

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 492**

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

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2012 PCT/EP2012/072932**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13072513**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2012 E 12784632 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 2780370**

54 Título: **Anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o fragmento de anticuerpo anti-ADM o armazón no Ig anti-ADM para uso en la terapia de una enfermedad aguda o una afección aguda de un paciente para estabilizar la circulación**

30 Prioridad:

16.11.2011 EP 11189449

16.03.2012 EP 12160016

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

31.03.2020

73 Titular/es:

ADRENOMED AG (100.0%)

Neuendorfstrasse 15a

16761 Hennigsdorf , DE

72 Inventor/es:

BERGMANN, ANDREAS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 751 492 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 armazón no Ig anti-ADM para uso en la terapia de una enfermedad aguda o una afección aguda de un paciente para estabilizar la circulación

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM para uso en la terapia de una enfermedad o afección aguda de un paciente para estabilizar la circulación.

Antecedentes

10 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 a 560, 1993) como un nuevo péptido hipotensor que comprende 52 aminoácidos, que se aisló a partir de una feocromocitoma humana, SEQ ID NO: 21. En el mismo año, también se describió el ADNc codificante de un péptido precursor que comprendía 185 aminoácidos y la secuencia de aminoácidos completa de este péptido precursor. El péptido precursor, que comprende, entre otras, una secuencia de señal de 21 aminoácidos en el extremo N-terminal, se denomina "proadrenomedulina" (pre-proADM). En la presente descripción, todas las posiciones de aminoácidos especificadas habitualmente se refieren a la pre-proADM que comprende los 185 aminoácidos. El péptido adrenomedulina (ADM) es un péptido que comprende 52 aminoácidos (SEQ ID N° 21) y que comprende los aminoácidos 95 a 146 de pre-proADM, a partir de los cuales se forma mediante clivaje proteolítico. Hasta el momento, sólo se han caracterizado con más exactitud sustancialmente sólo unos pocos fragmentos de los fragmentos peptídicos formados en el clivaje de pre- proADM, en particular los péptidos fisiológicamente activos adrenomedulina (ADM) y "PAMP", un péptido que comprende 20 aminoácidos (22-41) que sigue a los 21 aminoácidos del péptido de señal en pre-proADM. La identificación y caracterización de ADM en 1993 promovió una intensa actividad de investigación, cuyos resultados se han resumido en diversos artículos, y en el contexto de la presente descripción se hace particular referencia a los artículos en una edición de "Peptides" dedicado a la ADM, en particular (Editorial, Takahashi, K., "Adrenomedullin: from a pheochromocytoma to the eyes", *Peptides*, vol. 22, página 1691, (2001) y (Eto, T., "A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides", *Peptides*, vol. 22, págs. 1693 a 1711, (2001)). Otro informe se encuentra en (Hinson, et al., "Adrenomedullin, a Multifunctional Regulatory Peptide", *Endocrine Reviews*, Vol. 21(2), pp. 138-167 (2000)). En las investigaciones científicas hasta el momento, se ha encontrado, entre otros, que la ADM puede considerarse un péptido regulador polifuncional. Se libera dentro de la circulación en una forma inactiva expandida por 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), páginas 551 a 555, (1998). Sólo Resumen). También existe 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), páginas 12292 a 12300 (2001)) que es específica de la ADM y que probablemente de manera similar modula el efecto de la ADM. Dichos efectos fisiológicos de la ADM, así como de PAMP, que son de importancia primordial en las investigaciones actuales, son los efectos que tienen influencia sobre la presión sanguínea.

40 Por lo tanto, la ADM es un vasodilatador eficaz y, de esta manera, resulta posible asociar el efecto hipotensor a segmentos peptídicos particulares de la parte C-terminal de la ADM. Se ha encontrado además que dicho péptido fisiológicamente activo adicional PAMP, formado a partir de pre-proADM de manera similar muestra un efecto hipotensor, aunque aparentemente presenta un mecanismo de acción diferente del de la ADM (ver, además de los artículos antes indicados, (Eto, T., "A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides", *Peptides*, vol. 22, páginas 1693 a 1711, (2001)) y (Hinson, et al., "Adrenomedullin, a Multifunctional Regulatory Peptide", *Endocrine Reviews*, vol. 21(2), páginas 138 a 167, (2000)), y también (Kuwasako, K., et al., "Purification and characterization of PAMP-12 (PAMP-20) in porcine adrenal medulla as a major endogenous biologically active peptide", *FEBS Lett*, Vol. 414(1), páginas 105 a 110, (1997), solo el Resumen) (Kuwasaki, K., et al., "Increased plasma proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in patients with essential hypertension", *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 36 (Pt. 5), páginas 622 a 628, 1999, sólo el resumen) o (Tsuruda, T., et al., "Secretion of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide from cultured neonatal rat cardiac cells", *Life Sci.*, vol. 69(2), páginas 239 a 245, (2001); solo el resumen) y el documento EP0622458). Se ha encontrado además que las concentraciones de ADM que pueden medirse en la circulación y en otros líquidos biológicos, en una cantidad de estados patológicos, se encuentran significativamente por encima de las concentraciones que se observan en las personas de control sanas. De esta manera, el nivel de ADM en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, enfermedades renales, trastornos hipertensivos, diabetes mellitus, en la etapa aguda de shock y en la sepsis y el shock séptico, se encuentra significativamente incrementado, aunque en diferentes medidas. Las concentraciones de PAMP también se encuentran incrementadas en algunos de dichos estados patológicos, aunque los niveles en plasma se encuentren reducidos respecto a ADM ((Eto, T., "A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides", *Peptides*, vol. 22, páginas 1693 a 1711, (2001)); página

1702). Se sabe además que las concentraciones inusualmente elevadas de ADM se observan en la sepsis, y las concentraciones más altas, en el shock séptico (véase (Eto, T., "A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides", *Peptides*, vol. 22, páginas 1693 a 1711, (2001)) y (Hirata, et al., "Increased Circulating Adrenomedullin, a Novel Vasodilatory Peptide, in Sepsis", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 81(4), páginas 1449 a 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, página 156 a 162, (1997)), (Tomoda, Y., et al., "Regulation of adrenomedullin secretion from cultured cells", *Peptides*, vol. 22, páginas 1783 a 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, páginas 132 a 136, (1999)) y (Wang, P., "Adrenomedullin and cardiovascular responses in sepsis", *Peptides*, vol. 22, páginas 1835 a 1840, (2001)).

En la técnica se conoce además un método para identificar la inmunorreactividad de la adrenomedulina en líquidos biológicos con fines diagnósticos y, en particular dentro del alcance del diagnóstico de sepsis, del diagnóstico cardiaco y del diagnóstico de cáncer. Según la descripción, se mide el péptido parcial de la región media de la proadrenomedulina, que contiene los aminoácidos (45-92) de la proadrenomedulina completa, en particular, con un inmunoensayo que funciona con al menos un anticuerpo marcado que reconoce específicamente una secuencia de la parte media de proADM (WO 2004/090546).

El documento WO 2004/097423 describe el uso de un anticuerpo contra la adrenomedulina para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de trastornos cardiovasculares. El tratamiento de enfermedades mediante el bloqueo del receptor de ADM también se encuentra descrito en la técnica (p. ej., WO 2006/027147 y WO 2007/062676). Dichas enfermedades pueden ser sepsis, shock séptico, enfermedades cardiovasculares, infecciones, enfermedades dermatológicas, enfermedades endocrinológicas, enfermedades metabólicas, enfermedades gastroenterológicas, cáncer, inflamación, enfermedades hematológicas, enfermedades respiratorias, enfermedades musculoesqueléticas, enfermedades neurológicas y enfermedades urológicas.

Se informa para la etapa temprana de la sepsis que la ADM mejora la función cardiaca y el suministro sanguíneo en hígado, bazo, riñón e intestino delgado. Los anticuerpos neutralizantes de ADM neutralizan los efectos anteriormente indicados durante la etapa temprana de la sepsis (Wang, P., "Adrenomedullin and cardiovascular responses in sepsis", *Peptides*, vol. 22, páginas 1835 a 1840, (2001)).

En la etapa tardía de la sepsis, la fase hipodinámica de la sepsis, la ADM constituye un factor de riesgo que está fuertemente asociado a la mortalidad de los pacientes en shock séptico. (Schütz et al., "Circulating Precursor levels of endothelin-1 and adrenomedullin, two endothelium-derived, counteracting substances, in sepsis", *Endothelium*, 14:345-351, (2007)). Los métodos para el diagnóstico y el tratamiento de los pacientes con enfermedad crítica, por ejemplo en las etapas muy tardías de la sepsis, y la utilización de endotelina y agonistas de endotelina con actividad vasoconstrictora para la preparación de medicamentos destinados al tratamiento de pacientes con enfermedad crítica se han descrito en el documento WO 2007/062676. En WO 2007/062676 se describe además el uso, en lugar de endotelina y/o los agonistas de endotelina, o en combinación con la misma, de antagonistas de adrenomedulina, es decir, moléculas que evitan o atenúan la acción vasodilatadora de la adrenomedulina, por ejemplo mediante el bloqueo de sus receptores relevantes, o sustancias que evitan la unión de la adrenomedulina a su receptor (p.ej., ligantes específicos tales como, p.ej., anticuerpos de unión a la adrenomedulina y que bloquean sus sitios de unión al receptor; "neutralización inmunológica"). Se ha descrito que tal uso, o uso combinado, incluyendo un uso separado posterior o anterior, resulta conveniente en determinados casos, p. ej. para mejorar el éxito terapéutico, o para evitar el estrés fisiológico o efectos secundarios no deseados. De esta manera, se informa que los anticuerpos de ADM neutralizantes pueden utilizarse para el tratamiento de sepsis en su etapa tardía.

En la técnica se ha descrito la administración de ADM en combinación con la proteína 1 de unión a ADM para el tratamiento de la sepsis y el shock séptico. Se presume que el tratamiento de animales sépticos con ADM y proteína 1 de unión a ADM previene la transición a la etapa tardía de la sepsis. Debe indicarse que en un organismo vivo la proteína de unión a ADM (factor H del complemento) se encuentra presente en la circulación de dicho organismo a 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 Martinez 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 también puede denominarse proteína 1 de unión a ADM (factor H del complemento).

Los pacientes que tienen una enfermedad o afección aguda o crónica pueden necesitar estabilizar la circulación o su función hemodinámica (Cavazonni y Dellinger, *Critical Care* 2006, 10 (Supl. 3): S2 (doi: 10.1186/cc4829).

Wang et al. (Wang et al., *Arch Surg*. 1998 Dec; 133 (12): 1298-304) describen la función de la adrenomedulina para producir respuestas hiperdinámicas en la circulación durante la etapa temprana de sepsis.

Descripción de la invención

El objeto de la presente invención es un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina que se une a ADM o un armazón no Ig anti-ADM que se une a ADM para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente para estabilizar la circulación, en particular la circulación sistémica de dicho paciente como se define con más detalle en la descripción y reivindicaciones siguientes. En particular, el objeto de la presente invención es un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina que se une a adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM que se une a ADM para uso en el tratamiento de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente para estabilizar la circulación sistémica de dicho paciente, en donde dicho el paciente necesita estabilizar la circulación como se define con más detalle en la descripción y reivindicaciones siguientes.

En particular, el objeto de la presente invención es un anticuerpo anti-Adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina

a) para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente para estabilizar la circulación sistémica de dicho paciente, en donde dicho paciente necesita estabilizar la circulación sistémica y exhibe una frecuencia cardíaca de > 100 latidos/min y/o < 65 mmHg de presión arterial media y en donde estabilizar la circulación sistémica significa aumentar la presión arterial media por encima de 65 mmHg o

b) para uso en la prevención de un aumento de la frecuencia cardíaca a > 100 latidos/min y/o una disminución de la presión arterial media a < 65 mmHg en pacientes que tienen una enfermedad aguda o afección aguda,

y en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo o armazón sin Ig se une a la región de al menos 4 aminoácidos dentro de la secuencia de aa 1-21 de ADM madura humana:

YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC (SEQ ID NO: 23).

La circulación sistémica se refiere a la parte del sistema circulatorio en el que la sangre sale del corazón, sirve a las células del cuerpo y luego vuelve a entrar al corazón. La sangre sale por el ventrículo izquierdo a la aorta, la arteria más grande del cuerpo. La aorta conduce a arterias más pequeñas, las arteriolas, y finalmente los capilares. Los desechos y el dióxido de carbono se difunden desde la célula hacia la sangre, y el oxígeno en la sangre se difunde en la célula. La sangre luego se dirige a los capilares venosos, y después a las venas cavas: la vena cava inferior y la vena cava superior, a través de las cuales la sangre vuelve a entrar al corazón en la aurícula derecha.

En toda la memoria descriptiva, estabilizar la circulación significa estabilizar la circulación sistémica. El término circulación sistémica no abarcaría fenómenos de microcirculación. La microcirculación es el suministro de sangre nueva a los vasos sanguíneos más pequeños, presentes en la vasculatura incrustada dentro de los tejidos de los órganos. Esto se diferencia de la macrocirculación, que transporta sangre hacia y desde los órganos. El estado de la circulación sistémica puede medirse por parámetros como la presión arterial media, la presión arterial (véase otros parámetros arriba). Un paciente que necesita estabilizar la circulación puede ser, por lo tanto, un paciente que exhibe una frecuencia cardíaca de > 100 latidos/min y < 65 mmHg de presión arterial media. Si la circulación se estabiliza mediante la administración de un anticuerpo anti-Adrenomedulina (ADM) o por un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina, esto se puede medir y caracterizar por un aumento de la presión arterial media por encima de 65 mmHg y/o una disminución de la frecuencia cardíaca por debajo de 100 latidos/min.

Se debería enfatizar que por medio de la presente invención se pretende aplicar el anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM para estabilizar la circulación sistémica, y por lo tanto estos no están necesariamente destinados a cualquier método de tratamiento primario o tratamiento de primera línea para la enfermedad aguda o afección aguda en sí misma, que debe considerarse como enfermedad subyacente. Esto significa que la presente invención no proporciona una terapia para curar, p.ej., cáncer, diabetes, meningitis, politraumatismos y similares. En consecuencia, la terapia para una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente dentro del alcance de la invención está relacionada con cualquier tipo de insuficiencia circulatoria sistémica, o circulación sistémica insuficiente de la sangre como un episodio agudo.

La enfermedad aguda o las afecciones agudas se pueden seleccionar del grupo, sin limitarse al grupo, que comprende infecciones graves como p. ej. meningitis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), o sepsis; otras enfermedades como diabetes, cáncer, enfermedades vasculares agudas y crónicas, como p. ej. insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, aterosclerosis; shock como p. ej. shock séptico, y disfunción orgánica, como p. ej. disfunción renal, disfunción hepática, quemaduras, cirugía, trauma, envenenamiento, daños inducidos por quimioterapia. El anticuerpo o fragmento o armazón según la presente invención es especialmente útil para reducir el riesgo de mortalidad durante sepsis y shock séptico, es decir, etapas tardías de la sepsis.

A continuación se definirán los criterios clínicos para SIRS, sepsis, sepsis severa, shock séptico.

1) Respuesta inflamatoria sistémica del huésped (SIRS) caracterizada por al menos dos de los siguientes síntomas

- los pacientes presentan hipotensión (la presión arterial media es < 65 mmHg)
- nivel elevado de lactato sérico > 4 mmol/L
- glucosa en sangre > 7, 7 mmol /L (en ausencia de diabetes)
- la presión venosa central no está dentro del intervalo de 8-12 mmHg
- 5 - la producción de orina es < 0,5 mL x kg⁻¹ x h⁻¹
- la saturación de oxígeno en la vena central (vena cava superior) es < 70% o en vena mixta < 65%
- la frecuencia cardíaca es > 90 latidos/min
- temperatura < 36°C o > 38°C
- frecuencia respiratoria > 20/min
- 10 - recuento de glóbulos blancos < 4 o > 12x10⁹/L (leucocitos); > 10% de neutrófilos inmaduros

2) Sepsis

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

- tos/esputo/dolor en el pecho
- 15 - dolor abdominal/distensión diarrea
- infección asociada a uso de catéter
- endocarditis
- disuria
- dolor de cabeza con rigidez en el cuello
- 20 - celulitis/herida/infección articular
- microbiología positiva para cualquier infección

3) Sepsis severa

Siempre que en el paciente se manifieste sepsis y, además, una sospecha clínica de disfunción de cualquier órgano, tal como:

- 25 - presión arterial sistólica < 90/media; < 65mmHG
- lactato > 2 mmol /L
- Bilirrubina > 34 µmol/L
- producción de orina < 0,5 ml/kg/h durante 2 h
- creatinina > 177 µmol/L
- 30 - plaquetas < 100x10⁹/L
- SpO₂ > 90% a menos que se suministre O₂

4) Shock séptico

- Se manifiesta al menos un signo de disfunción del órgano terminal como se menciona en 3). Se indica shock séptico, si hay hipotensión refractaria que no responde al tratamiento y la administración de líquidos por vía intravenosa por sí sola es insuficiente para mantener la presión arterial del paciente y que no se vuelva hipotenso, y se indica la administración de un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM o un armazón sin Ig anti-ADM según la presente invención.
- 35

- En una realización de la presente invención, el paciente no padece SIRS, una infección grave, sepsis, shock como p. ej. shock séptico. Dicha infección grave denota p.ej. meningitis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis severa y shock como p.ej. shock séptico. En este sentido, una sepsis severa se caracteriza por que la
- 40

sepsis se manifiesta en dicho paciente, y adicionalmente hay una sospecha clínica de disfunción orgánica, tal como:

- presión arterial sistólica < 90 / media; < 65mmHG

- lactato > 2 mmol/L

- Bilirrubina > 34µmol/L

5 - producción de orina < 0,5 ml/kg/h durante 2 h

- creatinina > 177 µmol/L

- plaquetas < 100x10⁹/L

- SpO₂ > 90% a menos que se suministre O₂

10 En otra realización, dicha enfermedad aguda o afección aguda no es sepsis o no es sepsis grave, o no es SIRS, o no es shock, o no es shock séptico.

En otra realización, dicha enfermedad aguda o afección aguda no es sepsis.

15 En otra realización, dicha enfermedad aguda o afección aguda se selecciona del grupo que comprende meningitis, diabetes, cáncer, enfermedades vasculares agudas y crónicas, como p. ej. insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, aterosclerosis; shock como p.ej. shock séptico y disfunción orgánica, como p. ej. disfunción renal, disfunción hepática, quemaduras, cirugía, traumatismos, envenenamiento, daños inducidos por quimioterapia.

20 En todas las enfermedades y afecciones agudas mencionadas anteriormente puede existir la necesidad de estabilizar la circulación de un paciente mediante la administración de un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM. Un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM también se pueden administrar de forma preventiva en pacientes que tienen una enfermedad o afección aguda para evitar que la frecuencia cardíaca aumente a > 100 latidos/min y/o que la presión arterial media disminuya a < 65 mmHg.

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 anti-ADM, en el que dicho fragmento se une específicamente a ADM, y en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo o armazón no Ig se une a una región de al menos 4 aminoácidos dentro de la SEQ ID NO: 23. Un armazón no Ig anti-ADM es un armazón no Ig que se une específicamente a ADM como se definió anteriormente. La unión específica a ADM también permite la unión a otros antígenos. Esto significa que esta especificidad no excluye que el anticuerpo pueda reaccionar en forma cruzada con otros polipéptidos además de aquellos contra los que se ha producido.

30 En una realización, el anticuerpo anti-ADM o el fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o el armazón no Ig anti-ADM según la presente invención reduce el requerimiento de los agentes vasopresores, p.ej., el requerimiento de catecolaminas, de dicho paciente. El requerimiento de agentes vasopresores, p.ej. el requerimiento de catecolamina de un paciente es un indicador de la condición de la circulación de dicho paciente. Por lo tanto, el anticuerpo anti-ADM o el fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o el armazón no Ig anti-ADM puede administrarse en un punto de tiempo cuando el paciente necesita un agente vasopresor, p. ej. catecolamina.

35 En una realización de la invención, dicho paciente es un paciente que necesita aumentar la presión en sangre.

40 Un paciente que necesita estabilizar la circulación puede ser un paciente con gasto cardíaco bajo y/o presión arterial baja (hipotensión). Este puede ser un paciente con una frecuencia cardíaca de > 100 latidos/min. Puede tratarse de un paciente con presiones arteriales medias de < 65 mmHg o incluso con <60 mmHg. La presión arterial media se define como PAM = (COxSVR) + CVP donde CO es gasto cardíaco, SVR es resistencia vascular sistémica, y CVP es presión venosa central y generalmente suficientemente leve como para ser descuidada en esta fórmula. Un paciente que necesita estabilizar la circulación puede ser también un paciente que tiene además de los síntomas anteriores una frecuencia respiratoria > 20 / min.

45 En una realización específica de la invención, un paciente que necesita estabilizar la circulación puede ser un paciente con gasto cardíaco bajo y/o presión arterial baja (hipotensión). Este puede ser un paciente con una frecuencia cardíaca de > 90 latidos/min. Puede tratarse de un paciente con presiones arteriales medias de < 65 mmHg o incluso con <60 mmHg.

50 Algunos pacientes con hipofusión inducida por sepsis pueden permanecer hipotensos a pesar del reemplazo adecuado de líquidos. En estos casos, se necesitan agentes vasopresores para aumentar la PAM. Así, en una realización de la invención, el paciente que tiene una enfermedad o afección aguda o crónica es un paciente que necesita agentes vasopresores para aumentar la PAM. Las catecolaminas como la dopamina, epinefrina (adrenalina), noradrenalina (noradrenalina) y fenilefrina tradicionalmente se han utilizado para aumentar la presión arterial en

pacientes con, p. ej., shock séptico. Recientemente también se ha sugerido que la vasopresina es un vasopresor potencial en pacientes con una enfermedad crónica o aguda o una afección aguda que necesitan estabilizar la circulación.

5 Los agentes vasopresores como la catecolamina pueden estabilizar la circulación de un paciente que tiene una enfermedad aguda o crónica o afección aguda. En caso de que la condición del paciente (presión arterial baja) sea muy crítica, la administración de agentes vasopresores, p.ej. la administración de catecolaminas, por sí sola no puede evitar la desestabilización de la circulación. La administración adicional de anticuerpo anti-ADM o fragmento de anticuerpo anti-ADM o armazón no Ig anti-ADM junto con la administración de p.ej. catecolamina puede ayudar a estabilizar la circulación de un paciente cuya condición es tan crítica que la administración de catecolaminas sin la
10 administración de anticuerpo anti-ADM o fragmento de anticuerpo anti-ADM o armazón no Ig anti-ADM no sería suficiente para estabilizar la circulación de dicho paciente.

Además, los vasopresores pueden tener efectos secundarios graves. La dopamina estimula los receptores D1 en la circulación regional renal, produce vasodilatación y aumenta el flujo sanguíneo. Esta es una de las dos razones por las cuales los médicos han utilizado dosis bajas de dopamina para proteger la función renal. También con respecto a
15 otros vasopresores, se ha sugerido que aumentar la presión sanguínea con ciertos medicamentos, a pesar de aparecer como algo beneficioso, puede asociarse con peores resultados.

Por lo tanto, el objeto de la invención es un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según las reivindicaciones, para reemplazar la administración de un vasopresor total o parcialmente. Esto
20 significa que el paciente según la presente invención puede ser un paciente que necesite un tratamiento con vasopresores o un paciente que recibe un tratamiento con vasopresores.

El anticuerpo anti-ADM o el fragmento de anticuerpo anti-ADM o el armazón no Ig anti-ADM también se puede administrar de forma preventiva antes de que el paciente muestre signos de problemas circulatorios graves. Este podría ser el caso si el paciente tiene una enfermedad crónica o aguda o una afección aguda donde se pueden esperar
25 problemas de circulación, que comprenden infecciones graves como p. ej. meningitis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) o sepsis; otras enfermedades como diabetes, cáncer, enfermedades vasculares agudas y crónicas como p. ej. insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, aterosclerosis; shock, como p. ej. shock séptico y disfunción orgánica como p. ej. disfunción renal, disfunción hepática, quemaduras, cirugía, traumatismos, intoxicaciones, daños inducidos por quimioterapia. Especialmente útil es el anticuerpo o fragmento o
30 armazón según la presente invención para reducir el riesgo de mortalidad durante sepsis y shock séptico, es decir, en las etapas tardías de la sepsis. El experto en la materia es consciente de que dicha reducción del riesgo de mortalidad se asocia con la estabilización de la circulación según la invención. La enfermedad aguda o afección aguda puede ser una enfermedad o afección en la que el paciente se caracteriza por necesitar estabilizar la circulación. La necesidad de estabilizar la circulación se caracteriza como se describe anteriormente, es decir, puede tratarse de un paciente preferiblemente con una frecuencia cardíaca de > 90 latidos/min o incluso con una frecuencia cardíaca de > 100 latidos/min. Este puede ser un paciente con presiones arteriales medias de < 65 mmHg o incluso con < 60 mmHg. La presión arterial media se define como $PAM (COxSVR) + CVP$ donde CO es gasto cardíaco; SVR es resistencia vascular sistémica y CVP es la presión venosa central y, por lo general, lo suficientemente leve como para ser descuidada en esta fórmula. Un paciente que necesita estabilizar la circulación también puede ser un paciente que
40 tiene una frecuencia respiratoria de > 20 /min.

El efecto estabilizante de la circulación del anticuerpo anti-ADM o el fragmento de anticuerpo anti-ADM o el armazón no Ig anti-ADM respalda de este modo la terapia primaria de dicha enfermedad crónica o aguda o afección aguda. Esto significa en una realización que el anticuerpo anti-ADM o el fragmento de anticuerpo anti-ADM o el armazón sin Ig anti-ADM se administra además de un tratamiento de primera línea (terapia primaria). En caso de una enfermedad
45 crónica o aguda o afección aguda, tal como una infección grave, SIRS, sepsis o similar, la terapia primaria sería p.ej. la administración de antibióticos. El anticuerpo anti-ADM o el fragmento de anticuerpo anti-ADM o el armazón no Ig anti-ADM estabilizaría la circulación y ayudaría a evitar que empeore la condición crítica de dicho paciente hasta que la administración de p. ej. antibióticos produzca efecto. Como se mencionó anteriormente, el anticuerpo anti-ADM o el fragmento anti-ADM o el armazón no Ig anti-ADM puede administrarse de manera preventiva o de manera
50 terapéutica, esto significa para prevenir problemas de circulación o para estabilizar la circulación cuando hay problemas de circulación en dicho paciente.

Debe destacarse que los problemas de circulación comprendidos por la presente invención pueden ser problemas de circulación agudos según una realización específica de la invención.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-ADM o un armazón sin Ig anti-ADM según las reivindicaciones, se utiliza en combinación con vasopresores p.ej. catecolamina, en donde dicha combinación es para uso en terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente para estabilizar la circulación de dicho paciente.

Una realización de la invención, donde dicho paciente tiene una enfermedad o afección crónica o aguda y necesita estabilizar la circulación, se caracteriza por la necesidad de dicho paciente de recibir la administración de

vasopresores, p. ej. la administración de catecolaminas.

El objeto de la invención en una realización específica es, por lo tanto, un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina que se une a ADM o un armazón no Ig anti-ADM que se une a ADM para uso en la terapia, según las reivindicaciones, de un paciente que necesita la administración de vasopresores, p. ej. la administración de catecolaminas.

Además, en una realización de la invención, un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM, según las reivindicaciones, deben usarse en combinación con fluidos administrados por vía intravenosa, en donde dicha combinación es para uso en la terapia de un paciente que tiene una enfermedad crónica o aguda o afección aguda para estabilizar la circulación de dicho paciente. Una realización de la invención, en donde dicho paciente tiene una enfermedad o condición crónica o aguda y necesita estabilizar la circulación se caracteriza por la necesidad de dicho paciente de recibir fluidos intravenosos.

Según la invención, la necesidad de un paciente de recibir fluidos intravenosos también es una necesidad aguda debido a una enfermedad aguda o afección aguda. Esto, sin embargo, no excluye una enfermedad crónica o aguda subyacente que tenga el paciente y que pueda asociarse con la necesidad aguda de líquidos, así como la necesidad aguda de estabilizar la circulación.

El objeto de la invención en una realización específica es, por lo tanto, un anticuerpo anti-Adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM para uso en terapia según las reivindicaciones en un paciente que necesita líquidos intravenosos.

Además, en una realización de la invención, el anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM es monoespecífico. Anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) monoespecífico o fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina monoespecífico o armazón no Ig anti-ADM monoespecífico significa que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo o armazón no Ig se une a una región específica que abarca al menos 5 aminoácidos dentro de aa 1-21 de ADM madura humana. Anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) monoespecífico o fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina monoespecífico o armazón no Ig anti-ADM monoespecífico son anticuerpos anti-adrenomedulina (ADM) o fragmentos de anticuerpos anti-adrenomedulina o armazones no Ig anti-ADM que tienen afinidad por el mismo antígeno.

En una realización específica y preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) monoespecífico o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina monoespecífico o un armazón no Ig anti-ADM monoespecífico, caracterizado por que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo o armazón sin Ig se une a una región específica que abarca al menos 4 aminoácidos dentro de aa 1-21 de ADM madura humana.

En otra realización especial, el anticuerpo anti-ADM o el fragmento de anticuerpo que se une a ADM es un anticuerpo monoespecífico. Monoespecífico significa que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a una región específica que abarca preferiblemente al menos 4, o al menos 5 aminoácidos dentro de aa 1-21 de ADM madura humana. Los anticuerpos o fragmentos monoespecíficos son anticuerpos o fragmentos que tienen afinidad por el mismo antígeno. Los anticuerpos monoclonales son monoespecíficos, pero los anticuerpos monoespecíficos también pueden producirse por otros medios que no sea a partir de una célula germinal común.

Un anticuerpo según la presente invención es una proteína que incluye uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina que se unen específicamente a un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de 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 livianas de inmunoglobulina de longitud completa son generalmente de aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos de longitud. Las cadenas pesadas de inmunoglobulina de longitud completa generalmente tienen aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos de longitud. Las cadenas livianas están codificadas por un gen de región variable en NH₂-terminal (aproximadamente 110 aminoácidos de longitud) y un gen de región constante kappa o lambda en COOH-terminal. Las cadenas pesadas están codificadas de manera similar por un gen de región variable (aproximadamente 116 aminoácidos de longitud) y uno de los otros genes de región constante.

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 liviana y una cadena pesada. En cada par, las regiones variables de cadena liviana 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 (p. ej., 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, 2ª ed., 1984; Hunkapiller y Hood, Nature 323:15-16,1986). Una región variable de inmunoglobulina de cadena liviana o pesada incluye una región marco interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, por su versión en inglés) (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.

5 Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de cadena liviana y pesada se han construido, típicamente por ingeniería genética, a partir de genes de región variable y constante de inmunoglobulina pertenecientes a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos, como kappa y gamma 1 o gamma 3. En un ejemplo, un anticuerpo quimérico terapéutico es, por lo tanto, una proteína híbrida compuesta por el dominio de unión a antígeno o variable de un anticuerpo de ratón y el dominio constante o efector de un anticuerpo humano, aunque se pueden usar otras especies de mamíferos, o la región variable puede producirse por técnicas moleculares. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son bien conocidos en la técnica, p.ej., véase la patente de los EE.UU. 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 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, al 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 las secuencias naturales de inmunoglobulina humana. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina con cadena liviana humanizada y una cadena pesada humanizada. Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno que el 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 anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones conservadoras adicionales de aminoácidos que no tienen sustancialmente ningún efecto sobre la unión a 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 (p. ej., véase la patente de EE.UU N° 5.585.089). Un anticuerpo humano es un anticuerpo en el que los genes de las cadenas liviana 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 una célula B humana que segrega el anticuerpo de interés. La inmortalización puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante infección por EBV o por fusión de una célula B humana con una célula de mieloma o hibridoma para producir una célula de trioma. Los anticuerpos humanos también pueden producirse por métodos de visualización de fagos (véase, por ejemplo, Dower et al., publicación de PCT N° WO 1991/017271; McCafferty et al., publicación de PCT N° WO 1992/001047; y Winter, publicación de PCT N° WO 1992/020791), 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 (p. ej., véase Lonberg et al., publicación de PCT N° WO 1993/012227; y Kucherlapati, publicación de PCT N° WO 1991/010741).

40 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 realización preferida, los anticuerpos según la presente invención son anticuerpos producidos de forma recombinante como por ejemplo, IgG, una inmunoglobulina completa típica o fragmentos de anticuerpos que contienen al menos el dominio F variable de la cadena pesada y/o liviana como p. ej. anticuerpos acoplados químicamente (fragmento de unión a antígeno) que incluyen pero no se limitan a fragmentos Fab, incluyendo minicuerpos Fab, anticuerpo Fab de cadena simple, anticuerpo Fab monovalente con etiquetas de epítipo, p. ej. Fab-V5Sx2; Fab bivalente (mini-anticuerpo) dimerizado con el dominio CH3; Fab bivalente o Fab multivalente, por ejemplo, formados por polimerización con la ayuda de un dominio heterólogo, p. ej. por dimerización de dominios dHLX, p. ej. Fab-dHLX-FSx2; fragmentos F(ab')₂, fragmentos scFv multivalentes multimerizados y/o multiespecíficos, diacuerpos bivalentes y/o biespecíficos, BITE® (acoplador biespecífico de células T), anticuerpos trifuncionales, anticuerpos multivalentes, p. ej. de una clase diferente de G; anticuerpos de dominio único, por ejemplo, derivados de inmunoglobulinas de camélidos o peces y muchos otros.

Además de los anticuerpos anti-ADM, otros armazones de biopolímero se conocen en la técnica para acomplejar una molécula diana y se han utilizado para generar biopolímeros diana muy específicos. Son ejemplos los aptámeros, espieglómeros, las anticalinas y las conotoxinas. Para ilustración de los formatos de anticuerpos véanse las figuras 1a, 1b y 1c.

En una realización preferida, el formato de anticuerpo anti-ADM se selecciona del 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 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.

Los armazones no Ig pueden ser armazones de proteínas y pueden usarse como imitadores de anticuerpos, ya que son capaces de unirse a ligandos o antígenos. Los armazones no Ig pueden seleccionarse del grupo que comprende armazones no Ig basados en tetranectina (p. ej., descritos en el documento US 2010/0028995), armazones de fibronectina (p. ej., descritos en el documento EP 1266025; armazones basados en lipocalina (p. ej., descritos en el documento WO 2011/154420); armazones de ubiquitina (p. ej., descritos en el documento WO 2011/073214); armazones de transferencia (p. ej., descritos en el documento US 2004/0023334), armazones de proteína A (p. ej., descritos en el documento EP 2231860), armazones basados en repetición de anquirina (p. ej., descritos en el documento WO 2010/060748), armazones de microproteínas preferiblemente microproteínas que forman un nudo de cistina (p. ej., descritos en el documento EP 2314308), armazones basados en el dominio Fyn SH3 (p. ej., descritos en el documento WO 2011/023685); armazones basados en el dominio EGFR-A (p. ej., descritos en el documento WO 2005/040229) y armazones basados en el dominio Kunitz (p. ej., descritos en el documento EP 1941867).

Los anticuerpos según la presente invención se pueden producir de la siguiente manera:

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

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

Los sobrenadantes del cultivo celular se seleccionaron de forma primaria para anticuerpos IgG específicos de antígeno tres semanas después de la fusión. Los microcultivos de prueba positiva se transfirieron a placas de 24 pocillos para propagación. Después de volver someter a ensayo, los cultivos seleccionados se clonaron y se volvieron a clonar utilizando la técnica de dilución limitante y se determinaron los isotipos (véase también Lane, RD (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). La glutamato descarboxilasa (GAD) no es detectable en la superficie de las células de los islotes de rata examinados por citofluorometría y citotoxicidad mediada por anticuerpos y dependiente del complemento, de los anticuerpos GAD monoclonales (Horm. Metab. Res. 28: 11-15).

Pueden producirse anticuerpos mediante la visualización de fagos según el siguiente procedimiento:

Se utilizaron las bibliotecas HAL7/8 de genes de anticuerpos humanos sin tratamiento previo para el aislamiento de dominios F variables (scFv) de cadena simple recombinantes contra el péptido adrenomedulina. Las bibliotecas de genes de anticuerpos se seleccionaron con una estrategia de reconocimiento y selección (*panning*) que comprende el uso de péptidos que contienen una etiqueta de biotina unida mediante dos separadores diferentes a la secuencia de péptidos adrenomedulina. Se utilizó una mezcla de rondas de reconocimiento y selección usando antígeno unido de forma no específica y antígeno unido a estreptavidina para minimizar el fondo de los ligantes no específicos. Los fagos eluidos de la tercera ronda de reconocimiento y selección se han utilizado para la generación de cepas de *E. coli* monoclonales que expresan scFv. El sobrenadante del cultivo de estas cepas clonales se ha utilizado directamente para una prueba ELISA de antígenos (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 los anticuerpos murinos puede realizarse según con el siguiente procedimiento:

Para la humanización de un anticuerpo de origen murino, se analiza la secuencia de anticuerpos para determinar la interacción estructural de las regiones marco (FR) con las regiones determinantes complementarias (CDR) y el antígeno. En base al modelado estructural, se selecciona un FR apropiado de origen humano y las secuencias de CDR murinas se trasplantan al FR humano. Se pueden introducir variaciones en la secuencia de aminoácidos de CDR o FR para recuperar las interacciones estructurales, que fueron abolidas por el cambio de especies para las secuencias FR. Esta recuperación de las interacciones estructurales puede lograrse mediante un enfoque aleatorio utilizando bibliotecas de visualización de fagos o mediante un enfoque dirigido guiado por modelado molecular (Almagro JC, Fransson J., 2008. Humanization of antibodies. Front Biosci. 2008 Jan 1; 13:1619-33).

En una realización preferida, el formato de anticuerpo ADM se selecciona del grupo que comprende fragmento Fv, fragmento scFv, fragmento Fab, fragmento scFab, fragmento F(ab)₂ y proteína de fusión scFv-Fc. En otra realización preferida, el formato de anticuerpo se selecciona del grupo que comprende fragmento scFab, fragmento Fab, fragmento scFv y los conjugados optimizados para biodisponibilidad de los mismos, tal como los fragmentos

PEGuilados. Uno de los formatos más preferidos es el formato scFab.

En otra realización preferida, el anticuerpo anti-ADM, el fragmento de anticuerpo anti-ADM o el armazón no Ig anti-ADM es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un armazón no Ig de longitud completa.

5 En una realización preferida, el anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM se dirige y puede unirse a un epítipo de al menos 5 aminoácidos de longitud contenido en ADM dentro de la secuencia de SEQ ID NO: 23.

En otra realización preferida, el anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM está dirigido y puede unirse a un epítipo de al menos 4 aminoácidos de longitud contenido en ADM dentro de la secuencia de SEQ ID NO: 23.

10 En una 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 armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para uso en el tratamiento de una enfermedad aguda o afección aguda en un paciente en el que dicho anticuerpo o fragmento o armazón no se une a la proteína ADM-1 (factor H del complemento).

15 En una realización específica de la invención, se proporciona el anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o el fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a la adrenomedulina o el armazón no Ig anti-ADM que se une a la adrenomedulina para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según las reivindicaciones, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo o armazón no Ig se une a una región de preferiblemente al menos 4, o al menos 5 aminoácidos dentro de la secuencia de SEQ ID NO: 23.

20 En una realización específica de la invención, se proporciona el anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o el fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a la adrenomedulina o el armazón no Ig anti-ADM que se une a la adrenomedulina para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según las reivindicaciones, en donde dicho anticuerpo o fragmento o armazón se une a una región de preferiblemente al menos 4, o al menos 5 aminoácidos dentro de la secuencia de aa 1-21 de ADM madura humana:

SEQ ID NO: 23

25 YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC

En una realización preferida de la presente invención, dicho anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o armazón no Ig anti-ADM se une a una región de ADM que se encuentra en la parte N-terminal (aa 1-21) de adrenomedulina, (véase la Fig. 2).

30 En otra realización preferida, dicho anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM reconoce y se une al extremo N-terminal (aa1) de adrenomedulina. El extremo N-terminal significa que el aminoácido 1, que es "Y" de SEQ ID NO 21 o 23, es obligatorio para la unión de anticuerpos. Dicho anticuerpo o fragmento o armazón no Ig no se uniría a la adrenomedulina extendida en N-terminal ni modificada en N-terminal ni a la adrenomedulina degradada en N-terminal.

35 En una realización preferida, el anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-adrenomedulina está dirigido y puede unirse a un epítipo de al menos 5 aminoácidos de longitud contenidos en aa 1-21 de ADM madura humana.

En una realización preferida, el anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-adrenomedulina está dirigido y puede unirse a un epítipo de al menos 4 aminoácidos de longitud contenidos en aa 1-21 de ADM madura humana.

40 En otra realización específica según la invención, el anticuerpo anti-ADM o el fragmento de anticuerpo anti-ADM o el armazón no Ig anti-ADM proporcionado aquí no se une a la porción C-terminal de ADM, es decir, la aa 43-52 de ADM

PRSKISPQGY-NH2

(SEQ ID NO: 25).

45 En una realización específica, se prefiere usar un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM según la presente invención, en donde dicho anticuerpo anti-adrenomedulina o dicho fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o armazón no Ig anti-ADM es un anticuerpo estabilizante de ADM o un fragmento de anticuerpo estabilizante de adrenomedulina o un armazón no Ig estabilizante de adrenomedulina que mejora la vida media ($t_{1/2}$; tiempo de retención medio) de adrenomedulina en suero, sangre, plasma, al menos 10%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente > 50%, lo más preferiblemente > 100%.

Puede determinarse la vida media (tiempo medio de retención) de ADM en plasma humano en ausencia y presencia de un anticuerpo estabilizante de ADM o un fragmento de anticuerpo estabilizante de adrenomedulina o un armazón no Ig estabilizante de adrenomedulina, respectivamente, utilizando un inmunoensayo para la cuantificación de ADM.

Se pueden llevar a cabo las siguientes etapas:

- 5 - Puede diluirse ADM en plasma de citrato humano en ausencia y presencia de un anticuerpo estabilizante de ADM o un fragmento de anticuerpo estabilizante de adrenomedulina o un armazón no Ig estabilizante de adrenomedulina, respectivamente, y puede incubarse a 24°C
- Se toman alícuotas en puntos de tiempo seleccionados (p. ej. dentro de las 24 horas) y puede detenerse la degradación de ADM en dichas alícuotas congelando a - 20°C
- 10 - La cantidad de ADM puede determinarse mediante un inmunoensayo de ADMh directamente, si el ensayo seleccionado no está influenciado por el anticuerpo estabilizante. Alternativamente, la alícuota puede tratarse con agentes desnaturalizantes (como HCl) y, después de limpiar la muestra (p. ej. por centrifugación) el pH puede ser neutralizado y la ADM cuantificada por un inmunoensayo de ADM. Alternativamente, se pueden utilizar las tecnologías no inmunoensayo (por ejemplo, RP-HPLC) para la cuantificación de ADM.
- 15 - La vida media de ADM se calcula para ADM incubada en ausencia y presencia de un anticuerpo estabilizante de ADM o un fragmento de anticuerpo estabilizante de adrenomedulina o un armazón no Ig estabilizante de adrenomedulina, respectivamente,

- La mejora 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 o un fragmento de anticuerpo estabilizante de adrenomedulina o un armazón no Ig estabilizante de adrenomedulina no IG.
- 20

Un aumento al doble de la vida media de ADM es una mejora 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 disminuir a la mitad de la concentración de referencia en el fluido o sangre especificado.

- 25 En el Ejemplo 3 se describe un ensayo que puede usarse para determinar la vida media (tiempo de retención medio) de la adrenomedulina en suero, sangre, plasma.

- Para otras enfermedades, el bloqueo de ADM puede ser beneficioso hasta cierta medida. Sin embargo, podría ser también perjudicial si la ADM está totalmente neutralizada ya que puede requerirse una cierta cantidad de ADM para varias funciones fisiológicas. En muchos informes se ha enfatizado que la administración de ADM puede ser beneficiosa en ciertas enfermedades. A diferencia de esto, en otros informes se informó que la ADM era potencialmente mortal administrada en ciertas condiciones.
- 30

- En una realización específica, dicho anticuerpo anti-ADM, fragmento de anticuerpo anti-ADM o armazón no Ig anti-ADM es un anticuerpo, fragmento o armazón no Ig no neutralizante. Un anticuerpo anti-ADM, fragmento de anticuerpo anti-ADM o armazón no Ig anti-ADM neutralizante bloquearía la bioactividad de ADM a casi 100%, hasta al menos más del 90%, preferiblemente hasta al menos más del 95%.
- 35

- Por el contrario, un anticuerpo anti-ADM, o un fragmento de anticuerpo anti-ADM o un armazón no IG anti-ADM no neutralizantes bloquean la bioactividad de ADM a menos del 100%, preferiblemente menos del 95%, preferiblemente a menos del 90%, más preferiblemente a menos del 80% e incluso más preferiblemente a menos del 50%. Esto significa que la bioactividad residual de ADM unida al anticuerpo anti-ADM, o fragmento de anticuerpo anti-ADM o armazón no Ig anti-ADM neutralizante sería de más del 0%, preferiblemente de más del 5%, preferiblemente de más del 10%, más preferiblemente de más del 20%, más preferiblemente de más del 50%.
- 40

- En este contexto la(s) molécula(s), ya sea un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo o un armazón no Ig con "actividad anti-ADM no neutralizante", denominado colectivamente aquí por simplicidad como anticuerpo anti-ADM, fragmento de anticuerpo o armazón no Ig "no neutralizante", que p. ej. bloquea la bioactividad de ADM a menos del 80%, se define como
- 45

- una molécula o moléculas que se unen a ADM, que después de la adición a un cultivo de una línea de células eucariotas, que expresa el receptor de ADM recombinante humana funcional compuesto de CRLR (receptor similar al receptor de calcitonina) y RAMP3 (proteína modificadora de la actividad del receptor 3), reduce la cantidad de AMPc producido por la línea celular a través de la acción del péptido ADM sintético humano agregado en paralelo, en donde dicha ADM sintética humana agregada se agrega en una cantidad que en ausencia del anticuerpo no neutralizante a analizar, conduce a la mitad de la estimulación máxima de la síntesis de AMPc, en donde la reducción de AMPc por dicha (s) molécula (s) que se une(n) a ADM tiene lugar hasta cierta medida, lo que no es mayor al 80%, incluso cuando la(s) molécula(s) no neutralizante(s) que se unen a la ADM a analizar se agrega(n) en una cantidad, que es 10 veces
- 50

más que la cantidad necesaria para obtener la reducción máxima de la síntesis de AMPc obtenible con el anticuerpo no neutralizante a analizar.

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

5 En una realización específica según la presente invención, un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo o armazón no Ig bloquea la bioactividad de ADM a menos del 80%, preferiblemente menos del 50% (de los valores de referencia).

Esto es en el sentido de bloquear la ADM circulante de no más del 80% o no más del 50%, respectivamente.

10 Se ha entendido que dicho bloqueo limitado de la bioactividad de ADM ocurre incluso a exceso de concentración del anticuerpo, fragmento de anticuerpo o armazón no Ig, lo que significa un exceso del anticuerpo, fragmento de anticuerpo o armazón no Ig en relación con ADM. Dicho bloqueo limitado es una propiedad intrínseca del propio ligante de ADM. Esto significa que dicho anticuerpo, fragmento de anticuerpo o armazón no Ig tiene una inhibición máxima del 80% o 50%, respectivamente. En consecuencia, esto significa que 20% o 50% de la bioactividad residual de ADM permanece presente, aunque se administren las cantidades apropiadas o cantidades en exceso de anticuerpo, fragmento de anticuerpo o armazón no Ig, respectivamente.

15 En una realización preferida, dicho anticuerpo anti-ADM, fragmento de anticuerpo anti-ADM o armazón no Ig anti-ADM bloquearía la bioactividad de ADM al menos 5%. En consecuencia, esto significa que el 95% de la bioactividad residual de la ADM circulante permanece presente. Este es el umbral más bajo de bioactividad restante después de la administración de dicho anticuerpo anti-ADM, fragmento de anticuerpo anti-ADM o armazón no Ig anti-ADM. La bioactividad se define como el efecto que una sustancia adquiere de un organismo vivo o tejido u órgano o unidad funcional *in vivo* o *in vitro* (p. ej., en un ensayo) después de su interacción. En el caso de bioactividad de ADM, este puede ser el efecto de ADM en un ensayo funcional de AMPc receptor de adrenomedulina recombinante humana. Así, según la presente invención, la bioactividad se define a través de un ensayo funcional de AMPc receptor de adrenomedulina. Se pueden llevar a cabo las siguientes etapas para detectar la bioactividad de ADM en dicho ensayo:

25 -Las curvas de respuesta a la dosis se realizan con ADM en dicho ensayo funcional de AMPc receptor de adrenomedulina recombinante humana.

- Se puede calcular la concentración de la estimulación de AMPc media-máxima

- A concentraciones de ADM medias-máximas constantes que estimulan a AMPc se realizan las curvas de respuesta a la dosis (hasta la concentración final de 100 µg/ml) por un anticuerpo estabilizante de ADM o un fragmento de anticuerpo estabilizante de adrenomedulina o un armazón no Ig estabilizante de adrenomedulina, respectivamente.

30 Una inhibición máxima (a la dosis máxima) por dicho anticuerpo estabilizante de ADM del 50% significa que dicho anticuerpo de ADM o dicho fragmento de anticuerpo de adrenomedulina o dicho armazón no Ig anti-adrenomedulina, respectivamente, bloquea la bioactividad al 50% de los valores de referencia. Una inhibición máxima en dicho bioensayo de ADM del 80% significa que dicho anticuerpo anti-ADM o dicho fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o dicho armazón no 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%.

35 La bioactividad de ADM se puede determinar en un análisis funcional de AMPc receptor de adrenomedulina recombinante humana (bioanálisis de adrenomedulina) según el Ejemplo 2.

40 En una realización preferida, un anticuerpo modulador o un fragmento de anticuerpo modulador anti-adrenomedulina o un armazón no Ig modulador anti-adrenomedulina se utiliza en el tratamiento o prevención de una enfermedad aguda o crónica o afección aguda de un paciente para estabilizar la circulación, en particular estabilizar la circulación general. Dicho anticuerpo anti-ADM modulador o fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina modulador o armazón no Ig anti-adrenomedulina modulador, puede ser especialmente útil en el tratamiento de la sepsis. Un anticuerpo anti-ADM modulador o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina modulador o armazón no Ig anti-adrenomedulina modulador mejora la bioactividad de ADM en la etapa temprana de la sepsis y reduce los efectos dañinos de ADM en la etapa tardía de la sepsis.

45 Un anticuerpo anti-ADM "modulador" o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina modulador o un armazón no Ig anti-adrenomedulina modulador es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de adrenomedulina o armazón no Ig que mejora la vida media ($t_{1/2}$, tiempo medio de retención) de la adrenomedulina en suero, sangre, plasma al menos al 10 %, preferiblemente al menos 50 %, más preferiblemente > 50%, lo más preferiblemente > 100 %, y bloquea la bioactividad de ADM a menos del 80%, preferiblemente menos del 50 % y en donde dicho anticuerpo anti-ADM, fragmento de anticuerpo anti-ADM o armazón no Ig anti-ADM bloquearía la bioactividad de ADM al menos al 5%. Estos valores relacionados con la vida media y el bloqueo de la bioactividad deben entenderse en relación a los ensayos antes mencionados para determinar estos valores. Esto es en el sentido de bloquear el ADM circulante a no más del 80% o no más del 50%, respectivamente. Esto significa que el 20% de bioactividad residual de ADM permanece presente, o el 50% de bioactividad residual de ADM permanece presente, respectivamente.

Dicho anticuerpo anti-ADM modulador o fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina modulador o armazón no Ig anti-adrenomedulina modulador ofrece la ventaja de facilitar la dosificación de la administración. La acción combinada 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 beneficiosa simplicidad de dosificación del anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-adrenomedulina. En una situación de exceso de adrenomedulina endógena (estimulación máxima, etapa tardía de sepsis, shock, fase hipodinámica), el efecto de disminución de la actividad es el principal impacto del anticuerpo, fragmento o armazón, que limita el efecto (negativo) de la adrenomedulina. En el 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 armazón no Ig anti-ADM es una combinación de reducción (por bloqueo parcial) y aumento de 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 etapas tempranas de la sepsis (adrenomedulina baja, fase hiperdinámica). Por lo tanto, el anticuerpo anti-adrenomedulina o el fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o el armazón no Ig anti-adrenomedulina no neutralizantes y moduladores actúan como un tampón de bioactividad de ADM para mantener la bioactividad de ADM dentro de un determinado intervalo fisiológico.

Por lo tanto, la dosificación del anticuerpo/fragmento/armazón en p. ej. sepsis puede seleccionarse a partir de una concentración excesiva, debido a que ambas etapas de la sepsis (temprana y tardía) se benefician del tratamiento excesivo con un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM en el caso de un efecto modulador. Medios excesivos: La concentración de un anticuerpo anti-adrenomedulina o de un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o de un armazón no Ig anti-ADM es superior a la adrenomedulina endógena durante la etapa tardía (shock) de p. ej. sepsis. Esto significa que, en el caso de la dosificación de un anticuerpo anti-ADM modulador o un fragmento de anticuerpo anti-ADM modulador o un armazón no Ig anti-ADM modulador, la dosis en la sepsis puede ser la siguiente:

La concentración de adrenomedulina en el shock séptico 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 anti-ADM o fragmento de anticuerpo anti-ADM o armazón no Ig anti-ADM es $42,5 \mu\text{g/l}$ de sangre, (referido a un volumen de 6 l de sangre/80 kg de peso corporal) $3,2 \mu\text{g/kg}$ de peso corporal. El exceso quiere decir al menos el doble (media) de la concentración de adrenomedulina del shock séptico, al menos $> 3 \mu\text{g}$ de anticuerpo anti-adrenomedulina o fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o armazón no Ig anti-ADM/kg de peso corporal, en donde se prefiere al menos $6,4 \mu\text{g}$ de anticuerpo anti-adrenomedulina o fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o armazón no Ig anti-ADM/kg de peso corporal. Se prefiere $> 10 \mu\text{g/kg}$, más preferiblemente $> 20 \mu\text{g/kg}$, aún más preferiblemente $> 100 \mu\text{g}$ de anticuerpo anti-adrenomedulina o fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o armazón no Ig anti-ADM/kg de peso corporal. Esto puede aplicarse a otras enfermedades graves y agudas además del shock séptico.

En una 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 derivado del mismo. En una forma de realización específica una o más CDR (murinas) se injertan en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humano.

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

SEQ ID NO: 1
GYTFSRYW

SEQ ID NO: 2
ILPGSGST

y/o

SEQ ID NO: 3
TEGYEYDGFY

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

SEQ ID NO: 4
QSIYVSNNGNTY

SEQ ID NO: 5
RVS

y/o

SEQ ID NO: 6
FQGSHIPYT.

- 5 En una realización 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 donde la cadena pesada comprende al menos una CDR seleccionada del grupo que comprende:

SEQ ID NO: 1
GYTFSRYW

- 10 SEQ ID NO: 2
ILPGSGST

SEQ ID NO: 3
TEGYEYDGFYD

y en donde la cadena liviana comprende al menos una CDR seleccionada del grupo que comprende:

- 15 SEQ ID NO: 4
QSIVYSNGNTY

SEQ ID NO: 5
RVS

SEQ ID NO: 6
FQGSHIPYT.

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

SEQ ID NO: 1
GYTFSRYW

- 25 SEQ ID NO: 2
ILPGSGST

SEQ ID NO: 3
TEGYEYDGFYD

y en donde la cadena liviana comprende las secuencias

- 30 SEQ ID NO: 4
QSIVYSNGNTY

SEQ ID NO: 5
RVS

SEQ ID NO: 6
FQGSHIPYT.

- 35 En una realización muy específica, el anticuerpo anti-ADM tiene una secuencia seleccionada del grupo que comprende: SEQ ID NO 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

- 40 El anticuerpo anti-ADM o fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o armazón no Ig anti-ADM según la presente invención exhibe una afinidad hacia ADM humana de modo que esa constante de afinidad es mayor que 10^{-7} M, preferiblemente 10^{-8} , siendo la afinidad preferida mayor que 10^{-9} , y más preferiblemente mayor que 10^{-10} . Una persona experta en la técnica sabe que se puede considerar compensar una menor afinidad aplicando una dosis más alta de compuestos y esta medida no llevaría fuera del alcance de la invención. Las constantes de afinidad pueden determinarse según el método descrito en el Ejemplo 1.

- 45 En una realización preferida, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se usa para reducir el riesgo de mortalidad durante dicha enfermedad crónica o aguda de un paciente en el que dicha enfermedad se selecciona del grupo que comprende sepsis, diabetes, cáncer, enfermedades vasculares agudas y crónicas como p. ej. insuficiencia cardíaca, shock, como p. ej. shock séptico y disfunción orgánica, como p. ej. disfunción renal.

En una realización preferida, el anticuerpo anti-ADM o el fragmento de anticuerpo anti-ADM o el armazón no Ig anti-ADM se utiliza para reducir el riesgo de mortalidad durante dicha enfermedad aguda o afección aguda de un paciente.

Debe enfatizarse que el paciente que tiene una enfermedad aguda o afección aguda puede caracterizarse por la necesidad de estabilizar la circulación, es decir, la circulación sistémica, o por la necesidad de estabilizar preventivamente la circulación, es decir, la circulación sistémica.

5 La enfermedad o afección aguda o crónica según la presente invención puede ser una enfermedad o afección seleccionada del grupo que comprende infecciones graves como p. ej. meningitis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis; otras enfermedades como diabetes, cáncer, enfermedades vasculares agudas y crónicas, como p. ej. insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, aterosclerosis; shock como, por ejemplo, shock séptico y disfunción orgánica, como p. ej. disfunción renal, disfunción hepática, quemaduras, cirugía, trauma, envenenamiento, daños por quimioterapia.

10 Especialmente útil es el anticuerpo o fragmento o almacén según la presente invención para reducir el riesgo de mortalidad durante sepsis y shock séptico, es decir, en etapas tardías de sepsis.

15 Sin embargo, debe enfatizarse que los medicamentos proporcionados por la presente invención, siendo anticuerpos anti-ADM, fragmentos de anticuerpos anti-ADM o almacenes no Ig anti-ADM, están solo destinados a utilizarse para estabilizar la circulación sistémica en un paciente que necesita estabilizar la circulación sistémica o que necesita estabilizar preventivamente la circulación sistémica, y por lo tanto no es para ningún método de tratamiento primario para una enfermedad o afección crónica o aguda en sí misma. Esto significa que la presente invención no proporciona una terapia de alivio/curación de, p. ej. , meningitis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) o sepsis, o sepsis severa; otras enfermedades como diabetes, cáncer, enfermedades vasculares agudas y crónicas, como p. ej. insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, aterosclerosis; shock, como p. ej. shock séptico, y disfunción orgánica, como p. ej. disfunción renal, disfunción hepática, quemaduras, cirugía, traumatismos, envenenamiento o daños inducidos por la quimioterapia dentro del alcance de la invención.

20 En una realización, el anticuerpo anti-ADM o el fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o el almacén no Ig anti-ADM se usa en la terapia de enfermedades agudas o afecciones agudas de un paciente según la presente invención, en donde dicho paciente es un paciente de la UCI. En otra realización el anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o almacén no Ig anti-ADM se utiliza en la terapia de la enfermedad aguda de un paciente según la presente invención, en donde dicho paciente está críticamente enfermo. Críticamente enfermo significa que el paciente tiene una enfermedad o afección en el que la muerte es posible o inminente.

25 El objeto de la presente invención es además un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un almacén no Ig anti-ADM para uso en la terapia de la enfermedad aguda de un paciente según la presente invención, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo o almacén no Ig se debe utilizar en combinación con la proteína de unión a ADM. La proteína de unión a ADM está también naturalmente presente en la circulación de dicho paciente.

30 Debe destacarse que el término "proteína de unión a ADM" comprende la proteína 1 de unión a ADM (factor de complemento H). Sin embargo, dicha proteína de unión a ADM por definición según la invención no es un anticuerpo/fragmento de anticuerpo/armazón no Ig anti-ADM no neutralizante ni un anticuerpo/fragmento de anticuerpo/ almacén no Ig anti-ADM modulador.

35 El objeto de la presente invención es además un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o almacén no Ig anti-ADM para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según la presente invención, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo o almacén no Ig puede emplearse en combinación con otros ingredientes activos.

40 El objeto de la invención es también un anticuerpo anti-Adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo de adrenomedulina o un almacén no Ig anti-ADM que puede utilizarse según la invención en combinación con un medicamento primario, en donde dicha combinación es para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente para estabilizar la circulación de dicho paciente.

45 Al respecto, debe destacarse que el anticuerpo/fragmento de anticuerpo/armazón no Ig anti-ADM no debe administrarse como medicamento primario o como tratamiento de primera línea de cualquier enfermedad o afección subyacente, independientemente de ser aguda o crónica, sino que la administración de dicho anticuerpo/fragmento de anticuerpo/armazón no Ig anti-ADM según la invención debe destinarse a pacientes con enfermedad aguda o afección aguda asociada con circulación débil o problemas de circulación, y, por lo tanto, a quienes necesitan estabilizar la circulación.

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

55 En una realización específica de las combinaciones mencionadas anteriormente, dichas combinaciones deben emplearse en combinación con vasopresores, p. ej. catecolamina, en donde dicha combinación adicional es para uso en la terapia de una enfermedad o afección crónica o aguda de un paciente para estabilizar la circulación.

En una realización de la invención, dicho paciente que tiene una enfermedad crónica o aguda o una afección crónica y necesita estabilizar la circulación se caracteriza por la necesidad del paciente para recibir la administración de vasopresores, p. ej. la administración de catecolaminas.

5 El objeto de la invención en una realización específica es, por lo tanto, un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM para uso en combinación con proteína de unión ADM y/o ingredientes activos adicionales para uso en la terapia según las reivindicaciones de un paciente que necesita un tratamiento de vasopresores, p. ej. catecolamina.

10 En una realización específica de las combinaciones anteriores, dichas combinaciones deben utilizarse en combinación con fluidos administrados por vía intravenosa, en donde dicha combinación es para uso en la terapia de una enfermedad o condición crónica o aguda de un paciente para estabilizar la circulación.

En una realización de la invención, dicho paciente que tiene una enfermedad crónica o aguda o una afección aguda y necesita estabilizar la circulación se caracteriza por la necesidad del paciente para recibir fluidos intravenosos.

15 El objeto de la invención en una realización específica es, por lo tanto, un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM en combinación con la proteína de unión a ADM y/o ingredientes activos adicionales para uso en la terapia según las reivindicaciones de un paciente que necesita fluidos intravenosos.

20 Dicho anticuerpo anti-ADM o fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o armazón no Ig anti-ADM o combinaciones de los mismos con proteína de unión a ADM y/o ingredientes activos adicionales, puede utilizarse en combinación con catecolamina y/o con líquidos administrados por vía intravenosa para uso en un método de tratamiento de enfermedades agudas o afecciones agudas de un paciente para estabilizar la circulación.

El objeto de la invención es también un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM según la presente invención para uso en combinación con anticuerpos contra TNF-alfa. Los anticuerpos contra TNF-alfa están disponibles comercialmente para el tratamiento de pacientes.

25 El objeto de la invención es también un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM según la presente invención para uso en combinación con antibióticos.

30 El objeto de la presente invención es además una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo ADM o fragmento de anticuerpo anti-ADM o armazón no Ig anti-ADM según la presente invención. El objeto de la presente invención es además una formulación farmacéutica según la presente invención en donde dicha formulación farmacéutica es una solución, preferiblemente una solución lista para usar. En otra realización, el objeto de la presente invención es además una formulación farmacéutica según la presente invención en donde dicha formulación farmacéutica está en un estado seco para ser reconstituida antes de su uso.

35 Dicha formulación farmacéutica puede administrarse por vía intramuscular. Dicha formulación farmacéutica puede administrarse por vía intravascular. Dicha formulación farmacéutica puede administrarse por infusión. En otra realización, el objeto de la presente invención es además una formulación farmacéutica según la presente invención en donde dicha formulación farmacéutica está en estado liofilizado.

Debe destacarse que la formulación farmacéutica según la invención según puede administrarse por vía intramuscular, intravascular o por infusión, se administra preferiblemente a un paciente para estabilizar la circulación sistémica con la condición de que dicho paciente necesite estabilizar la circulación.

40 Por lo tanto, en otra realización de la presente invención, la formulación farmacéutica según la presente invención se administrará a un paciente para estabilizar la circulación sistémica con la condición de que dicho paciente necesite estabilizar la circulación.

45 En otra realización más preferida, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADN que se une a adrenomedulina para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente, según las reivindicaciones, en donde dicha formulación farmacéutica debe administrarse a un paciente para estabilizar la circulación sistémica con la condición de que dicho paciente necesite estabilizar la circulación sistémica.

Ejemplos

50 Debería enfatizarse que los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y armazones no Ig de la parte de ejemplo según la invención se unen a ADM, y por lo tanto deberían considerarse como anticuerpos/fragmentos de anticuerpos/armazones no Ig anti-ADM

Ejemplo 1

Generación de anticuerpos y determinación de sus constantes de afinidad

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

Péptidos/conjugados para inmunización:

5 Se sintetizaron péptidos para inmunización, véase la Tabla 1, (JPT Technologies, Berlín, Alemania) con un residuo 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 utilizando gel de acoplamiento Sulfolink (Perbio-science, Bonn, Alemania). El procedimiento de acoplamiento se llevó a cabo según el manual de Perbio.

10 Los anticuerpos murinos se generaron según el siguiente método:

Un ratón Balb/c se inmunizó con 100 µg de conjugado de 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, administrado en una inyección intraperitoneal y otra intravenosa. Los esplenocitos del ratón inmunizado y las 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 pasos seguidos de retorno al medio de cultivo celular normal.

20 En los sobrenadantes de cultivo celular se detectaron en primer lugar anticuerpos IgG específicos de 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 shortduration 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:

30 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 puridades 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 visualización de fagos según el siguiente procedimiento:

35 Se utilizaron bibliotecas de genes HAL7/8 de anticuerpos humanos sin tratamiento previo para el aislamiento de dominios variables F de cadena simple recombinantes (scFv) contra el péptido adrenomedulina. Las bibliotecas de genes de anticuerpos se cribaron con una estrategia de reconocimiento y selección (*panning*) que comprende el empleo de péptidos que contienen una etiqueta de biotina unida por dos espaciadores diferentes a la secuencia peptídica de adrenomedulina. Se empleó una mezcla de rondas de reconocimiento y selección utilizando antígeno unido de manera no específica y antígeno unido a estreptavidina para minimizar el fondo de ligantes no específicos. Los fagos eluidos de la tercera ronda de reconocimiento y selección se utilizaron para la generación de cepas de *E. coli* que expresan scFv monoclonal. El sobrenadante de cultivo de estas cepas clonales se utilizó directamente para un ensayo 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).

50 Se seleccionaron clones positivos basándose de la señal positiva de ELISA para antígenos y negativa para placas de microvaloración recubiertas con estreptavidina. Para otras caracterizaciones el marco de lectura abierto de scFv se clonó 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 por una cromatografía de exclusión por tamaño.

Constantes de afinidad

5 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 libre de etiqueta utilizando un sistema Biacore 2000 (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Alemania). Se realizó la inmovilización reversible de los anticuerpos con un anticuerpo Fc anti-ratón acoplado por enlace covalente en alta densidad a una superficie del sensor 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). Se produjeron anticuerpos monoclonales contra las regiones de ADM representadas a continuación de ADM humana y murina, respectivamente. La tabla siguiente representa una selección de anticuerpos obtenidos y utilizados en experimentos adicionales. La selección se basó en la región objetivo:

Tabla 1

Secuencia número	Antígeno/Inmunógeno	Región ADM	Denominación	Constantes de afinidad Kd (M)
SEQ ID: 15	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC	1-21	NT-H	$5,9 \times 10^{-9}$
SEQ ID: 16	CTVQKLAHQIYQ	21-32	MR-H	2×10^{-9}
SEQ ID: 17	CAPRSKISPQGY-NH2	C-42-52	CT-H	$1,1 \times 10^{-9}$
SEQ ID: 18	YRQSMNQGSRSNGCRFGTC	1-19	NT-M	$3,9 \times 10^{-9}$
SEQ ID: 19	CTFQKLAHQIYQ	19-31	MR-M	$4,5 \times 10^{-10}$
SEQ ID: 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

Tabla 2

Objetivo	Fuente	Número de clon	Afinidad (M)	Bioanálisis de máxima 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	$< 1 \times 10^{-8}$	
ADMh	Visualización de fagos	ADM/A7	$< 1 \times 10^{-8}$	
	Visualización de fagos	ADM/B7	$< 1 \times 10^{-8}$	
	Visualización de fagos	ADM/C7	$< 1 \times 10^{-8}$	
	Visualización de fagos	ADM/G3	$< 1 \times 10^{-8}$	
	Visualización de fagos	ADM/B6	$< 1 \times 10^{-8}$	
	Visualización de fagos	ADM/B11	$< 1 \times 10^{-8}$	
	Visualización de fagos	ADM/D8	$< 1 \times 10^{-8}$	
	Visualización de fagos	ADM/D11	$< 1 \times 10^{-8}$	
Visualización de fagos	ADM/G12	$< 1 \times 10^{-8}$		

Generación de fragmentos de anticuerpos por digestión enzimática

La generación de fragmentos Fab y F(ab)₂ se realizó mediante digestión enzimática del anticuerpo murino de longitud completa NT-M. El anticuerpo NT-M se digirió usando a) el kit de preparación F(ab)₂ a base de pepsina (Pierce 44988) y b) el kit de preparación 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 por 8 h a 37°C. La digestión con fragmentación de Fab se realizó durante 16 h, respectivamente.

Procedimiento para la 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 mesa 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 columna con Proteína NAb 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 (contenía azida de sodio al 0,02%) y se equilibró añadiendo 2 ml de PBS, se volvió a centrifugar durante 1 minuto y se desechó con flujo continuo. 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, salvo el flujo continuo con los fragmentos Fab.

(Referencias: Coulter, A. y Harris, R. (1983) *J. Immunol Meth.* 59, 199-203; Lindner I. et al. (2010) α 2-Macroglobulin inhibits the malignant properties of astrocytoma cells by impeding β -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 α β 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 mesa a 37°C. La columna se centrifugó a 5000 x g durante 1 minuto para separar la digestión 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 Proteína Nab 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 mediante flujo continuo. La muestra se aplicó a la columna y se resuspendió por inversión. La incubación se realizó a temperatura ambiente con mezclado en tambor vertical durante 10 minutos. La columna se centrifugó durante 1 minuto, salvo el flujo continuo con los fragmentos Fab.

(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).

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

Extracción total de ARN: El ARN total 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 pesadas y livianas. Para cada muestra de ARN, se configuraron las reacciones de RT-PCR de cada una de las 12 cadenas pesadas y de 11 cadenas livianas utilizando mezclas de
10 cebadores directos degenerados que cubrían las secuencias principales de las regiones variables. Los cebadores inversos se encuentran en las regiones constantes de las cadenas pesadas y livianas. No se diseñaron secuencias de restricción en los cebadores.

Plan de la reacción: 5x 5,0 µl de tampón OneStep RT-PCR de QIAGEN®, 0,8 µl de mezcla 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 molde de ARN, agua sin RNasa hasta 20,0 µl, volumen total 20,0 µl.
15

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

Ciclación: 20 ciclos de 94°C, 25 s; 54°C, 30 s; 72°C, 30 s; 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 configuraron las reacciones de RT-PCR de cada una de las 12 cadenas pesadas y 11 cadenas livianas utilizando conjuntos de cebadores semianidados específicos para las regiones variables de anticuerpos.
20

Configuración de la reacción: 2x 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 extensión final es de 10 min a 68°C.
25

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 livianas de anticuerpos de ratón clonaron y aparecen correctas. La alineación de secuencias de proteínas y el análisis de CDR identifica una cadena pesada y una cadena liviana. 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 liviana 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).
30
35

Anotación para las secuencias de fragmentos de anticuerpos (SEQ ID NO: 7-14): 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.
40

SEQ ID NO: 7 (AM-VH-C)

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSRYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSG
STNYNEKFKGKATITADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEQ ID NO: 8 (AM-VH1)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGRILPGS
GSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEQ ID NO: 9 (AM-VH2-E40)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGRILPGS
GSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEQ ID NO: 10 (AM-VH3-T26-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGEILPGS
GSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEQ ID NO: 11 (AM-VH4-T26-E40-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGS
GSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEQ ID NO: 12 (AM-VL-C)

DVLLSQTPLSLPSVSLGDQATISCRSSOSIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRVS
 RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFOGSHIPYTFGGGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 13 (AM-VL1)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSOSIVYSNGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYRVS
 RDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFOGSHIPYTFGQGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 14 (AM-VL2-E40)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSOSIVYSNGNTYLEWFQQRPGQSPRRLIYRVS
 RDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFOGSHIPYTFGQGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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 AMPc receptor de adrenomedulina recombinante humana (bioanálisis de adrenomedulina).

Ensayos de anticuerpos dirigidos a adrenomedulina humana o de ratón en el análisis funcional de AMPc receptor de adrenomedulina recombinante humana (bioanálisis de adrenomedulina)

Materiales:

Línea celular: CHO-K1

10 Receptor: Adrenomedulina (CRLR + RAMP3)

Depósito número de receptor, línea celular: CRLR: U17473; RAMP3: AJ001016

15 Las células CHO-K1 que expresan el receptor de adrenomedulina recombinante humana (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 resuspendieron 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).

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

Ensayo de antagonistas (96 pocillos):

20 Para el ensayo 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 (2500 células/pocillo). Las placas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Después de la adición del tampón de lisis, se calculó el porcentaje de DeltaF, según las especificaciones del fabricante, con el kit HTRF de Cis-Bio International (Cat. N° 62AM2 PEB). Se utilizó ADMh 22-52 como antagonista de referencia.

Análisis AMPc-HTRF de ensayo de anticuerpos

25 En los anticuerpos anti-ADMh (NT-H, MR-H, CT-H) se determinó la actividad antagonista en el análisis funcional de AMPc receptor de adrenomedulina recombinante humana (FAST-027C) en presencia de 5,63 nM de ADM 1-52

humana, 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.

- 5 En los anticuerpos anti-ADMm (NT-M, MR-M, CT-M) se determinó la actividad antagonista en el análisis funcional de AMPc receptor de adrenomedulina recombinante humana (FAST-027C) en presencia de 0,67 nM de ADM 1-50 de ratón, 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 figuras 3a a 3l). La inhibición máxima por cada anticuerpo se muestra en la tabla 3.

Tabla 3

Anticuerpo	Inhibición máxima de bioactividad de ADM (Bioensayo 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
IgG de ratón no específica	0

10 Ejemplo 3

Datos para la estabilización de ADMh por el anticuerpo anti-ADM

Se probó el efecto estabilizante de ADM humana por los anticuerpos de ADM humana utilizando un inmunoensayo de ADMh.

Inmunoensayo para la determinación cuantitativa de adrenomedulina humana

- 15 La tecnología utilizada fue un inmunoensayo de luminiscencia con tubo revestido tipo sándwich, en base a marcación con éster de acridinio.

- 20 Compuesto marcado (trazador): Se mezclaron 100 µg (100 µl) de CT-H (1mg/ml en PBS, pH 7,4, AdrenoMed AG Alemania) con 10 µl de NHS-éster de acridinio (1mg/ml en acetonitrilo, InVent GmbH, Alemania) (EP 0353971) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Se purificó CT-H marcado por HPLC de filtración en gel en Bio-Sil® SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA.) 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 aproximadamente 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).

- 25 Fase sólida: Se recubrieron tubos de poliestireno (Greiner Bio-One International AG, Austria) (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.

- 30 Calibración: Se calibró el ensayo, utilizando diluciones de ADMh (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)).

Inmunoensayo de ADMh:

- 35 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 (20 mM de PBS, pH 7,4, Triton X-100 al 0,1%).

La quimioluminiscencia unida al tubo se midió utilizando LB 953.

La figura 4 muestra una curva dosis/señal de ADMh estándar. Y una curva de dosis/señal de ADMh en presencia de 100 µg/ml de anticuerpo NT-H. El NT-H no afectó el inmunoensayo de ADMh descrito.

Estabilidad de adrenomedulina humana:

5 Se diluyó ADM humana 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 ADMh se detuvo por congelación a -20°C. La incubación se llevó a cabo en ausencia y presencia de NT-H (100µg/ml). La ADMh restante se analizó cuantitativamente utilizando el inmunoensayo de ADMh descrito anteriormente. La figura 5 muestra la estabilidad de ADMh en el plasma humano (citrato) en ausencia y en presencia del anticuerpo NT-H. La vida media de ADMh solo fue de 7,8 h, y en presencia de NT-H la vida media fue de 18,3 h (2,3 veces mayor estabilidad).

Ejemplo 4

Mortalidad por sepsis (tratamiento temprano)

Modelo animal

10 Para el estudio se utilizaron ratones C57B1/6 macho de 12-15 semanas (Charles River Laboratories, Alemania). Se provocó peritonitis quirúrgicamente bajo anestesia leve 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 sitio de laparotomía. Por 15 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 líquidos.

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

20 Los ratones se trataron inmediatamente después de la CLP (tratamiento temprano). CLP es la abreviatura de ligadura y punción cecal (CLP por su versión en inglés).

Grupos en estudio

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 de BUN (análisis de nitrógeno ureico en suero sanguíneo). Se siguieron diez ratones más por cada grupo durante un período de 4 días.

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

1 Supervivencia con NT-M, 0,2 mg/ml, durante 4 días

2 Supervivencia con MR-M, 0,2 mg/ml durante 4 días

3 Supervivencia con CT-M, 0,2 mg/ml, durante 4 días

4 Supervivencia con IgG de ratón no específica, 0,2 mg/ml, durante 4 días

30 5 Supervivencia de control – PBS, 10µl/g de peso corporal, durante 4 días.

Química clínica

35 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 leve con éter. Se realizaron mediciones utilizando un Multianalyser AU 400 Olympus. La mortalidad a los 4 días se indica en la tabla 4. Las concentraciones medias de BUN se indican en la tabla 5.

Tabla 4

Mortalidad en día 4	Supervivencia (%)
PBS	0
IgG de ratón no específica	0
CT-M	10
MR-M	30
NT-M	70

Tabla 5

Promedio de 5 animales	BUN pre-CLP (mM)	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

5 Puede observarse en la Tabla 4 que el anticuerpo 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 trataron con anticuerpo MR-M, el 30% de los animales sobrevivió y cuando se trataron 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 los trató con IgG de ratón no específica. El mismo resultado se obtuvo en el grupo de referencia donde los ratones recibieron PBS (solución salina tamponada con fosfato).

10 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 sepsis (tratamiento tardío)

Modelo animal

15 Para el estudio se utilizaron ratones C57B1/6 macho de 12-15 semanas (Charles River Laboratories, Alemania). Se provocó peritonitis quirúrgicamente bajo anestesia leve 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 20 500 µl de solución salina como reposición de líquidos.

Aplicación y dosificación del compuesto (NT-M FAB2)

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 sepsis, 6 horas después de CLP (tratamiento tardío). Cada grupo contenía 4 ratones y se los siguió durante un período de 4 días.

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

Grupos en estudio

1 NT-M, 0,2 mg/ml de FAB2 durante 4 días de supervivencia

2 control: IgG no específica de ratón, 0,2 mg/ml durante 4 días de supervivencia

3 vehículo: - 10µl/g de PBS por peso corporal durante 4 días de supervivencia

30 Tabla 6

Mortalidad de 4 días	Supervivencia
PBS	0
IgG no específica de ratón	0
NT-M FAB2	75

35 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 los trató con anticuerpos NT-M FAB 2. A diferencia de esto, todos los ratones murieron después de 4 días cuando se los trató con IgG no específica de ratón. El mismo resultado se obtuvo en el grupo de control donde los ratones recibieron PBS (solución salina tamponada con fosfato).

Ejemplo 5

Efecto incremental del anticuerpo anti-ADM en animales con CLP sobre el tratamiento antibiótico y la estabilización de la circulación a través de catecolaminas, así como la regulación del equilibrio de líquidos.

Modelo animal

40 En este estudio se utilizaron ratones machos C57B1/6 (8-12 semanas, 22-30g). Se utilizó una sepsis polimicrobiana inducida por la ligadura y punción cecal (CLP) como modelo para estudiar el shock séptico. (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, hyperdynamic murine septic shock. *Shock* 2011;35(4):396-402.), (Wagner F, *et al*: Cardiopulmonary, histologic, and inflammatory effects of intravenous Na₂S after blunt chest trauma-induced lung contusion in mice. *J Trauma*. 2011 Dec;71(6):1659-67)).

Después de pesarlos, los ratones fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de 120 µg de ketamina, 1,25 µg/g de midazolam y 0,25 µg/g de fentanilo. Durante el procedimiento quirúrgico, la temperatura corporal se mantuvo a 37-38°C. Se realizó una sección abdominal de línea media de 1 cm para acceder al ciego. El ciego luego se ligó con sutura de seda 3-0 cerca de la base y se aplicó una punción única con una aguja de calibre 18. Se devolvió el ciego y se volvió a cerrar la incisión (sutura 4-0). Para compensar la pérdida perioperatoria de líquidos, se inyectaron 0,5 ml de solución de Ringer con 1 µg/g de buprenorfina como analgésico por vía subcutánea en la dermis dorsal. Para la antibiosis, los ratones recibieron 30 µg/g de ceftriaxona y 30 µg/g de clindamicina por vía subcutánea a través de las extremidades inferiores.

Después de la cirugía CLP, los animales se mantuvieron en un ambiente adecuadamente climatizado con agua y alimentos *ad libitum*.

La cobertura de los requerimientos de líquido se aseguró mediante una inyección subcutánea dorsal con 0,5 ml de solución de lactato con 4 µg/g de glucosa y 1 µg/g de buprenorfina, que se aplicaron en un ciclo de 8 horas, después de la anestesia a corto plazo con isotluran. Además, la antibiosis se mantuvo mediante inyecciones subcutáneas de 30 µg/g de ceftriaxona y 30 µg/g de clindamicina vía las extremidades inferiores.

Dosificación de las sustancias de prueba.

Tratamiento temprano

Inmediatamente después de la cirugía CLP y el cierre de la incisión, el anticuerpo de la sustancia de prueba NT-M se aplicó en una concentración de 500 µg/g en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a través de 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

Después del desarrollo completo de la sepsis, 15,5 h después de la cirugía CLP, los animales se anestesiaron como se describió anteriormente y se aplicó NT-M en una concentración de 500 µg/ml en solución salina tamponada de 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) (3 animales).

El grupo de control (6 animales) recibió una cantidad correspondiente de la solución de PBS del vehículo sin anticuerpo (4 µl/g, 88-120 µl) inmediatamente después de la cirugía CLP.

Grupos de estudio y cuadro experimental

Modelo de shock séptico murino bajo vigilancia intensiva:

Se monitorearon tres grupos con 3, 5 y 6 animales. El grupo 1 (5 animales) recibió el anticuerpo NT-M 15,5 h después de CLP, el grupo 2 recibió el anticuerpo NT-M inmediatamente después de la cirugía CLP y el grupo 3 recibió una cantidad comparable de PBS (4µl/g). Con incubación de 16 horas post-CLP (para permitir que progrese la sepsis polimicrobiana), el experimento continuó con monitoreo e intervenciones comparables a un régimen de cuidados médicos intensivos. Por lo tanto, después de pesarlos, se anestesió a los animales como se describe en la parte de la cirugía CLP (excepto por los animales tratados tardíamente, que fueron anestesiados antes del tratamiento). La temperatura corporal se mantuvo a 37-38°C durante el resto del experimento. Después de una traqueotomía e intubación, la respiración se monitoreó y fue asistida por un ventilador de laboratorio animal Flexivent® (Emka Technologies, FiO₂ 0,5, PEEP 10 H₂O, VT 8µl/g, I:E 1: 1,5, AF 70-140 dependiendo de la temperatura).

La anestesia se mantuvo durante todo el experimento a través de la vena yugular externa derecha canulada con una infusión 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 (PAM). La presión arterial media se mantuvo en PAM > 65 mmHg mediante infusión intravenosa (V. jugularis) de coloides (80 µl/gxh, Hextend®) y, si fuera 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 periodo, si la PAM > 65 mmHg (V.yugular) no pudo mantenerse con la dosis de vasopresor.

Parámetros medidos

Se midieron y analizaron los siguientes parámetros: consumo total de noradrenalina ($\mu\text{g NA/g}$), tasa de consumo de noradrenalina ($\mu\text{g NA/g/h}$), volumen total de orina recolectada durante el experimento, concentración de creatinina ($\mu\text{g/mL}$) al final del experimento y la depuración media de creatinina ($\mu\text{L/min}$).

5 Tabla 7

	Consumo total de noradrenalina ($\mu\text{g NA/g}$) (promedio)	Tasa de consumo de noradrenalina ($\mu\text{g NA/g/h}$) (Promedio)
Control (IgG de ratón) (N = 6)	0,17 $\mu\text{g/g}$	0,032 $\mu\text{g/h/g}$
NT-M (N = 5) tratamiento temprano	0,07 $\mu\text{g/g}$	0,012 $\mu\text{g/h/g}$
Cambio relativo (tratamiento temprano, mejora)	59% (59%)	62,5% (62,5%)
NT-M (N=3) tratamiento tardío	0,04 $\mu\text{g/g}$	0,0075 $\mu\text{g/h/g}$
Cambio relativo (tratamiento tardío, mejora)	76,5% (76,5%)	76,5% (76,5%)

10 Se midieron los requisitos de catecolaminas después de la administración de cualquier 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 temprano) o anticuerpo NT murino a un grupo de 3 ratones 15,5 h después de CLP (tratamiento tardío).

15 La reducción de los requerimientos de catecolaminas es una medida para estabilizar 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 requerimientos de catecolaminas. El efecto estabilizante de la circulación se dio en el tratamiento temprano (inmediatamente después de la CLP) y el tratamiento después del desarrollo completo de sepsis (tratamiento tardío) (véase la figura 7).

Regulación del equilibrio de fluidos

20 El balance de fluidos más positivo tanto temprano en la reanimación y como acumulativamente durante 4 días se asocia con un mayor riesgo de mortalidad en shock séptico. El control del equilibrio de líquidos es de suma importancia para el curso de la enfermedad de los pacientes con sepsis. (Véase Boyd et al, 2011). Controlar el equilibrio líquido de los pacientes críticos sigue siendo un importante desafío en la medicina de cuidados intensivos. Como se puede ver en la tabla 8, el tratamiento de ratones después de CLP (procedimientos experimentales, ver "Modelo Animal") con anticuerpos NT-M conducen a una mejora del volumen total de orina excretada. La orina secretada fue de aprox. tres veces más en los animales tratados con NT-M en comparación con los ratones no tratados. Se dio el efecto positivo del tratamiento en el tratamiento temprano y tardío. El equilibrio de fluidos mejoró en aproximadamente un 20-30%, también tanto en tratamiento temprano como tardío. Por lo tanto, los datos muestran que el uso de anticuerpos de ADM, especialmente el uso del anticuerpo NT ADM, es favorable para regular el equilibrio de líquidos 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
Control (IgG de ratón) (N = 6)	0,042 ml/g	0,23 ml/g
NT-M temprano (N = 5)	0,12 ml	0,18 ml/g
Cambio relativo tratamiento temprano	+ 186%	-21,7%%
NT-M tardío (N = 3)	0,125 ml	0,16 ml/g
Cambio relativo tratamiento tardío	+ 198%	-30,5%

30 Mejora de la función renal.

35 La combinación de insuficiencia renal aguda y sepsis se asocia con una mortalidad del 70 por ciento, según se compara con una mortalidad del 45 por ciento entre pacientes con insuficiencia renal aguda solamente. (Schrier y Wang, "Mechanisms of Disease Acute Renal Failure and Sepsis": The New England Journal of Medicine; 351 :159-69; 2004). La concentración de creatinina y la depuración de creatinina son parámetros de laboratorio estándar para monitorear la (dis) función renal (Jacob, "Acute Renal Failure", Indian J. Anaesth.; 47 (5): 367-372; 2003). Los datos de creatinina y depuración de creatinina del experimento de animales descrito anteriormente (tratamiento temprano) se indican en la Tabla 9.

Tabla 9

Función renal:

	Concentración de creatinina (µg/mL)	Depuración media de creatinina (µL/min)
IgG de ratón de control (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%)

5 En comparación con los animales sépticos 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

10 El tejido hepático para el control de los animales tratados tempranamente 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 liviana 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-citidílico (poli-dI-dC) y oligonucleótido de doble cadena 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 control 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 control. Estadística: Todos los datos se presentan como mediana (intervalo) a menos que de otro modo 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 de NF-κB en el 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:

- 30 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
- 35 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 anticuerpo NT-M

40 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 PBS (10 µl/g de peso corporal). Se siguió la supervivencia y el estado físico durante 14 días. La mortalidad fue 0 en ambos grupos, y no hubo diferencias en el estado físico entre NT-M y el grupo de control.

Ejemplo 7

Nefrotoxicidad provocada por gentamicina

45 Se creó un modelo de lesión renal aguda no séptica, con 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	Ensayo	Vía	Conc. mg/ml	Dosis ml/kg	mg/kg	Ratas ^d (Macho)
1	Gentamicina ^a + vehículo ^b	IV			NA x 4 ^c	8
2	Gentamicina ^a + NT-M	IV			X 4 ^c	8

^aGentamicina 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.
^cNT-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.
^dLas muestras de plasma se recogieron en tubos con EDTA (días 1 y 3 antes del artículo de prueba y de control: 100 µl; Día 7: 120 µl. La recolección de orina en hielo de 24 h 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 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 el 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. Los 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.

Recolección 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) (figura 11), 32,08 mg/dl de BUN (NT-M) frente a 52,41 mg/dl (vehículo) (figura 12), 934,43 ml/24 h de depuración de creatinina endógena (NT-M) frente a 613,34 ml/24 h (vehículo) (figura 13), 0,98% de secreción fraccionaria de Na⁺ (NT-M) frente a 1,75% (vehículo) (figura 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 y depuración de creatinina tres y dos veces mayores, 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) derivadas de queratinocitos en el riñón se redujeron significativamente por tratamiento con NT-M (figura 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 neutrófilo gelatinasa. Todos los datos son medianas (cuartiles).

	Vehículo	NT-M	Valor p
Producción de orina [$\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	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)

- 5 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 (Optima-5MS, Macherey-Nagel, Düren, Alemania)/espectrometría de masas (Agilent 5890/5970, Böblingen, Alemania), utilizando $^2\text{H}_3$ -creatinina (isótopos CDN, Point -Claire, QU, Canadá) y metil-urea (FlukaChemikalien, Buchs, Suiza) como patrones internos. Después de la desproteinización con acetoneitrilo, centrifugación y evaporación hasta secarse, 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 y patrones internos de urea y creatinina, respectivamente. A partir de la uremia y de las concentraciones de creatinina en plasma y en la orina se calculó la depuración de creatinina utilizando la fórmula estándar.

Preparación de la muestra

- 20 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-X100 al 1%; NP 40 al 0,5%; glicerol al 10%; inhibidores de proteasa (2 mM de β -glicerofosfato; DTT 4 mM; 20 mM de leupeptina; 0,2 mM de ortovanadato sódico)), 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 $\mu\text{g}/\text{l}$. 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%).

- 30 Los niveles de las concentraciones de quimiocinas (KC) en queratinocitos se determinaron utilizando un kit de citocinas múltiplex de ratón (Bio-Plex Pro Cytokine Assay, Bio-Rad, Hercules, CA), y el ensayo se realizó utilizando el sistema de ensayos en suspensión Bio-Plex con la 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 ensayos de proteínas Bio-Plex. Los datos fueron procesados y analizados automáticamente por el programa informático Manager 4.1 de Bio-Plex utilizando la curva estándar 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.

Ejemplo 9

- 45 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 (figura 16).

La medición de quimiocinas (KC) de queratinocitos se realizó de manera análoga a la del Ejemplo 8 (riñón).

Ejemplo 10

- 50 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).

Concentraciones de citocinas y de quimiocinas

Se determinaron las concentraciones en plasma del factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-6, proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1 y quimiocinas (KC) derivadas de queratinocitos utilizando un kit de citocinas múltiplex de ratón (Bio-Plex Pro Cytokine Assay, Bio-Rad, Hercules, CA); el ensayo se realizó utilizando el sistema de ensayos 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 ensayos de proteínas Bio-Plex. Los datos fueron procesados y analizados automáticamente con el programa informático Manager 4.1 de Bio-Plex utilizando la curva estándar 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 plasma y las concentraciones en el tejido renal de factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-6 e IL-10, proteína quimiotáctica 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 unieron 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 ensayos 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 estándar 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 p·mg⁻¹ de proteína.

NT-M produjo una disminución significativa de las concentraciones en plasma de IL-6 (figura 17), IL-10 (figura 18), quimiocina (KC) derivada de queratinocitos (figura 19), proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) (figura 20), TNF-alfa (figura 21).

Ejemplo 11

Lesión renal aguda provocada por isquemia/reperfusión

Se ha creado otro modelo de lesión renal aguda no séptica, 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 ischemia-reperfusion 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

^a vehículo; inyectado por vía intravenosa (IV) 5 min antes de la reperfusión el día 0, seguido de inyecciones los días 1 y 2.

^b NT-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 cirugía), 1, 2: 100 µl, antes del vehículo o TA; Día 3: 120 µl).

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

5 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 recibieron complementos de fluidos (NaCl al 0,9% y dextrosa al 5%/1:1, 10 ml/kg PO) 30 min antes de la cirugía (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 retirar 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.

10 Recolectión de orina. La recolectión de orina en hielo de 24 h se inició 24 horas antes de la isquemia/reperfusión el día -1 (-24 h a 0 h), 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.

15 Extracción sanguínea: Se extrajeron 0,4 ml de sangre de la vena de la cola en tubos con EDTA a la 0 h (antes de cirugía 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 terminalmente.

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.

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

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

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

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

25 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:

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

El tratamiento con anticuerpos anti-adrenomedulina mejoró varias mediciones de la función renal:

30 El 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) (figura 22).

La creatinina en suero evolucionó en forma similar: 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) (figura 23).

35 La depuración de creatinina endógena disminuyó masivamente el día uno y a partir de entonces mejoró más en el grupo de 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) (figura 24).

Descripción de las figuras

Figura 1a: Ilustración de formatos de anticuerpos – Variantes Fv y scFv

Figura 1b: Ilustración de formatos de anticuerpos - fusiones heterólogas y anticuerpos bifuncionales

Figura 1c: Ilustración de formatos de anticuerpos - anticuerpos bivalentes y anticuerpos biespecíficos

5 Figura 2:

ADMh 1-52 (SEQ ID NO: 21)

ADMm 1-50 (SEQ ID NO: 22)

aa 1-21 de ADM humana (SEQ ID NO: 23)

aa 1-42 de ADM humana (SEQ ID NO: 24)

10 aa 43-52 de ADM humana (SEQ ID NO: 25)

aa 1-14 de ADM humana (SEQ ID NO: 26)

aa 1-10 de ADM humana (SEQ ID NO: 27)

aa 1-6 de ADM humana (SEQ ID NO: 28)

aa 1-32 de ADM humana madura (SEQ ID NO: 29)

15 aa 1-40 de ADM murina madura (SEQ ID NO: 30)

aa 1-31 de ADM murina madura (SEQ ID NO: 31)

Figura 3:

a: curva de respuesta a la dosis de ADM humana. La estimulación máxima de AMPc se ajustó a la activación del 100%

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

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

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

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

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

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

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

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

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

30 k: muestra la inhibición de ADM por F(ab)2 NT-M y por Fab de NT-M

l: muestra la inhibición de ADM por F(ab)2 de NT-M y por Fab de NT-M

Figura 4:

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

35 Figura 5:

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

Figura 6:

Alineación de los Fab con secuencias de marco humano homólogas

Figura 7:

Esta figura muestra los requerimientos de noradrenalina para el tratamiento temprano y tardío con NT-M

Figura 8:

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

Figura 9:

Esta figura muestra el equilibrio de fluidos después del tratamiento temprano y tardío con NT-M

Figura 10:

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

Figura 11:

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

Figura 12:

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

15 Figura 13:

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

Figura 14: Evolución de la secreción fraccionada de Na^+ con el tiempo. Se muestran media \pm SEM.

Figura 15:

20 Niveles de quimiocinas derivadas de queratinocitos (KC) determinados 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.

Figura 16:

25 Niveles de quimiocinas derivadas de queratinocitos (KC) determinados 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.

Figura 17:

Niveles de IL-6 en 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.

Figura 18:

30 Niveles de IL-10 en 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.

Figura 19:

Niveles de quimiocinas derivadas de queratinocitos (KC) en 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.

35 Figura 20:

Niveles de proteína-1 (MCP-1) quimiotáctica de monocitos en 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.

Figura 21:

40 Niveles de TNF-alfa en 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.

Figura 22:

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

Figura 23:

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

5 Figura 24:

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina
- 5 a) para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente para estabilizar la circulación sistémica de dicho paciente, en donde dicho paciente necesita estabilizar la circulación sistémica y exhibe una frecuencia cardíaca de > 100 latidos/min y/o < 65 mmHg de presión arterial media, y en donde estabilizar la circulación sistémica significa aumentar la presión arterial media por encima de 65 mmHg, o
- b) para uso en la prevención de un aumento de la frecuencia cardíaca a > 100 latidos/min y/o una disminución de la presión arterial media a < 65 mmHg en pacientes que tienen una enfermedad aguda o afección aguda,
- 10 y en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo o armazón no Ig se une a una región de al menos 4 aminoácidos dentro de la secuencia de aa 1-21 de ADM madura humana:
- YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC
(SEQ ID NO: 23).
- 15 2. Un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo o fragmento o armazón reduce el requerimiento de vasopresor, p. ej. el requerimiento de catecolaminas, de dicho paciente.
- 20 3. Un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo o armazón no Ig es un anticuerpo anti-ADM no neutralizante o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina no neutralizante o un armazón no Ig anti-ADM no neutralizante.
- 25 4. Un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para su uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo o armazón no Ig es mono-específico.
- 30 5. Un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho anticuerpo o fragmento o armazón exhibe una afinidad de unión a ADM de al menos 10^{-7} M, en donde dicha afinidad de unión se determina según el Ejemplo 1.
- 35 6. Un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho anticuerpo o fragmento o armazón no es la proteína 1 de unión a ADM, factor de complemento H.
- 40 7. Un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho anticuerpo o fragmento o armazón reconoce y se une a un epítipo que contiene el aminoácido 1 de extremo N-terminal de ADM madura humana y en donde dicho anticuerpo o fragmento o armazón no se une a adrenomedulina extendida en N-terminal ni modificada en N-terminal ni a adrenomedulina degradada en N-terminal.
- 45 8. Un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para uso en terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho anticuerpo o fragmento o armazón es un anticuerpo o fragmento o armazón estabilizante de ADM que mejora la vida media, tiempo medio de retención $t_{1/2}$, de adrenomedulina en suero, sangre, plasma, al menos al 10%, o al menos 50%, o $> 50\%$, o $> 100\%$.
- 50 9. Un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho anticuerpo o fragmento o armazón bloquea la bioactividad de ADM circulante en no más del 80%, preferiblemente no más del 50% al determinar la bioactividad de ADM en un ensayo funcional de receptor AMPc de adrenomedulina recombinante humana según el Ejemplo 2.
- 55 10. Un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho anticuerpo o fragmento o armazón es un anticuerpo anti-ADM modulador o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina modulador o un

almazón no Ig anti-ADM modulador que mejora la vida media, tiempo medio de retención $t_{1/2}$, de la adrenomedulina en suero, sangre, plasma en al menos el 10%, o al menos el 50%, o > 50%, o > 100% , lo que bloquea la bioactividad de ADM a no más del 80%, preferiblemente no más del 50%, y en donde la bioactividad de ADM se determina en un ensayo funcional de receptor AMPc de adrenomedulina recombinante humana según el Ejemplo 2.

- 5 11. Un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina para uso en la terapia de una enfermedad aguda o condición aguda de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho anticuerpo o fragmento es un anticuerpo o fragmento monoclonal humano que se une a ADM, en donde la cadena pesada comprende las secuencias

10 SEQ ID NO: 1
GYTFSRYW

SEQ ID NO: 2
ILPGSGST

SEQ ID NO: 3
TEGYEYDGFYD

- 15 y en donde la cadena liviana comprende las secuencias

SEQ ID NO: 4
QSIVYSNGNTY

SEQ ID NO: 5
RVS

- 20 SEQ ID NO: 6
FQGSHIPYT.

12. Un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina para uso en la terapia de una enfermedad aguda o condición aguda de un paciente según la reivindicación 11, en donde dicho anticuerpo o fragmento comprende una secuencia seleccionada del grupo que comprende:

- 25 SEQ ID NO: 7 (AM-VH-C)

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSRYWIEWVKQRPGHGLEWIGEIL
PGSGSTNYNEKFKGKATITADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGF
DYWGQGTTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKRVEPKHHHHHH

SEQ ID NO: 8 (AM-VH1)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGRI
LPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTEGYEYDGF
FDYWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKRVEPKHHHHHH

SEQ ID NO: 9 (AM-VH2-E40)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGRI
LPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTEGYEYDGF
FDYWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
30 KVDKRVEPKHHHHHH

SEQ ID NO: 10 (AM-VH3-T26-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGEI
LPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTEGYEYDGI
FDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKRVEPKHHHHHH

SEQ ID NO: 11 (AM-VH4-T26-E40-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEI
LPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTEGYEYDGI
FDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKRVEPKHHHHHH

SEQ ID NO: 12 (AM-VL-C)

DVLLSQTPLSLPVSLGDQATISCRSSQSIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIY
RVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHIPYTFGGGTK
LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

5

SEQ ID NO: 13 (AM-VL1)

DVVMVTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIY
RVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGQGT
KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

SEQ ID NO: 14 (AM-VL2-E40)

DVVMVTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLEWFQQRPGQSPRRLIY
RVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGQGT
KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC.

10 13. Un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o
armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección
aguda de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicho paciente sufre de una
15 enfermedad que se selecciona del grupo que comprende SIRS, sepsis, diabetes, cáncer, enfermedades vasculares
agudas como p. ej. insuficiencia cardíaca, shock como p. ej. shock séptico, y disfunción orgánica como p. ej. disfunción
renal.

14. Un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un
armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección
aguda de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque dicho anticuerpo,
20 fragmento de anticuerpo o armazón no Ig no se une a la porción C-terminal de ADM, siendo aa 43-52 de ADM (SEQ
ID NO: 25)

PRSKISPQGY-NH2

(SEQ ID NO: 25).

15. Un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un
armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección

aguda de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que se utiliza en combinación con catecolaminas y/o fluidos administrados por vía intravenosa.

5 16. Un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que se utiliza en combinación con la proteína de unión a ADM y/o más ingredientes activos.

10 17. La formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 16.

18. La formulación farmacéutica según la reivindicación 17 para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según la reivindicación 17, en donde dicha formulación farmacéutica es una solución, o una solución lista para usar.

15 19. La formulación farmacéutica según la reivindicación 17 para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según la reivindicación 17, en donde dicha formulación farmacéutica está en estado liofilizado.

20 20. La formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-adrenomedulina o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a adrenomedulina o un armazón no Ig anti-ADM que se une a adrenomedulina según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, para uso en la terapia de una enfermedad aguda o afección aguda de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en donde dicha formulación farmacéutica debe administrarse a un paciente para estabilizar la circulación sistémica con la condición de que dicho paciente necesite estabilizar la circulación sistémica.

Fig. 1a:

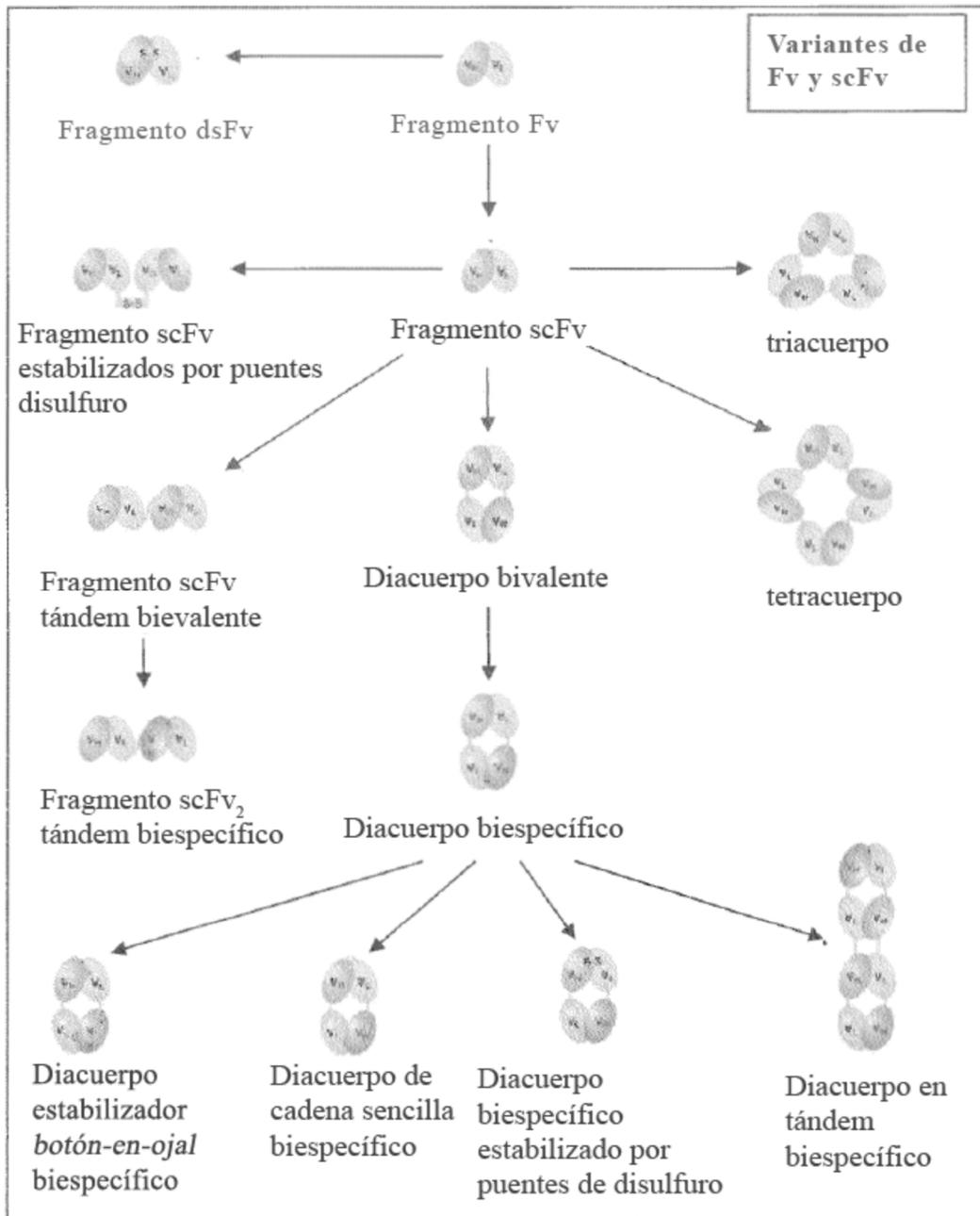


Fig 1b:

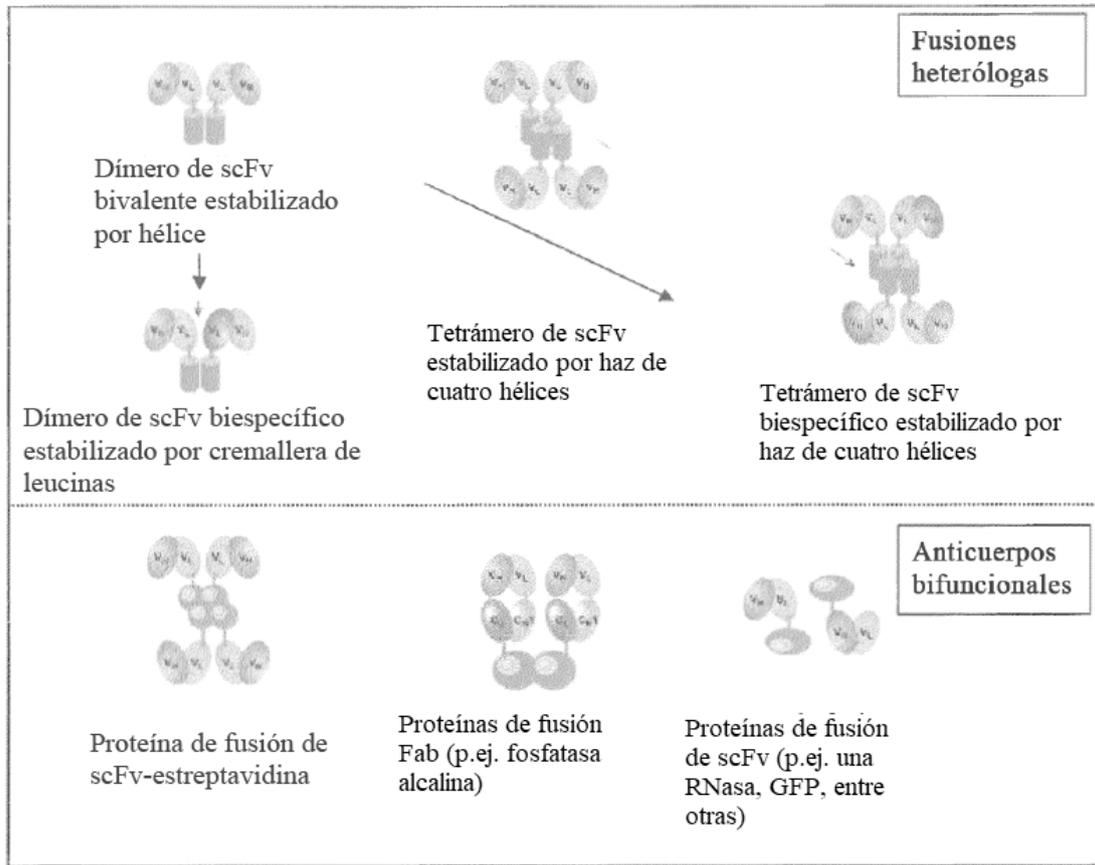


Fig. 1c:

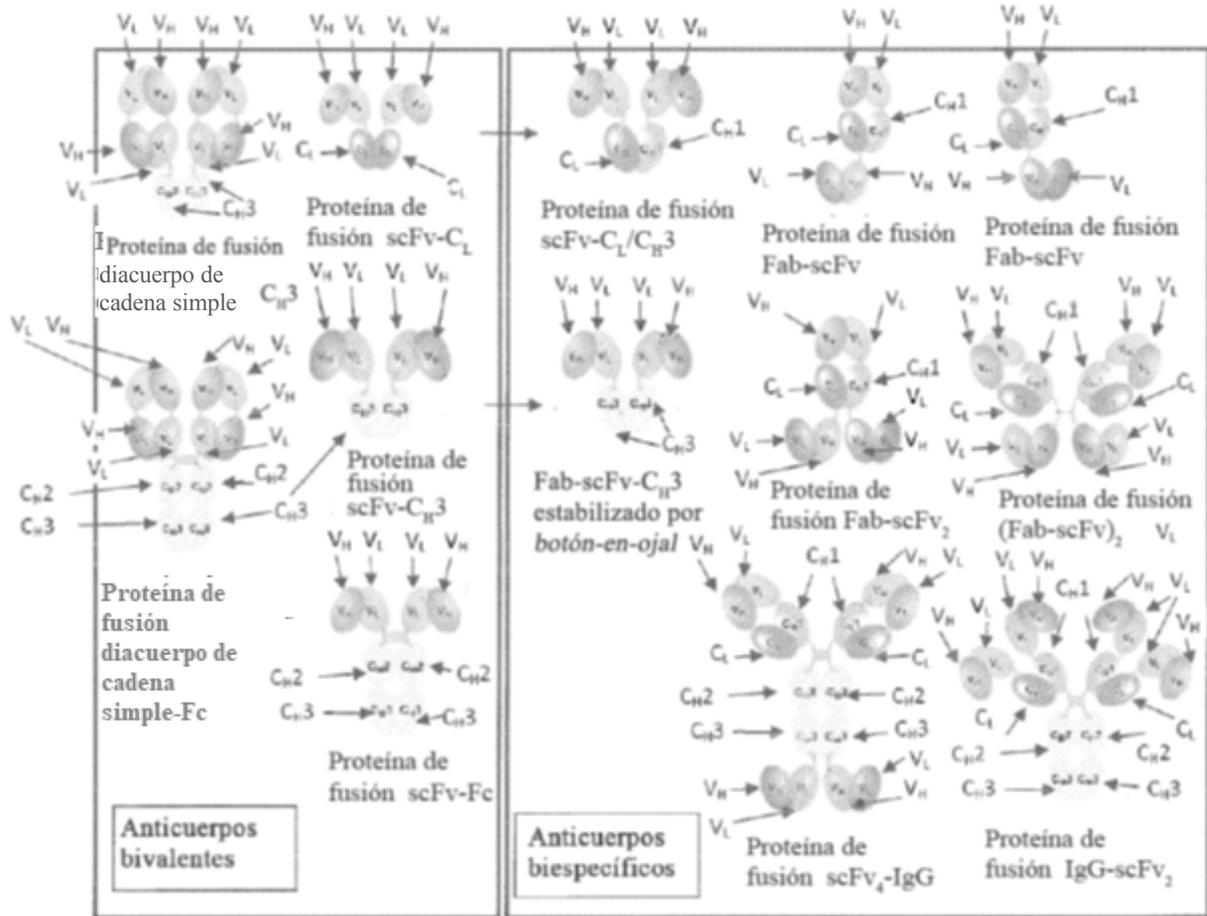


Fig. 2:

SEQ ID NO: 21

YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY-NH₂

SEQ ID NO: 22

YRQSMNQGSRSNGCRFGTCTFQKLAHQIYQLTDKDKDGMAPRNKISPQGY-NH₂

SEQ ID NO: 23

YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC

SEQ ID NO: 24

YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVA

SEQ ID NO: 25

PRSKISPQGY-NH₂

SEQ ID NO: 26

YRQSMNNFQGLRSF

SEQ ID NO: 27

YRQSMNNFQG

SEQ ID NO: 28

YRQSMN

SEQ ID NO: 29

YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQ

SEQ ID NO: 30

YRQSMNQGSRSNGCRFGTCTFQKLAHQIYQLTDKDKDGMA

SEQ ID NO: 31

YRQSMNQGSRSNGCRFGTCTFQKLAHQIYQL

Fig. 3 a:

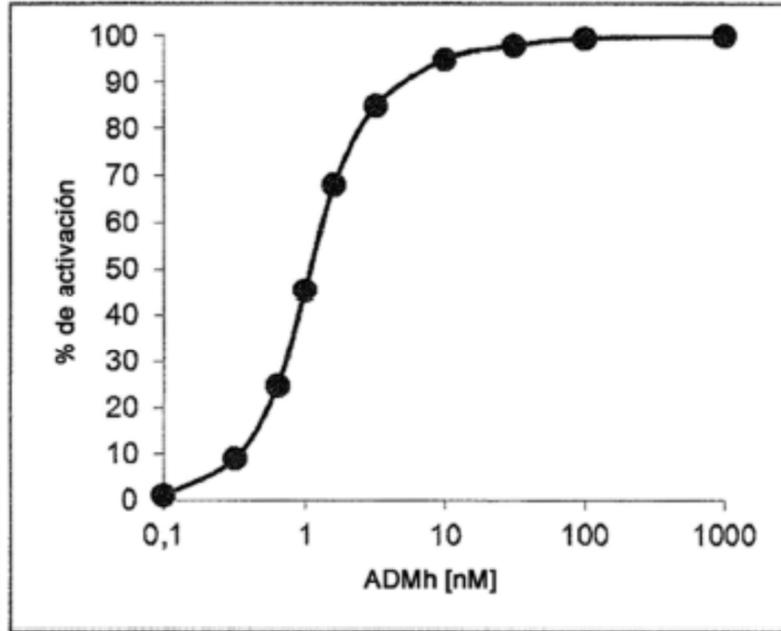


Fig. 3 b:

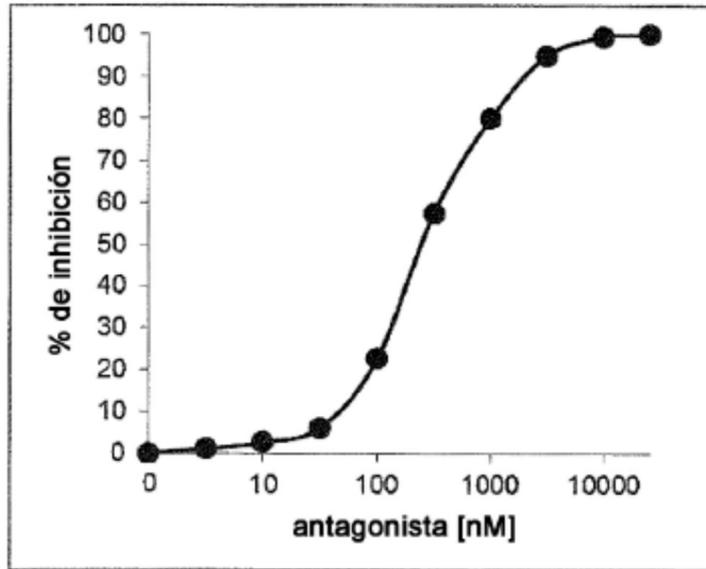


Fig. 3 c:

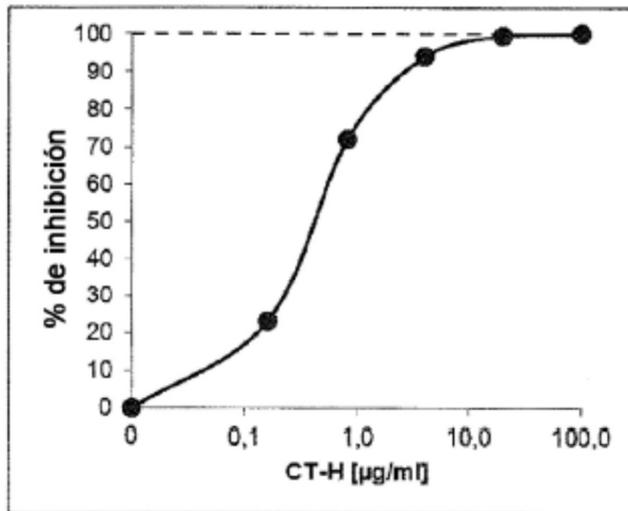


Fig. 3 d:

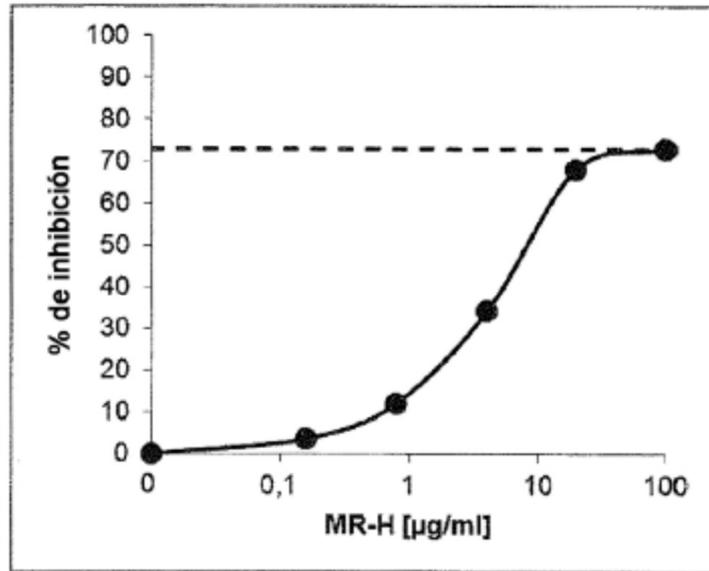


Fig. 3 e:

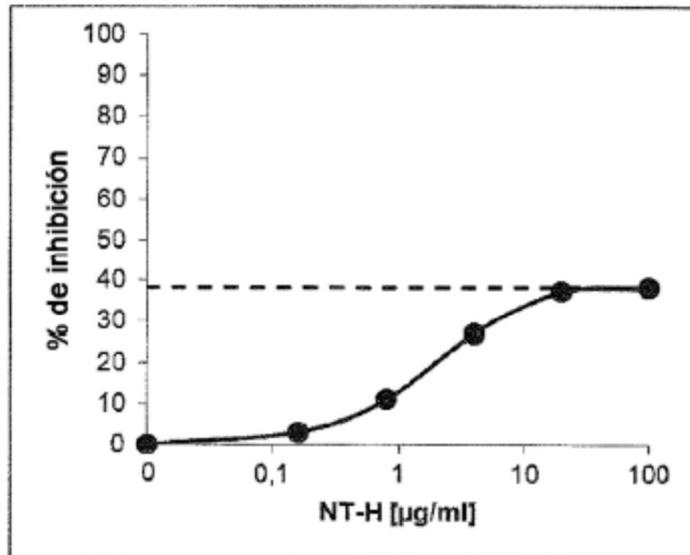


Fig. 3 f:

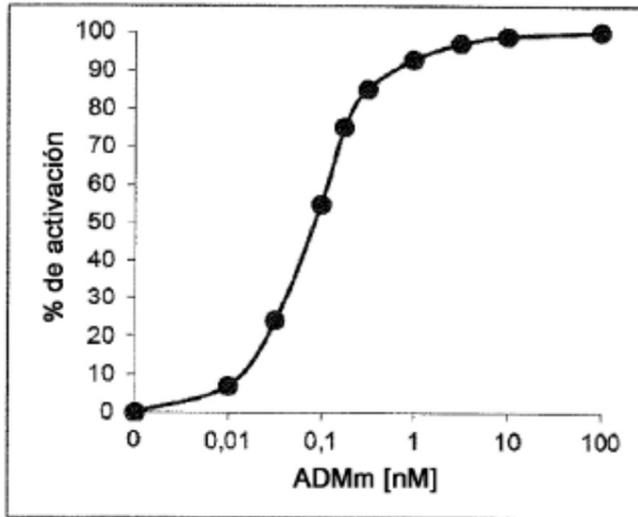


Fig. 3 g:

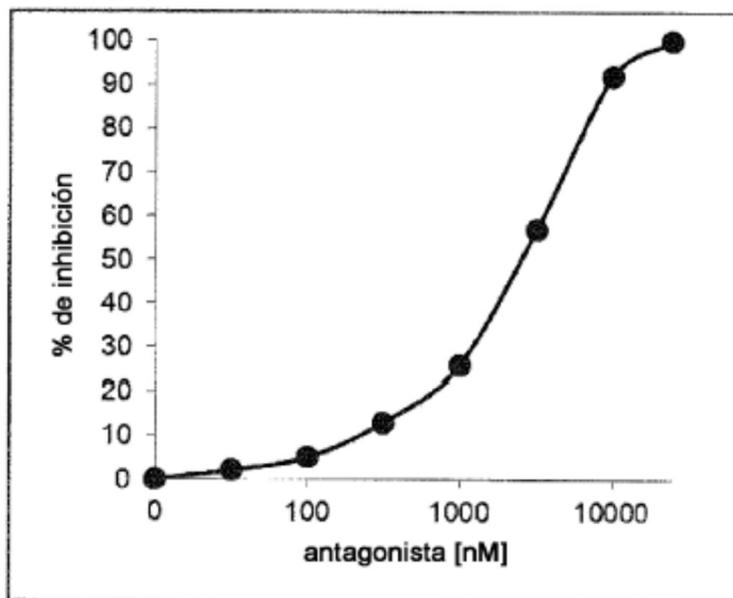


Fig. 3 h:

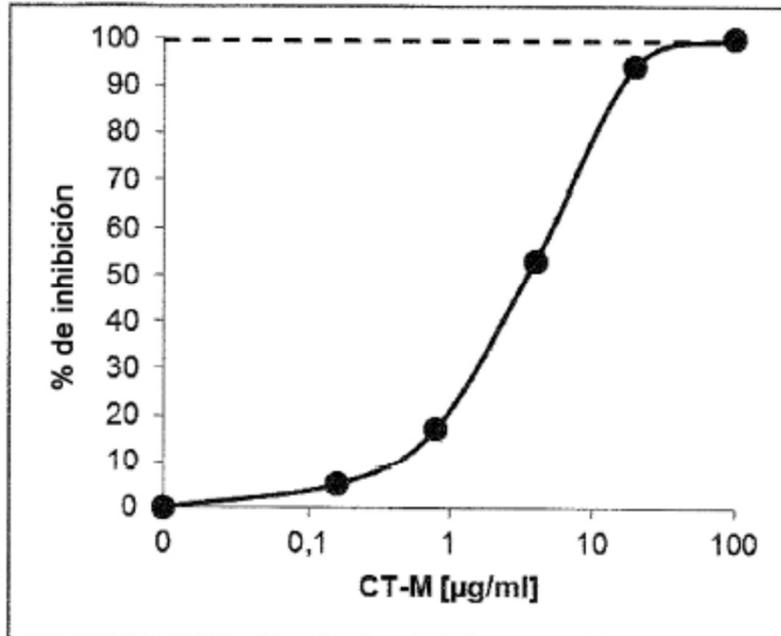


Fig. 3 i:

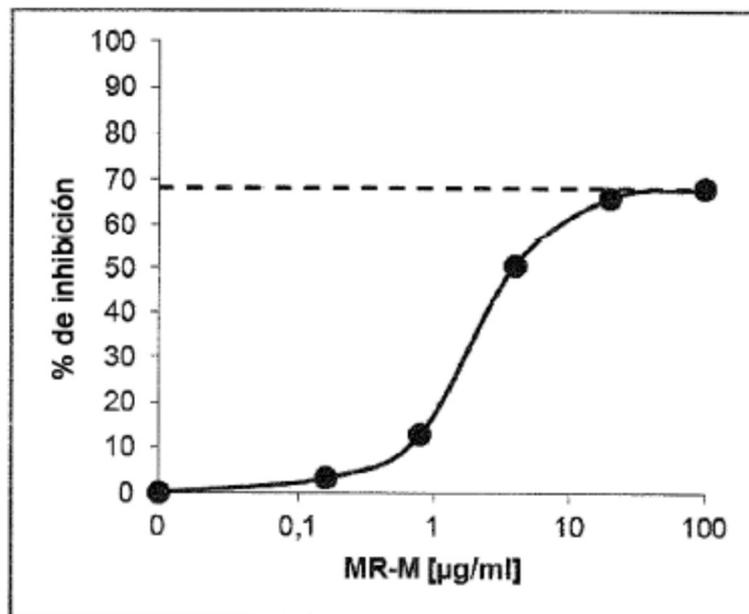


Fig. 3 j:

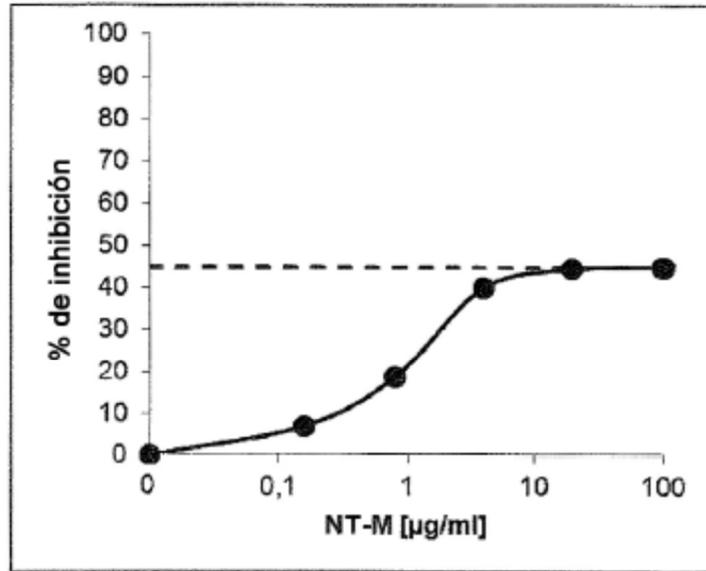


Fig. 3 k:

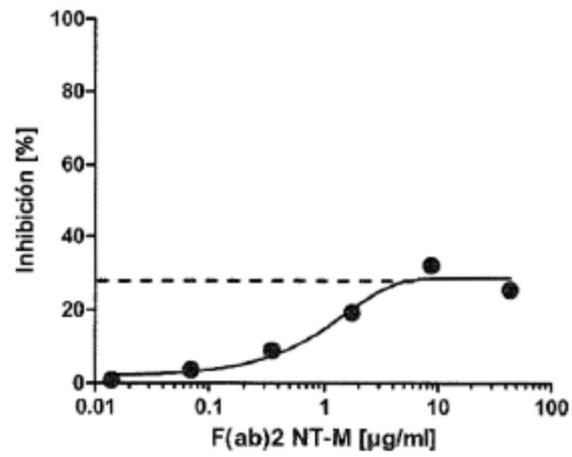


Fig. 3 I:

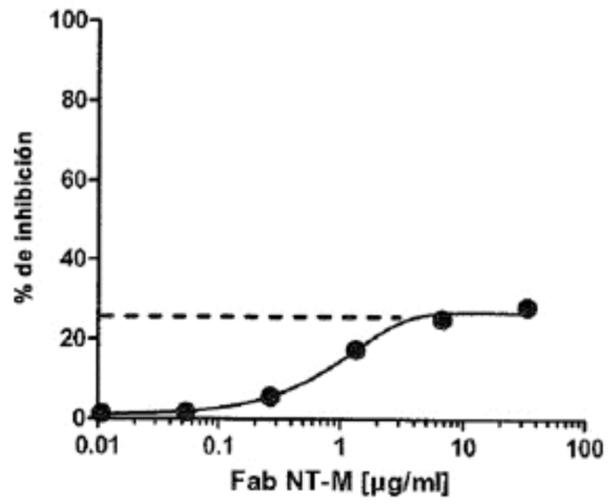


Fig. 4:

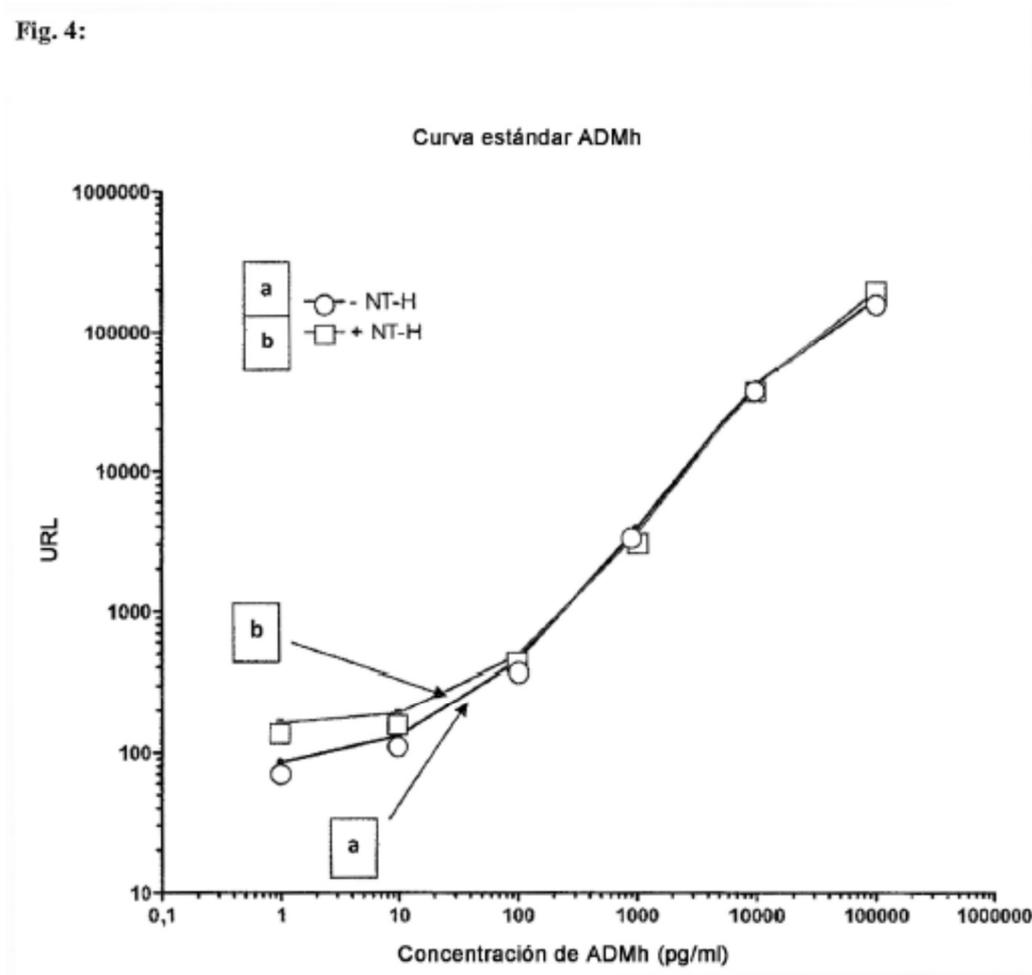


Fig. 5:

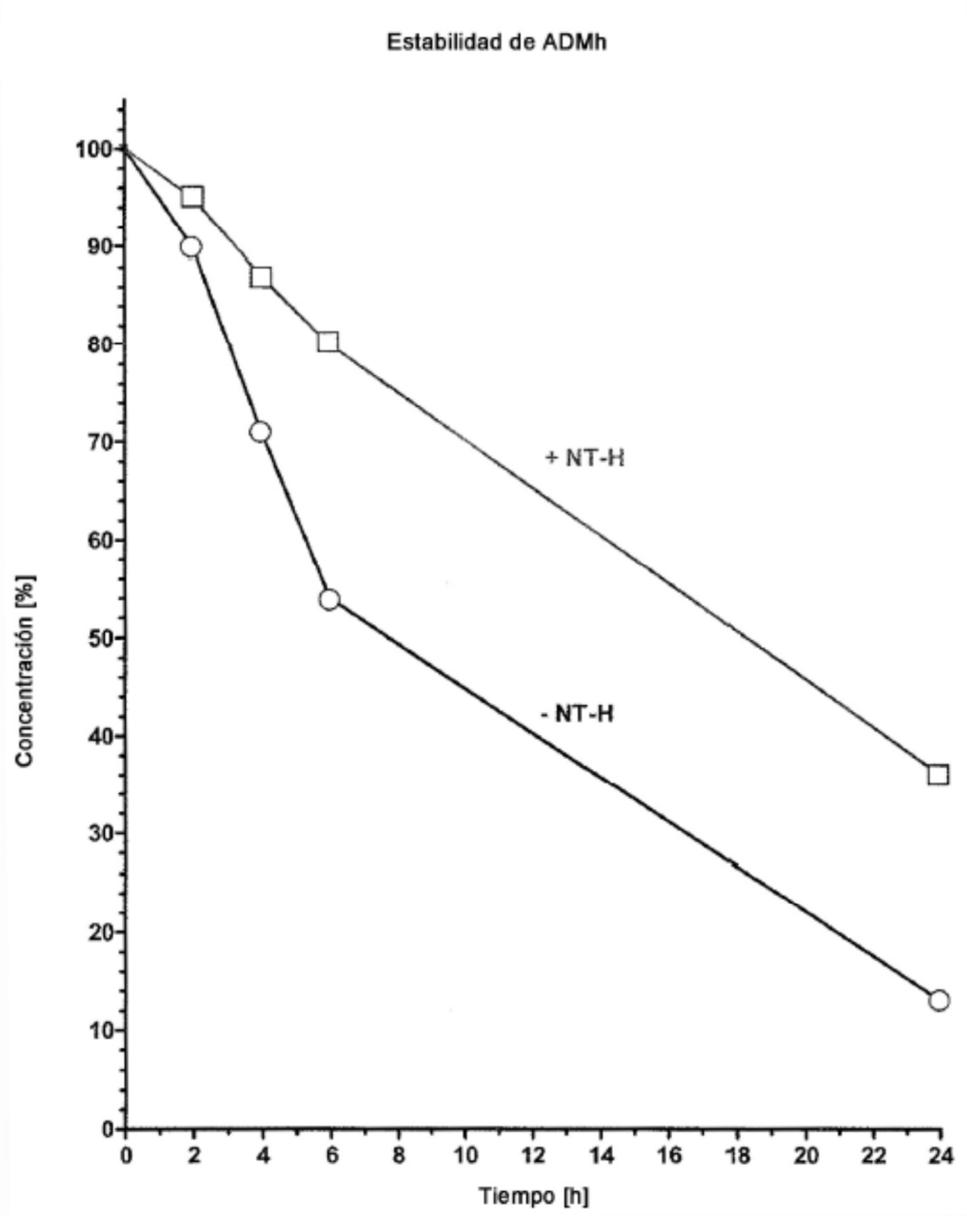


Fig. 7

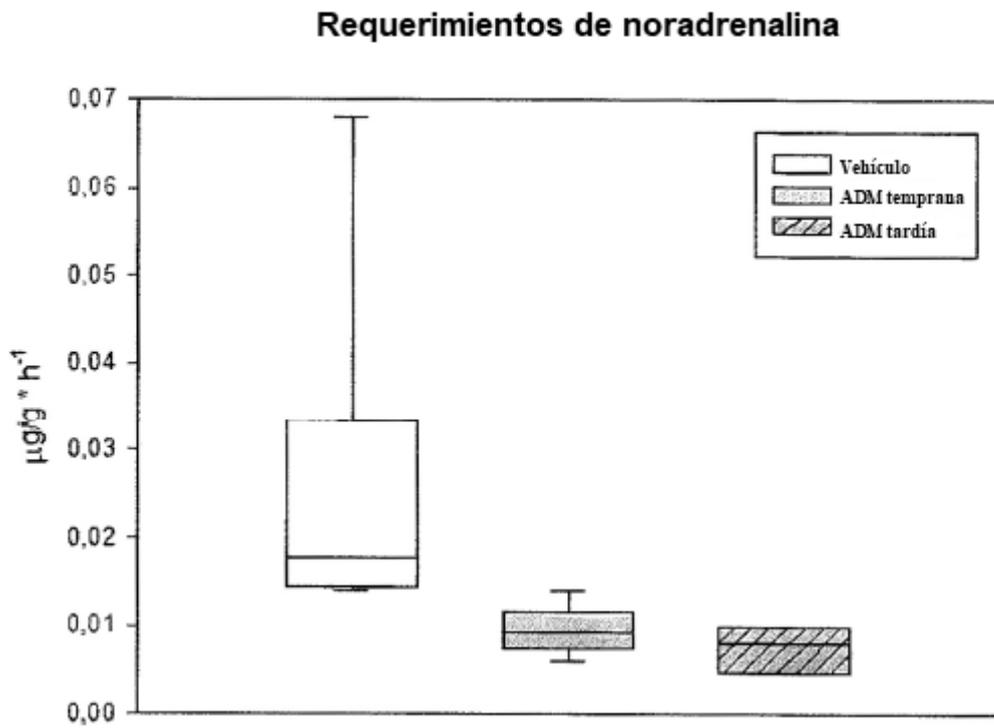


Fig. 8

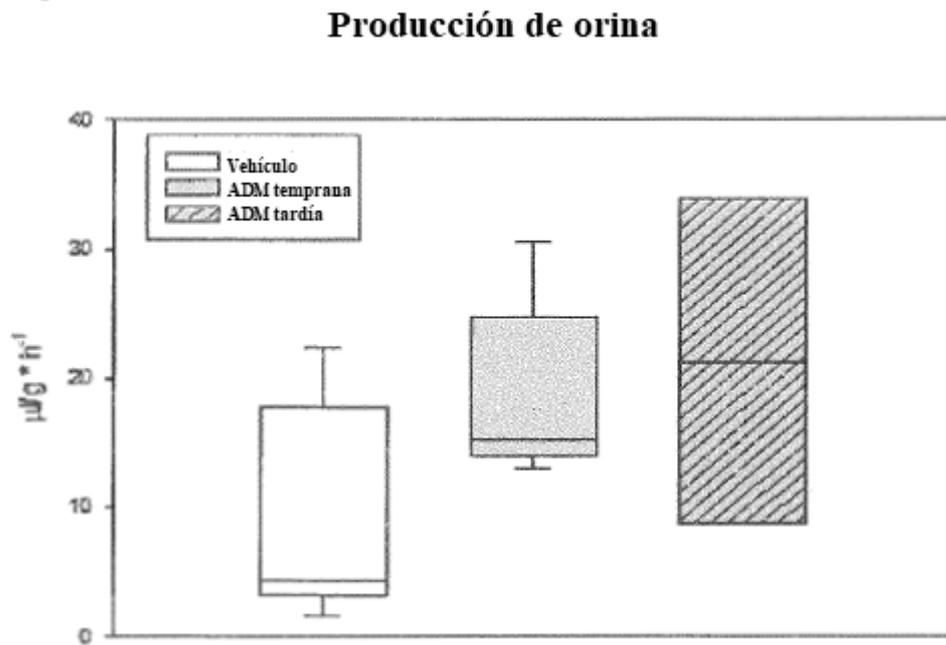


Fig. 9

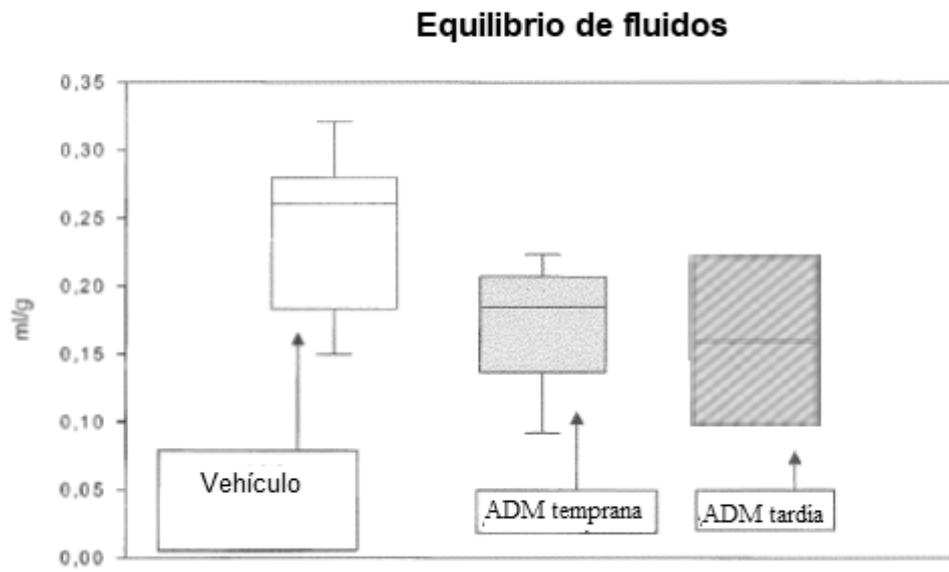


Fig. 10

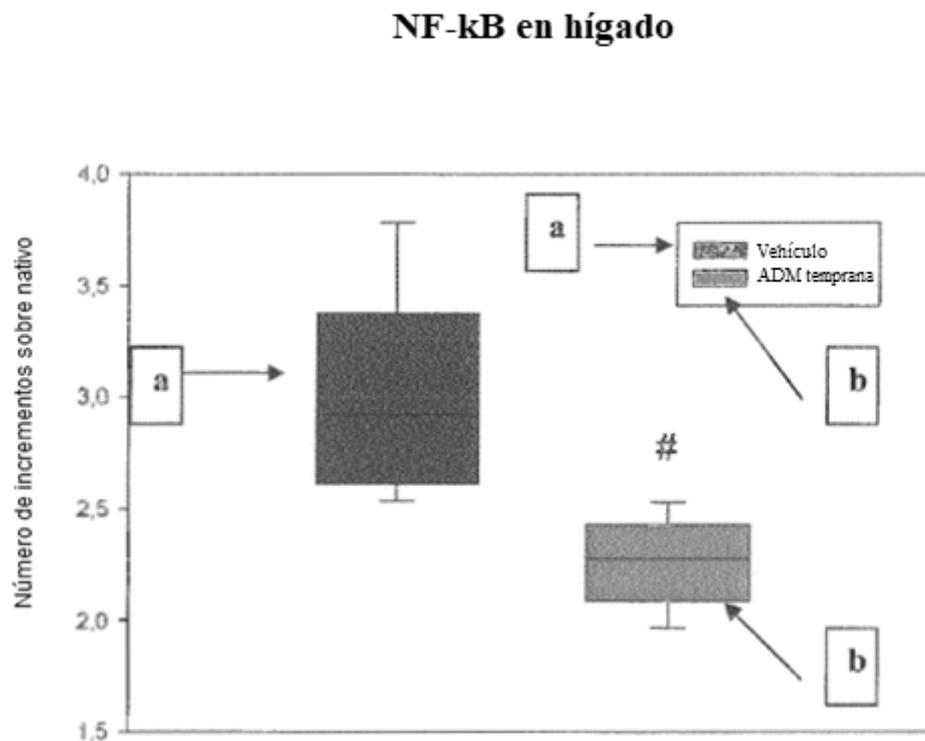


Fig. 11:

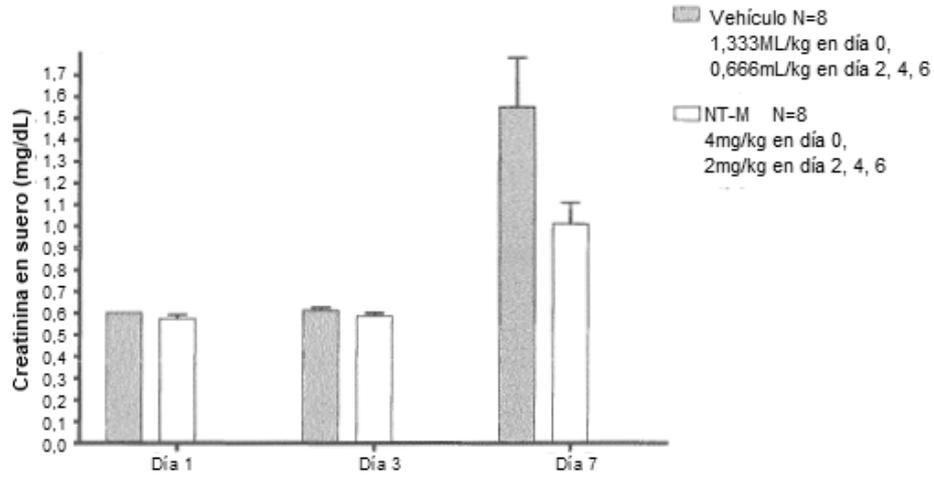


Fig. 12:

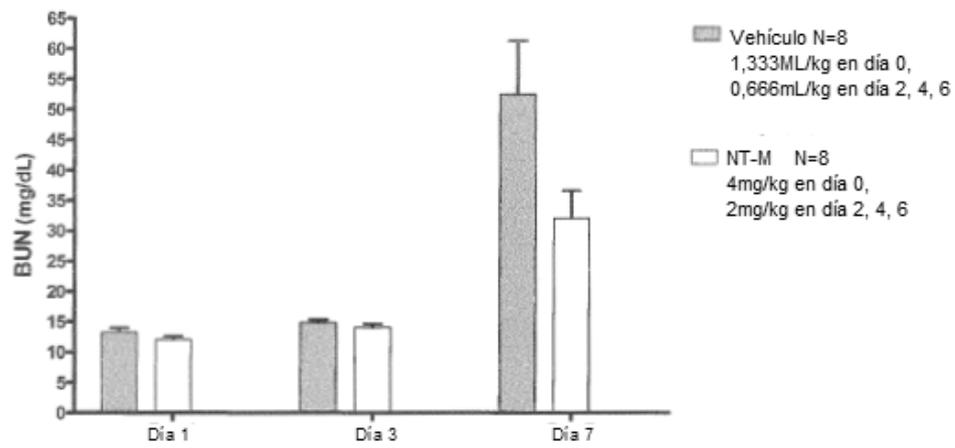


Fig. 13:

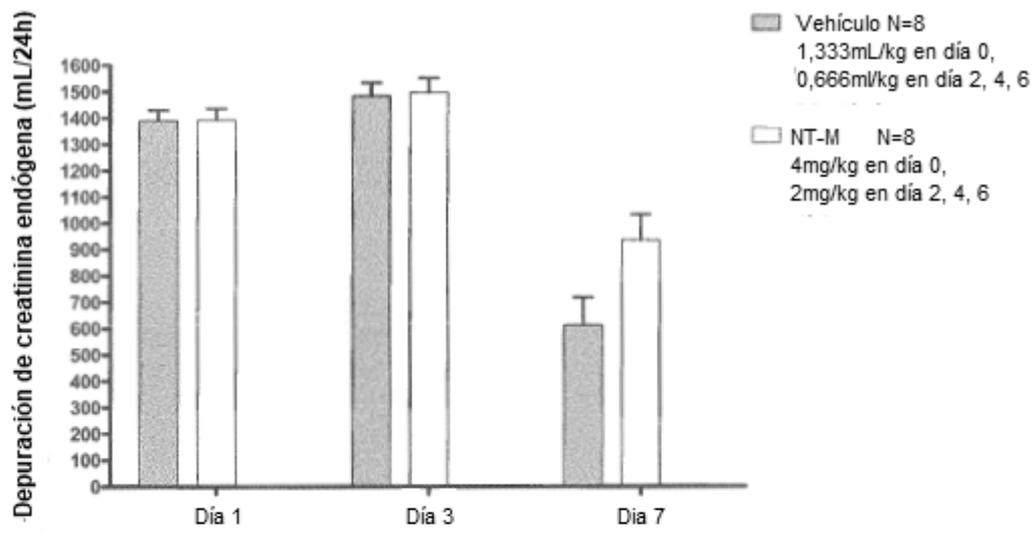


Fig. 14:

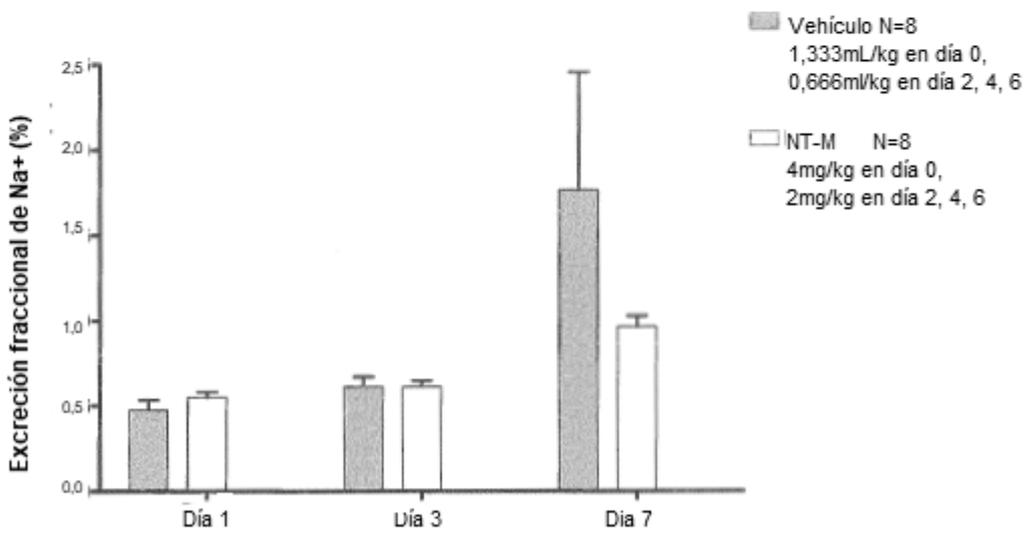


Fig. 15:

KC en riñón

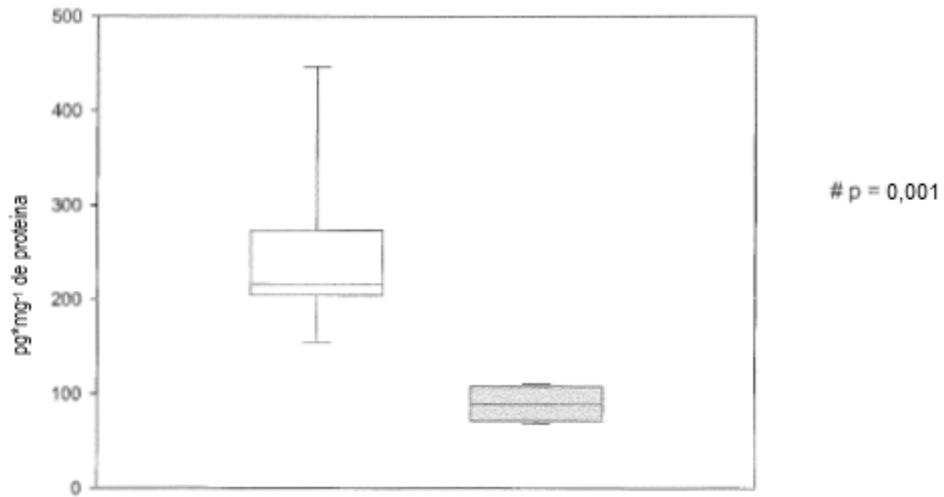


Fig. 16:

KC en hígado

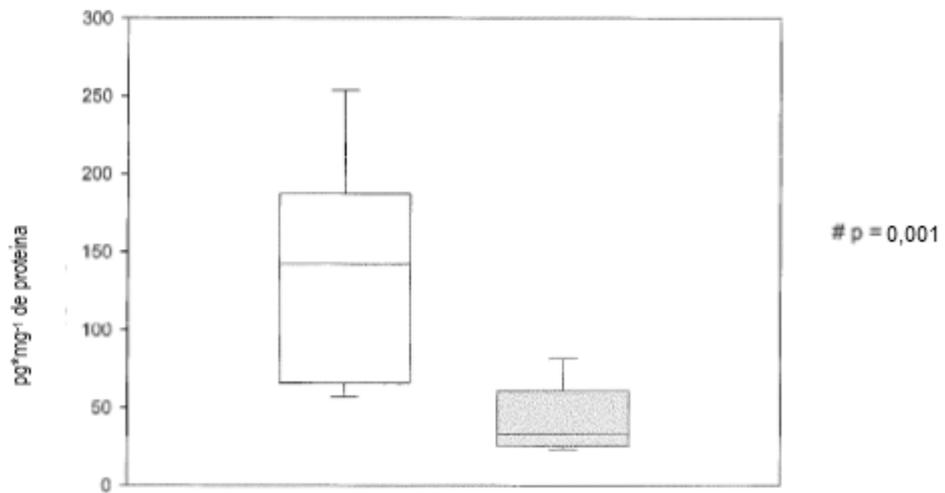


Fig. 17:

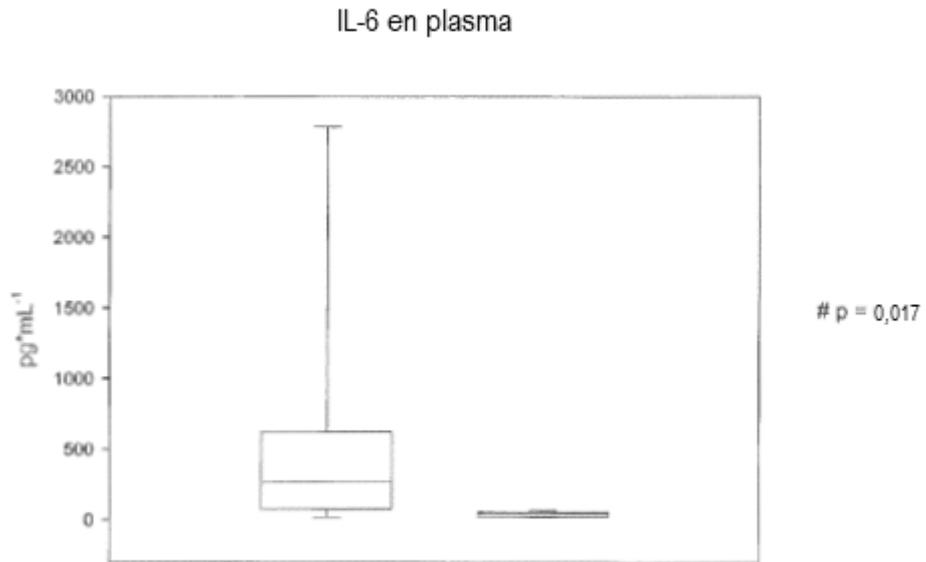


Fig. 18:

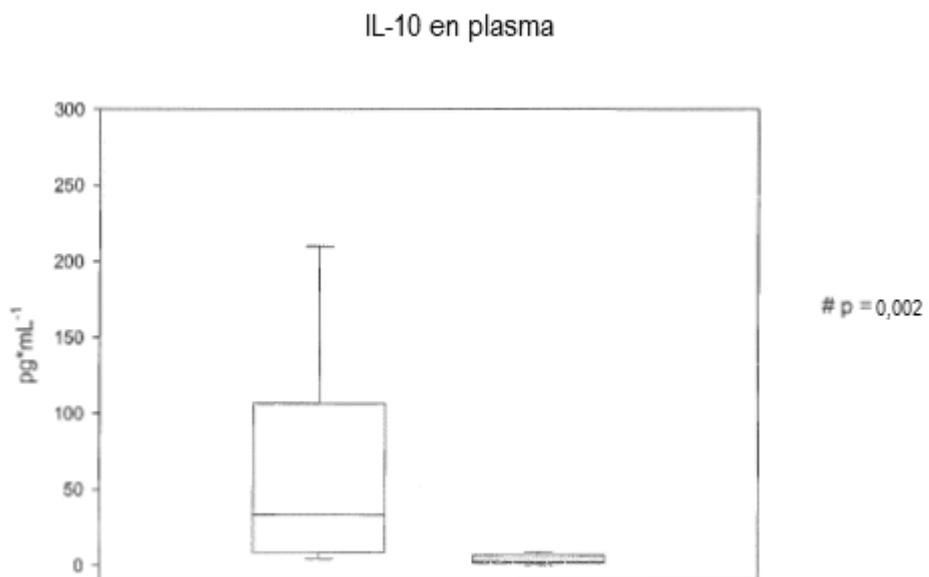


Fig. 19:

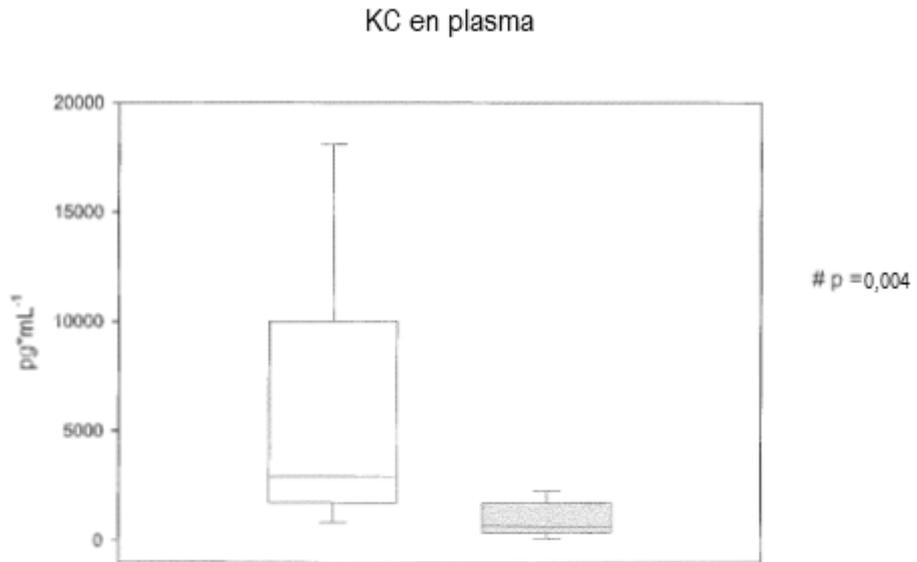


Fig. 20:

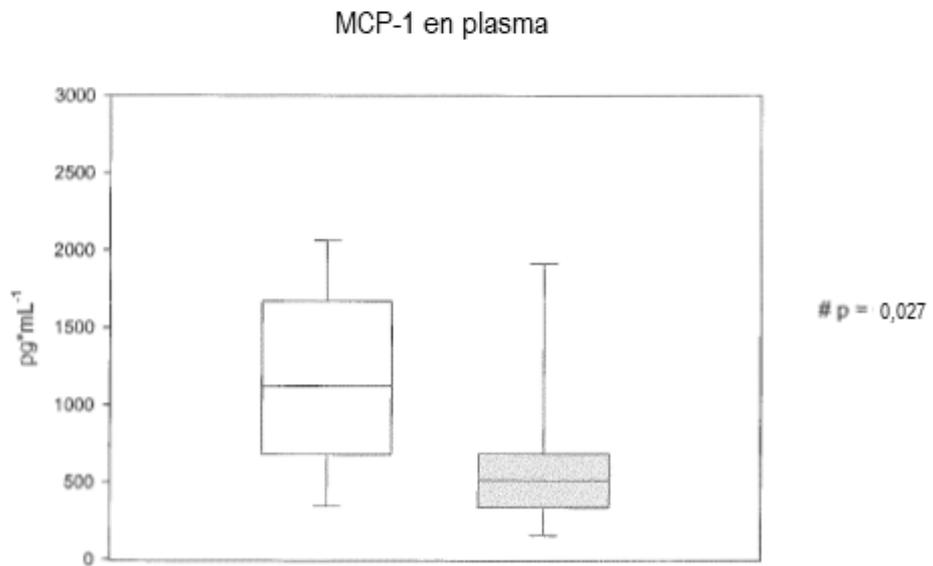


Fig. 21:

TNF- α en plasma

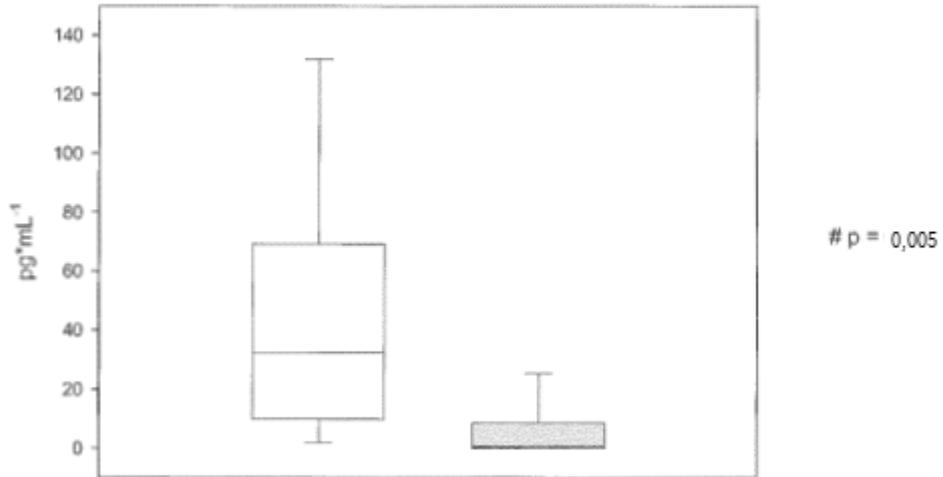


Fig. 22:

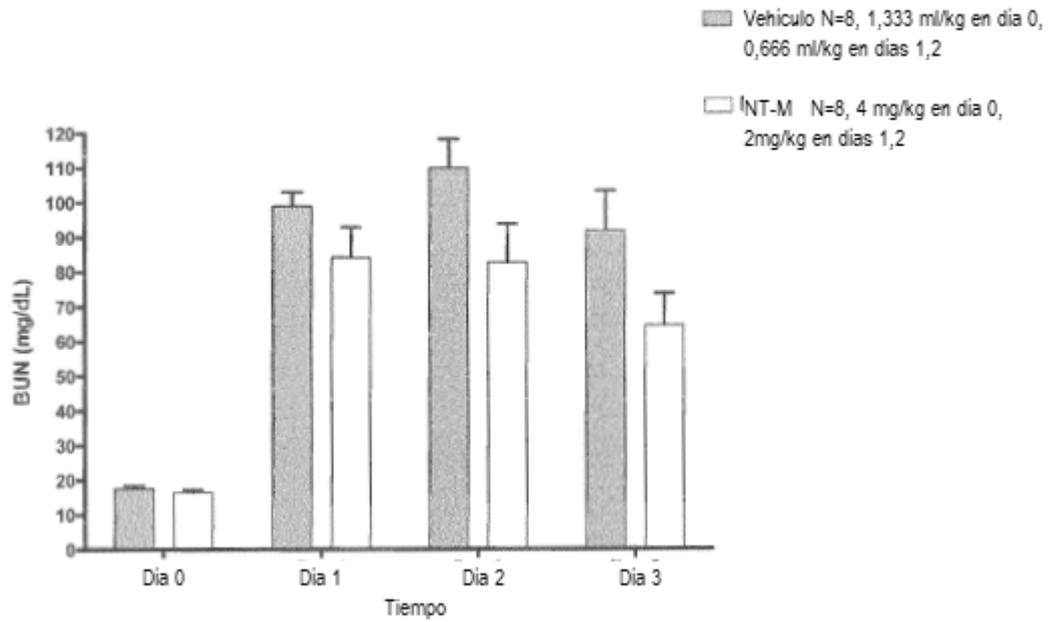


Fig. 23:

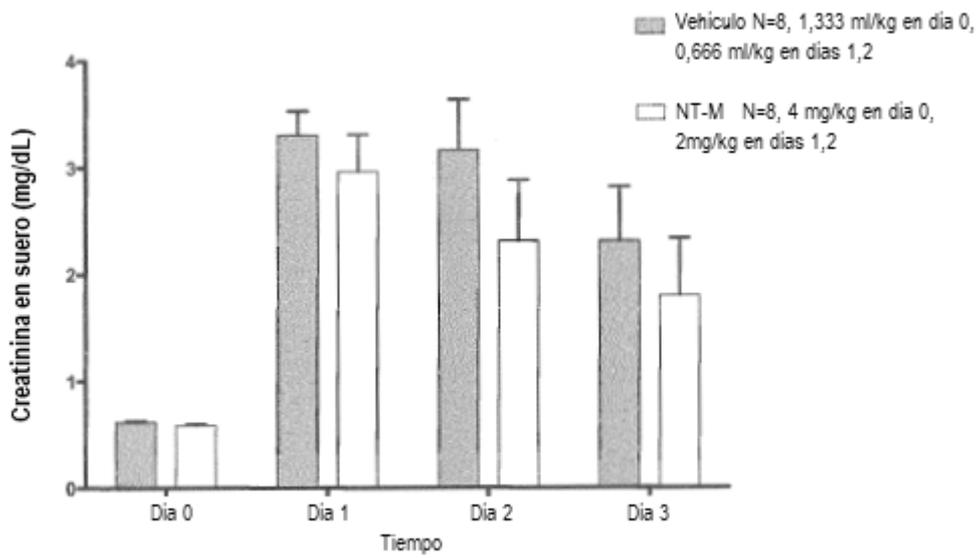


Fig. 24:

