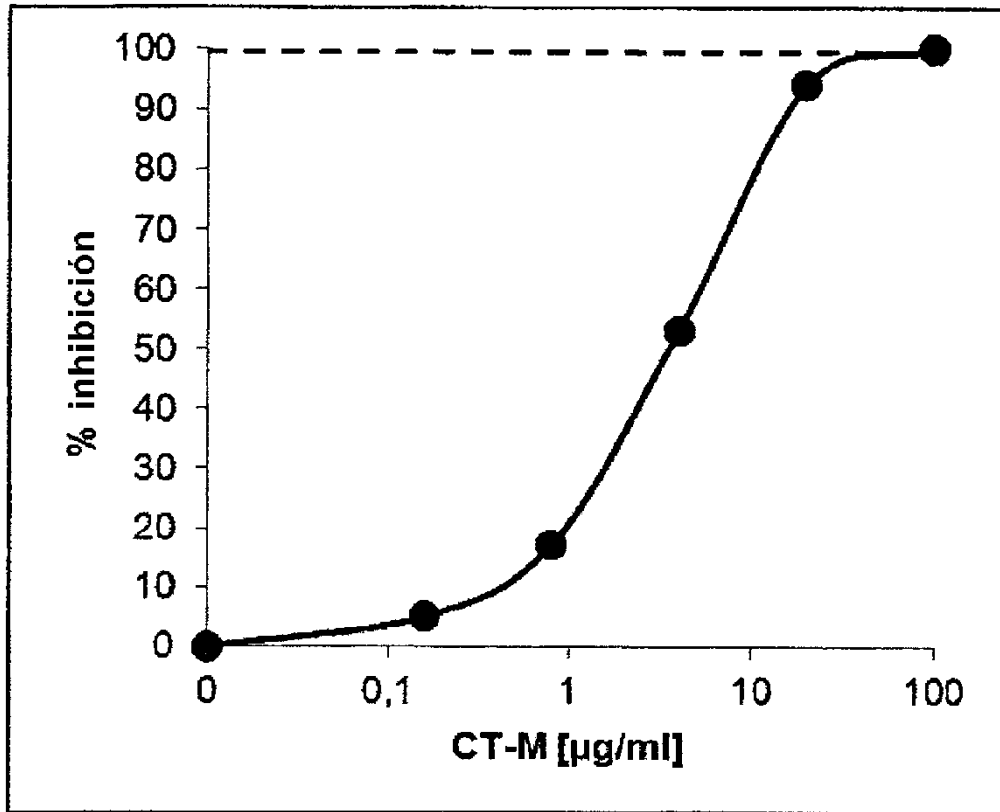


Fig. 3 i:

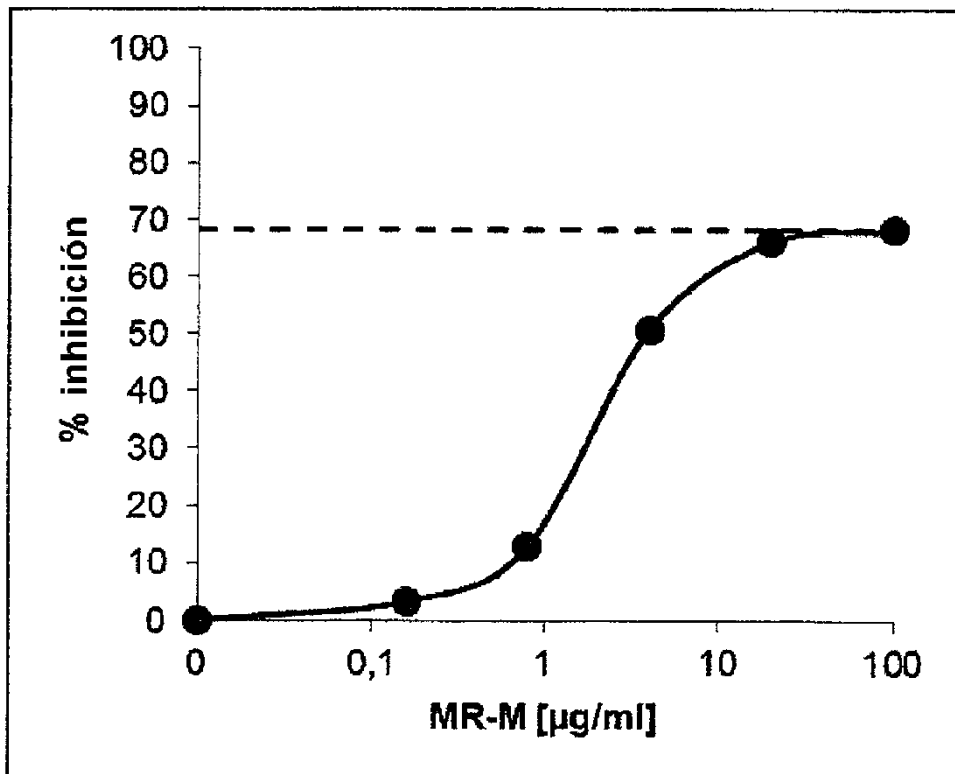


Fig. 3 j:

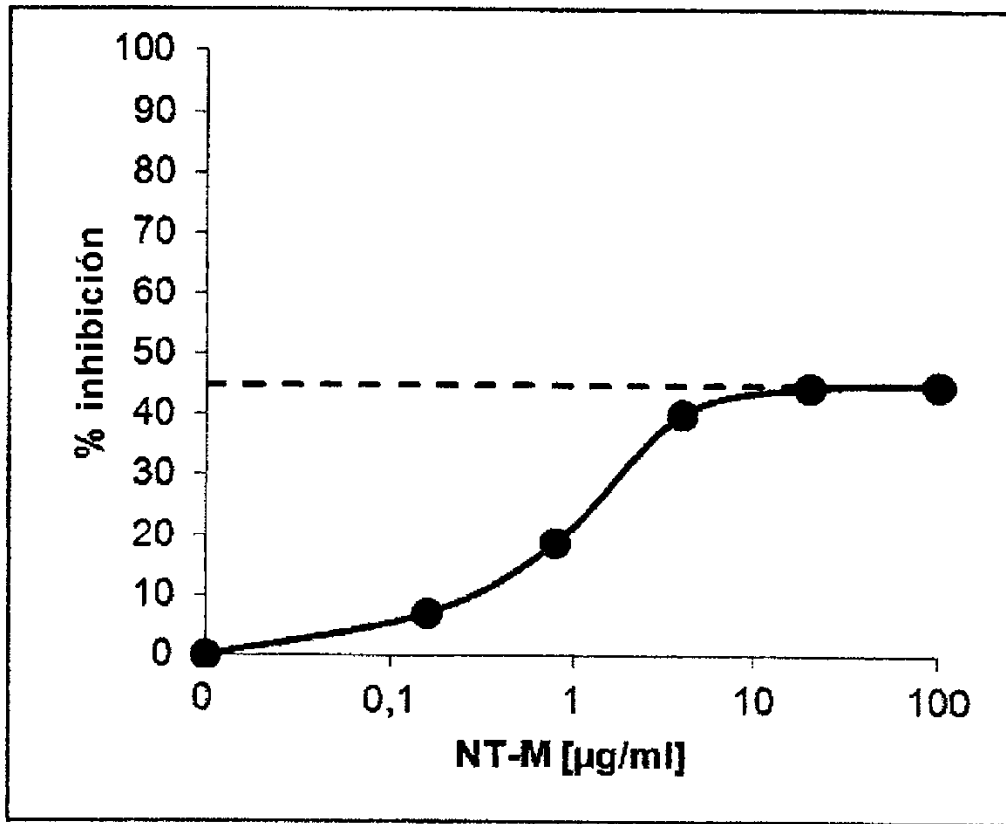


Fig. 3 k:

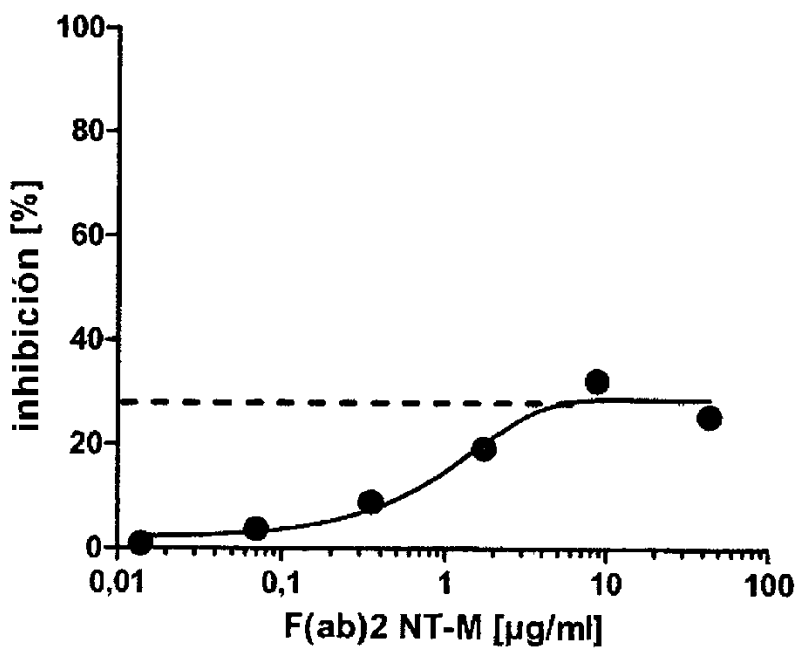


Fig. 3 l:

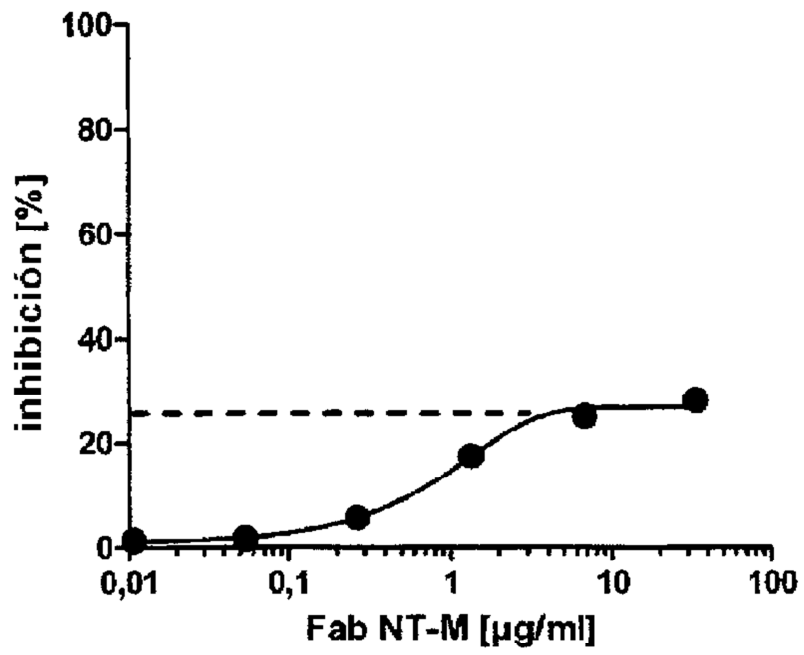


Fig. 4:

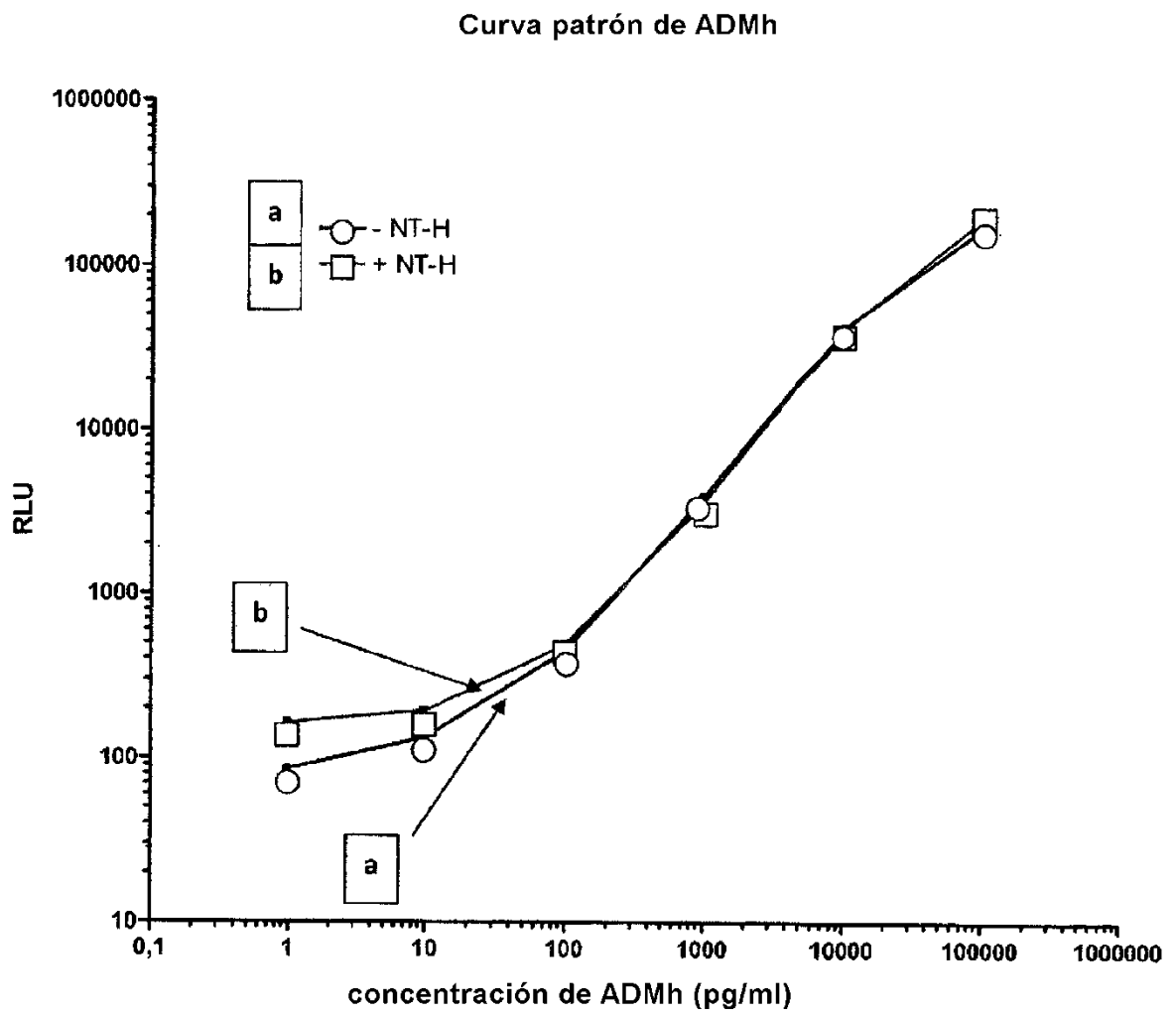


Fig. 5:

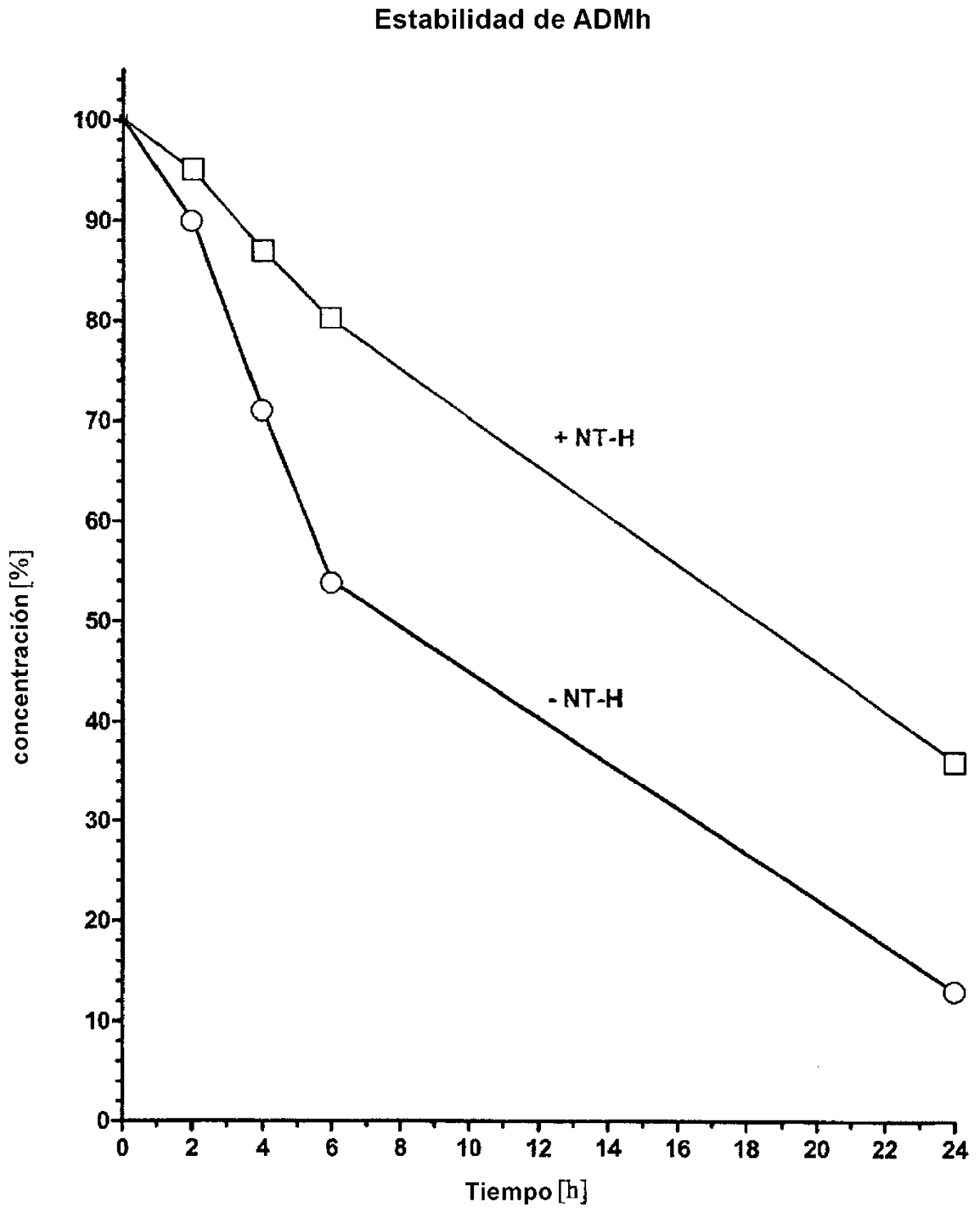


Fig 6:

IGHV1-69*11:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGT
 ANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYYYYYYGM DVWGQGT
 TVTVSS

HB3:

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSTRYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGS
 TNYNEKFKGKATITADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGF DYWGQGT
 LTVSS

Alineación (ClustalW2): Los aminoácidos idénticos se ilustran con asteriscos; los puntos indican cambios conservadores.

IGHV1 :

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGTANYAQKFQGR
 VTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYYYYYYGM DVWGQGTTVTVSS

HB3 :

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSTRYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGSTNYNEKFKGK
 ATITADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGF DYWGQGTTLTVSS

**** *****; ***:***:****.* *** * *.**:* **:*****:*.**:* *;:** ;**:*;
 .***** *; .*****:**** **_.*****;. * * *:* *****;*****

Fig. 7

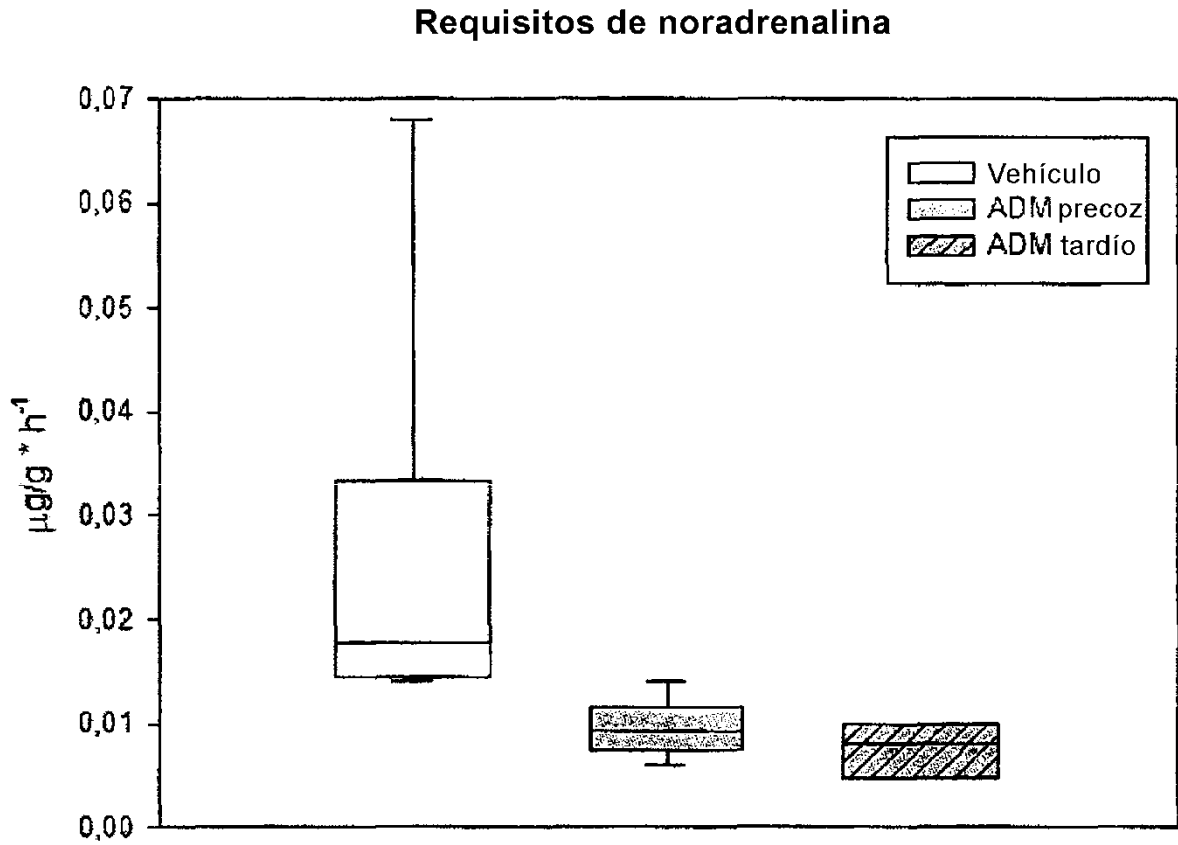


Fig. 8

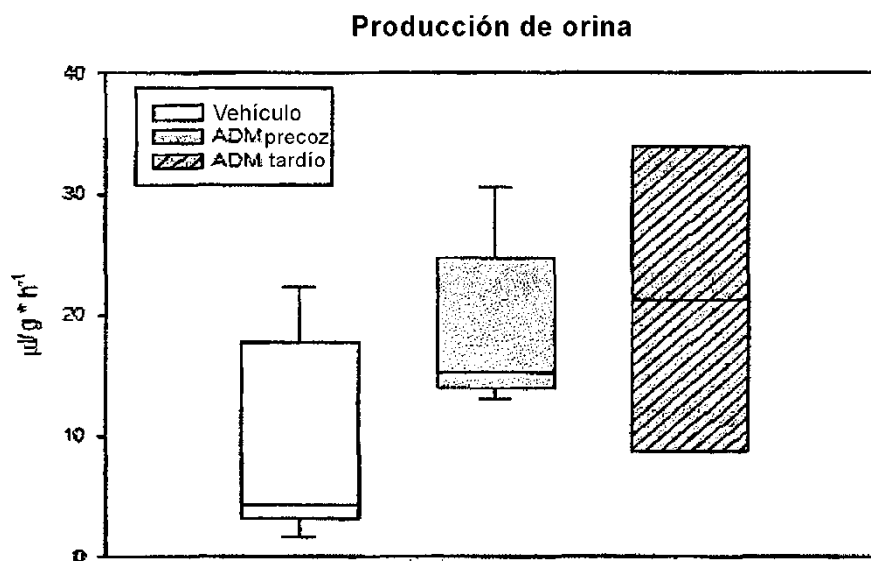


Fig. 9

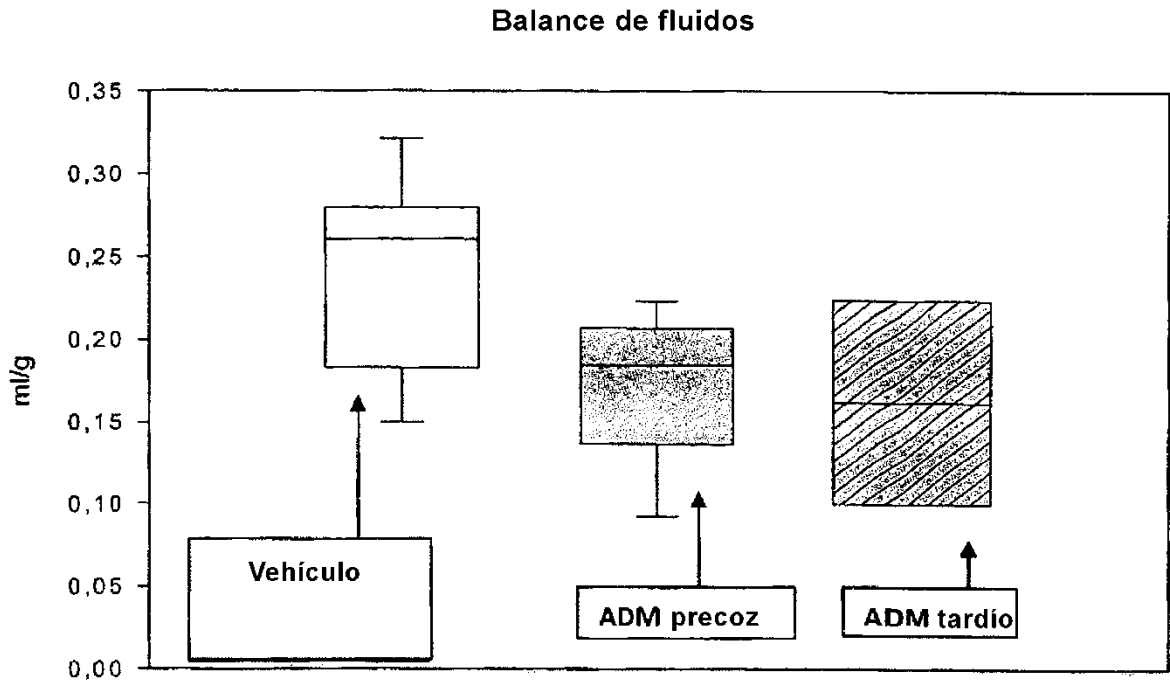


Fig. 10

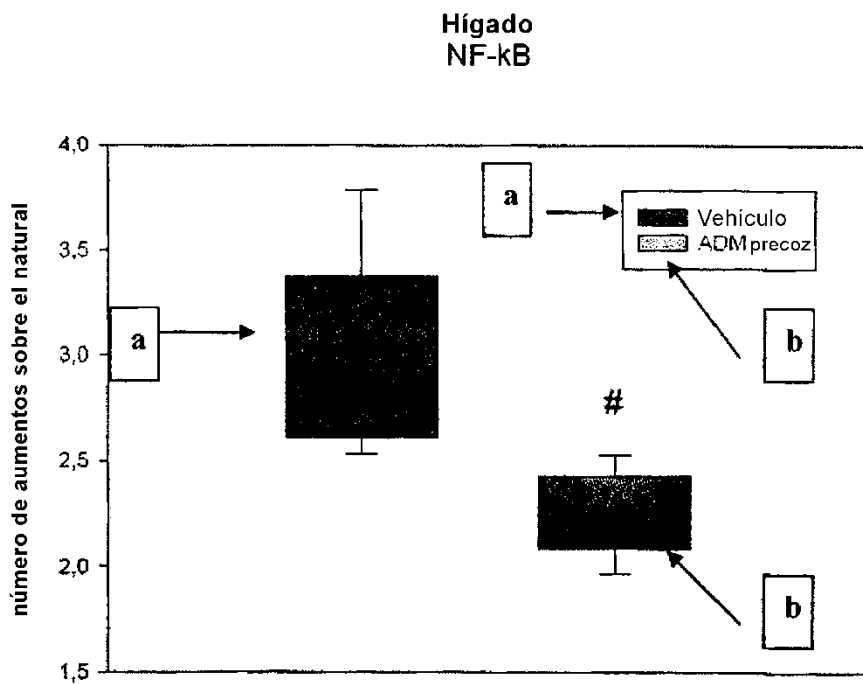


Fig. 11:

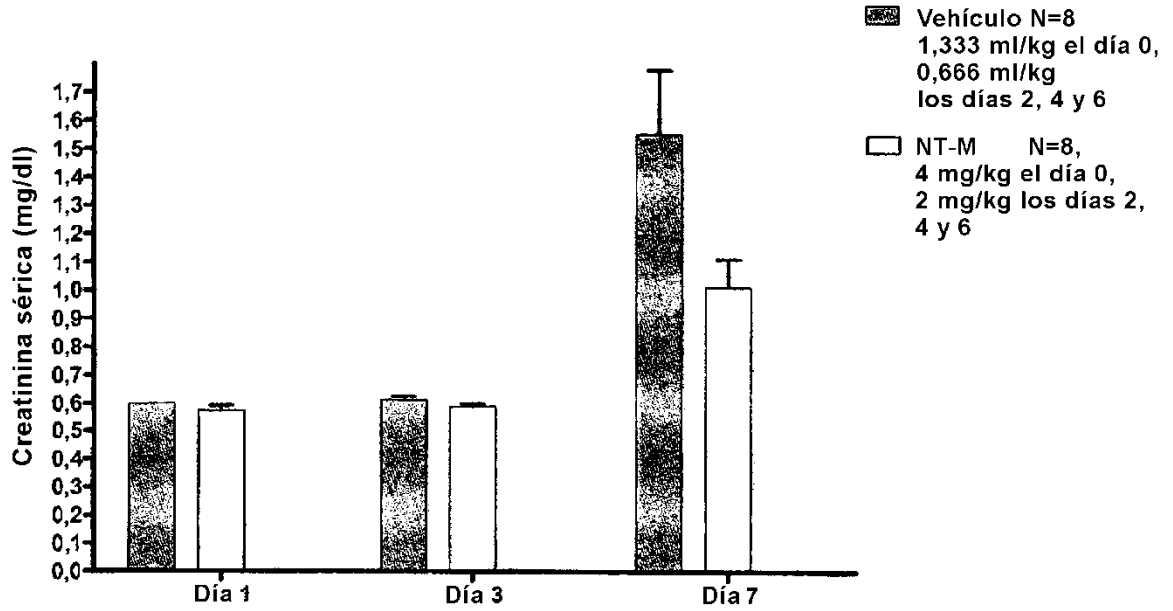


Fig. 12:

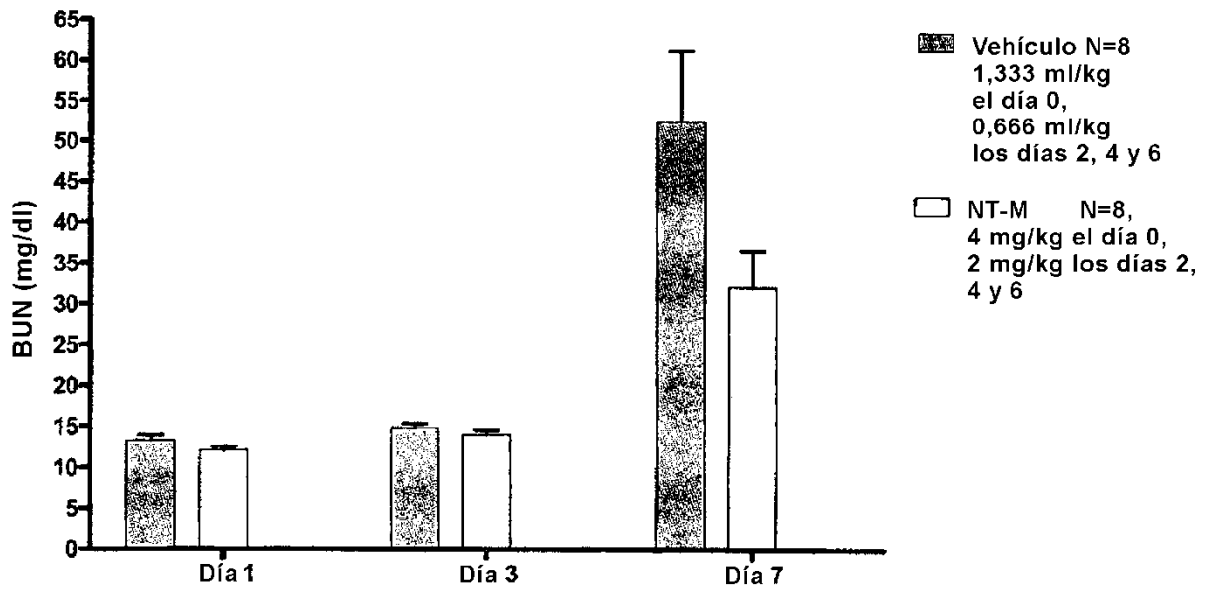


Fig. 13:

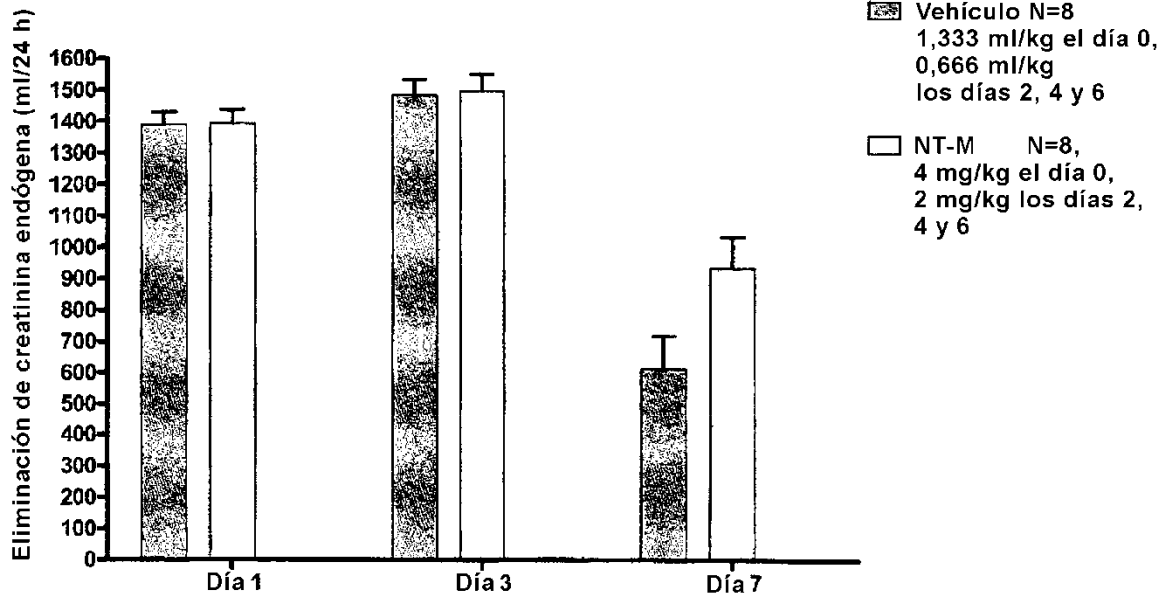


Fig. 14:

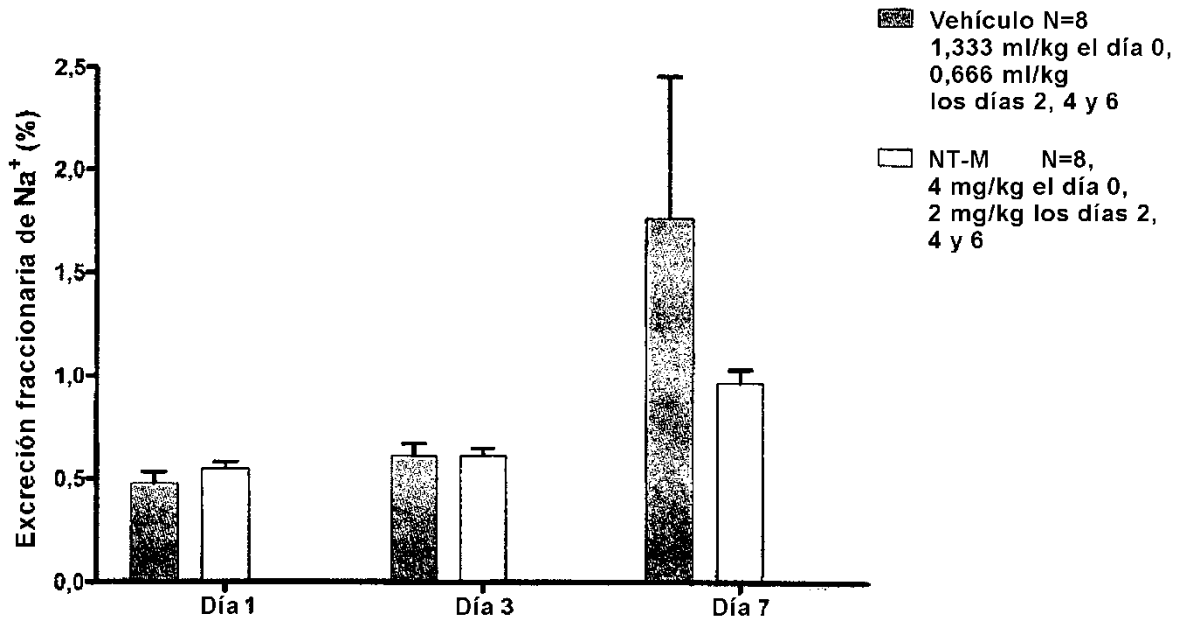


Fig. 15:

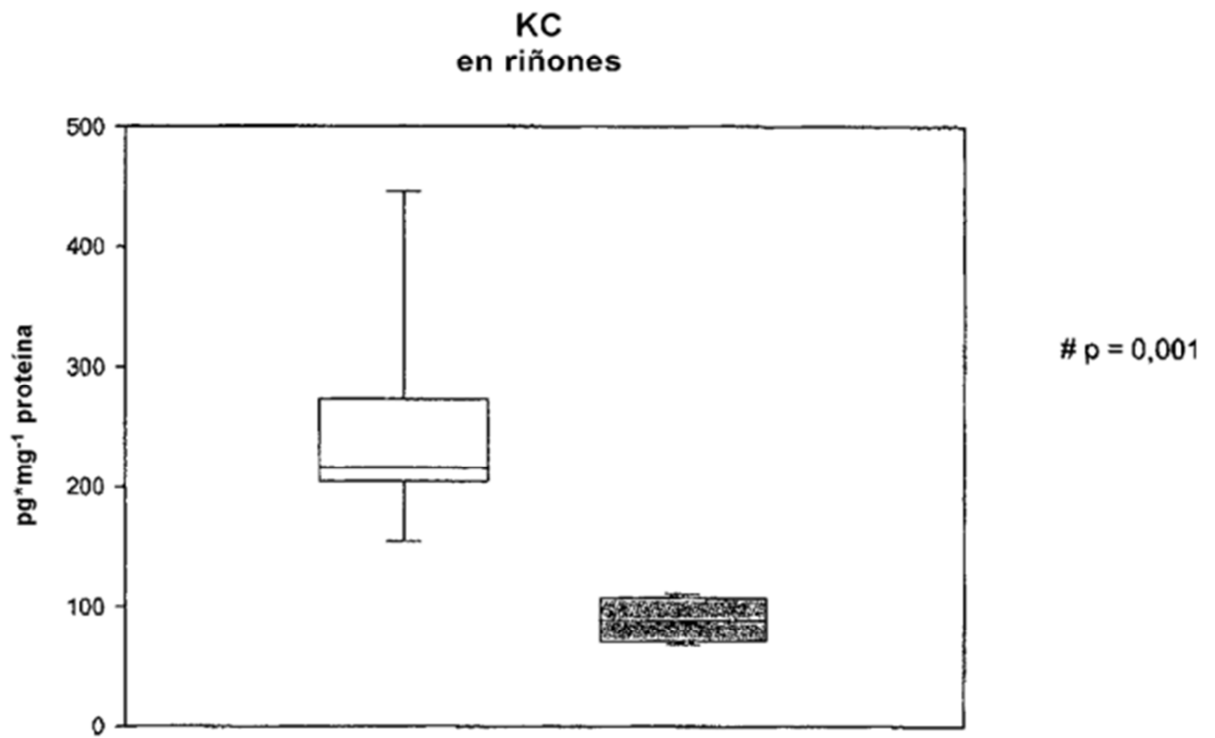


Fig. 16:

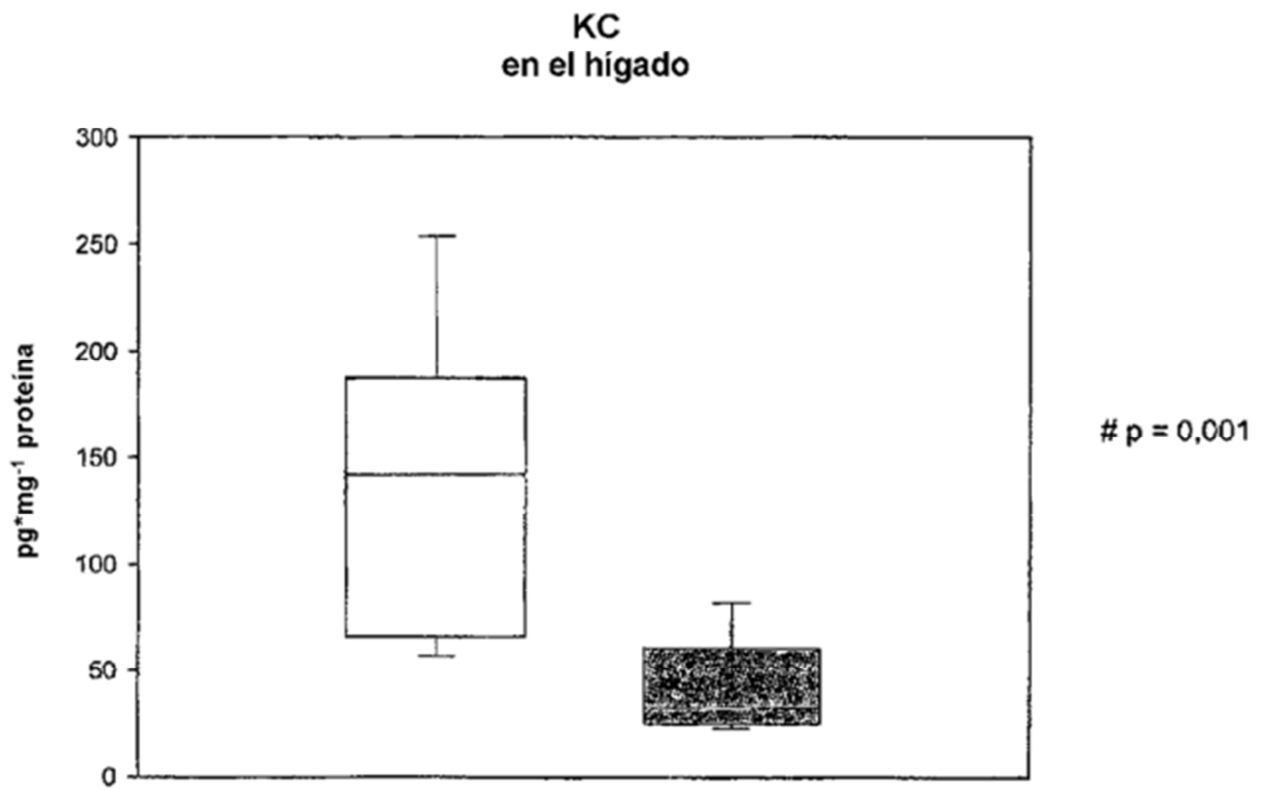


Fig. 17:

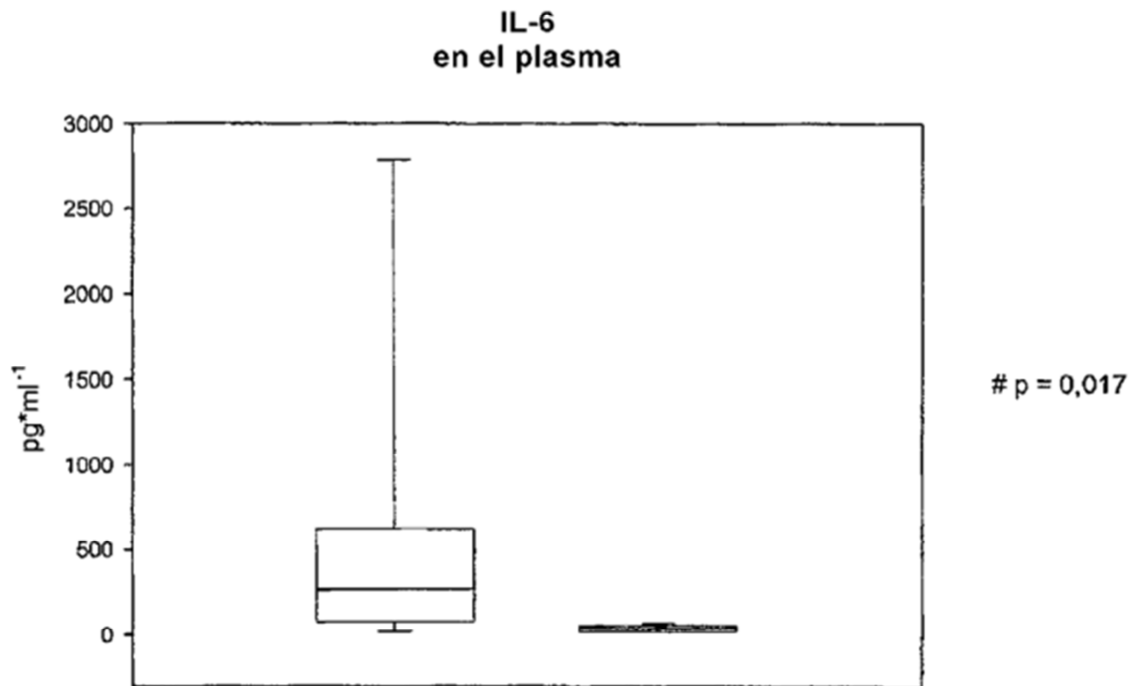


Fig. 18:

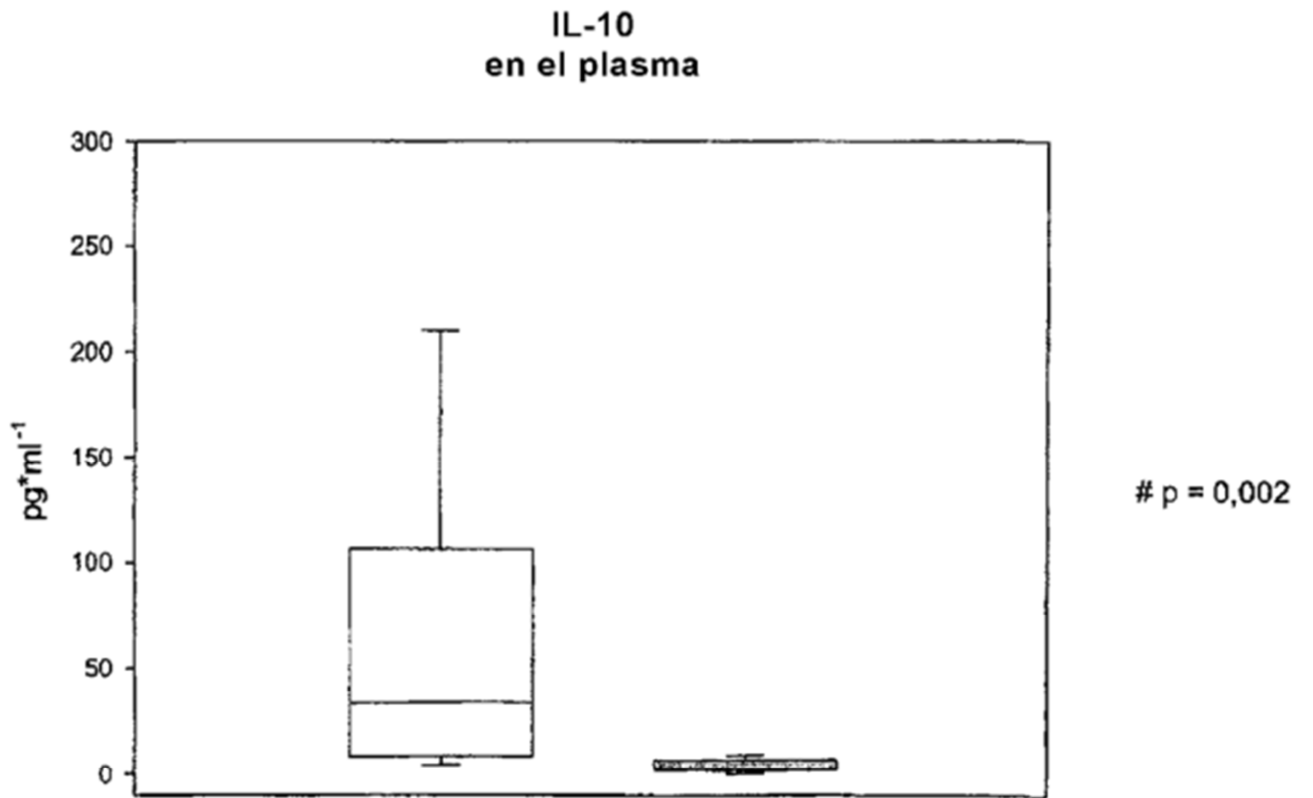


Fig. 19:

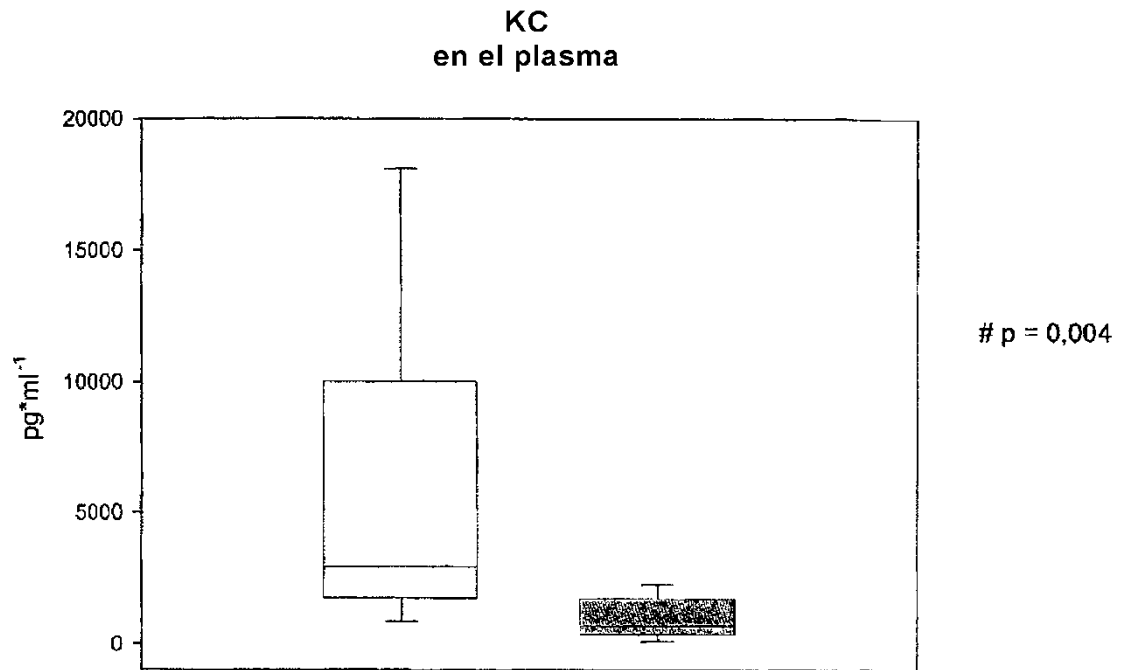


Fig. 20:

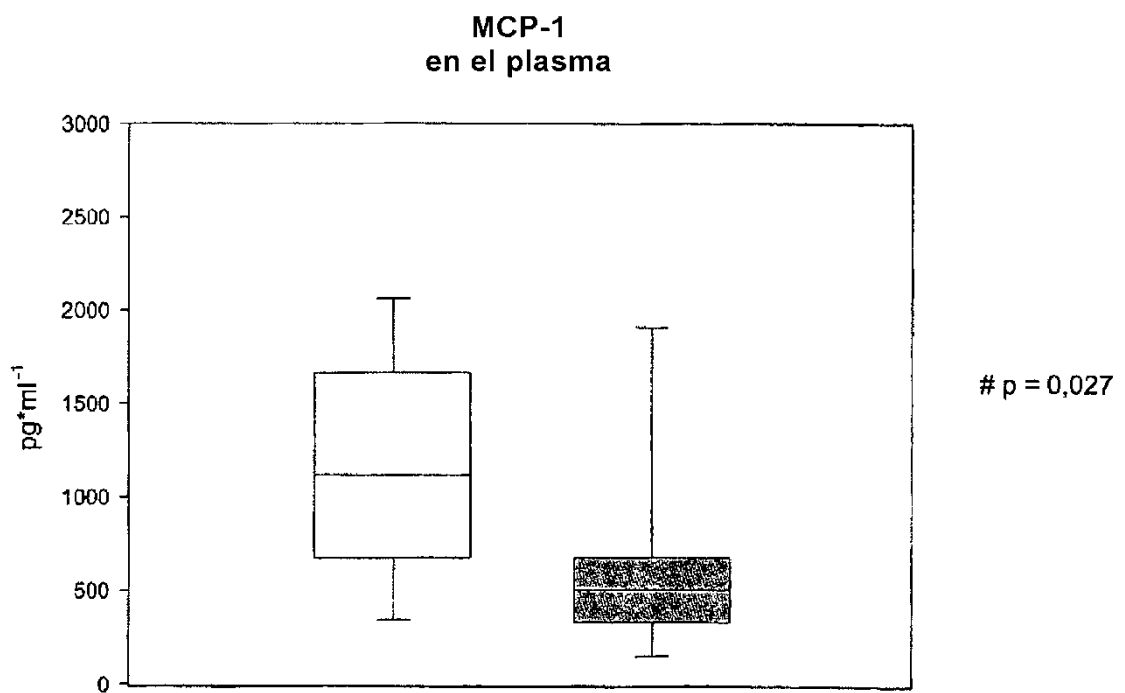
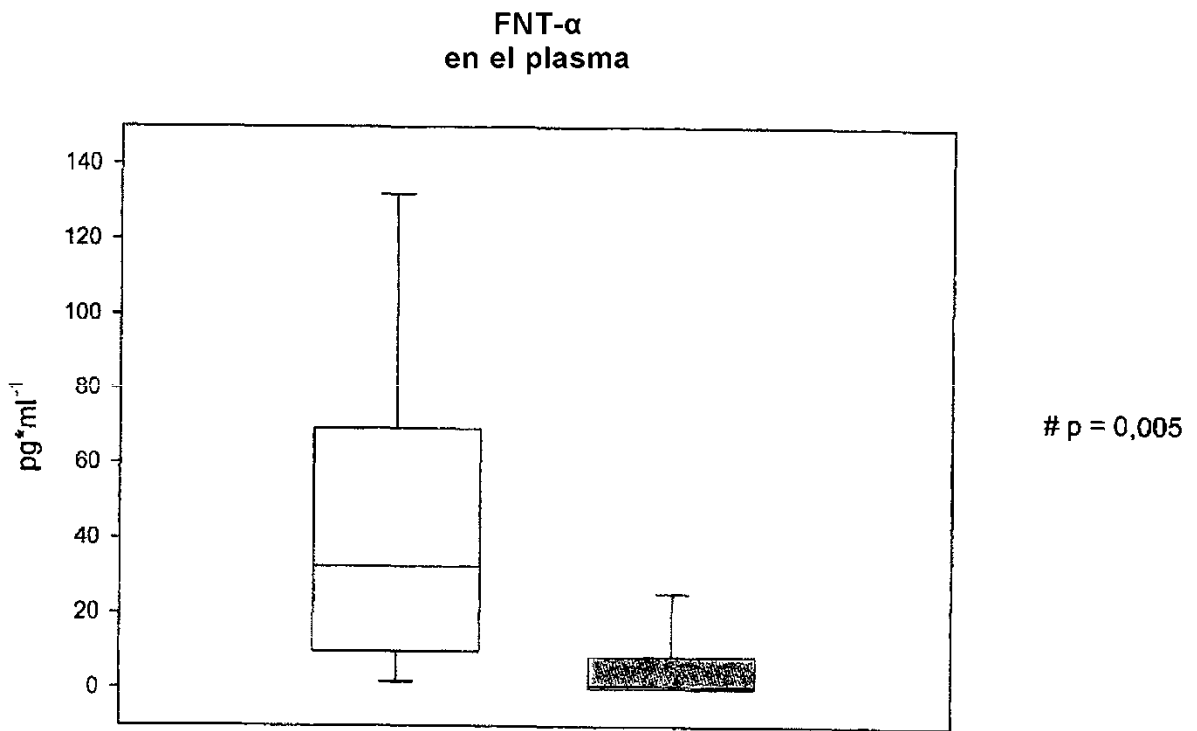


Fig. 21:



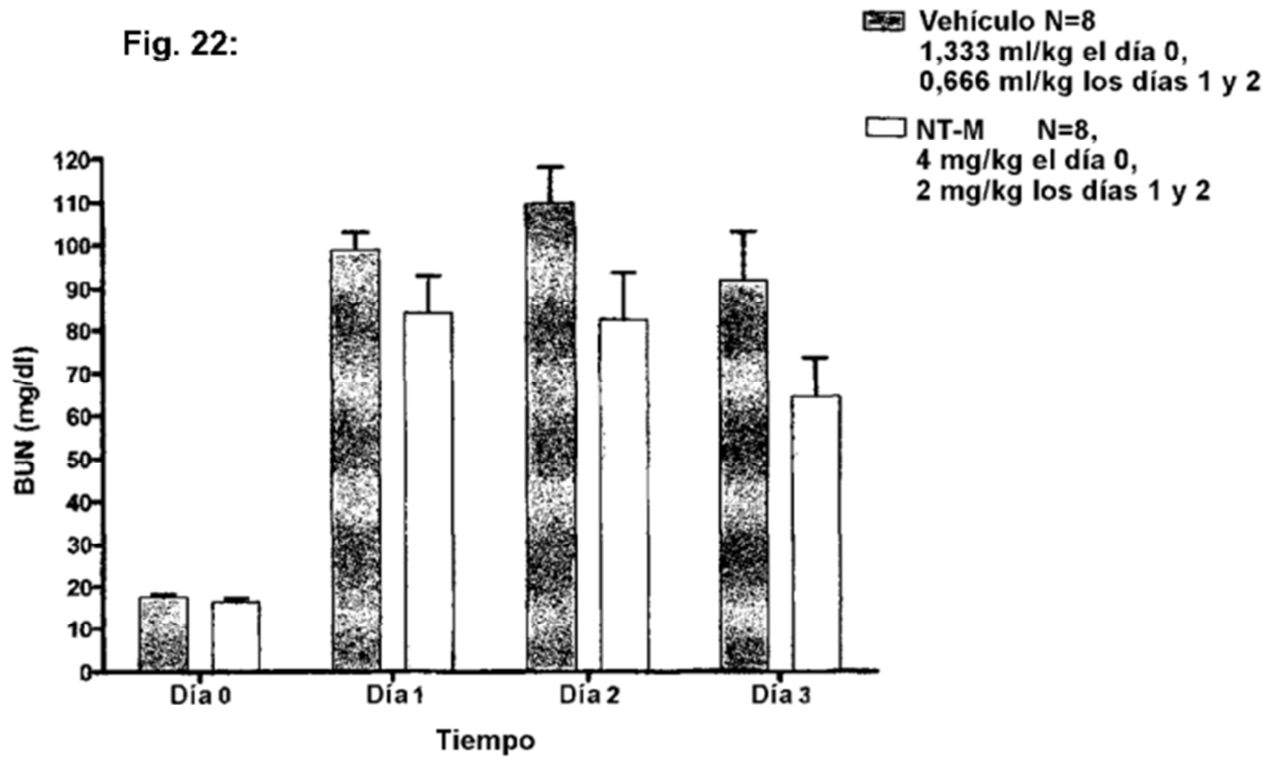


Fig. 23:

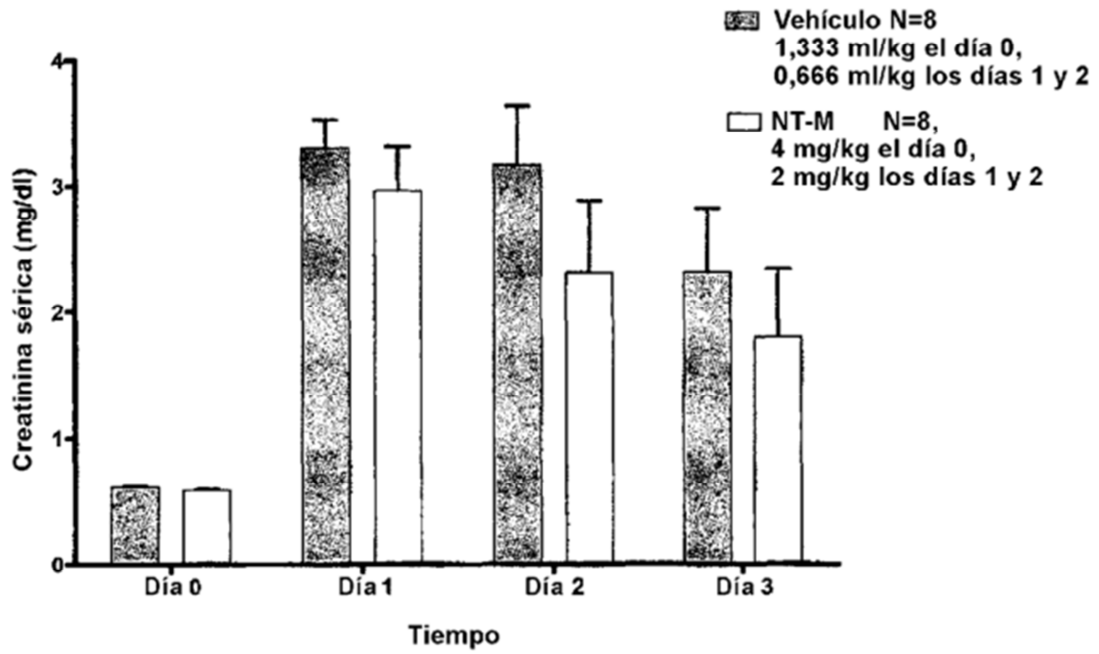


Fig. 24:

