



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **3 001 197**

⑮ Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2018** PCT/EP2018/075987

⑯ Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2019** WO19057992

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2018** E 18781997 (4)

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024** EP 3687567

⑮ Título: **Agente de unión anti-adrenomelulina (ADM) para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad**

⑯ Prioridad:

25.09.2017 EP 17192999
23.11.2017 EP 17203370

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2025

⑮ Titular/es:

ADRENOMED AG (100.00%)
Neuendorfstrasse 15a
16761 Hennigsdorf, DE

⑮ Inventor/es:

BERGMANN, ANDREAS

⑮ Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 001 197 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

Agente de unión anti-adrenomedulina (ADM) para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad

Descripción detallada

La materia objeto de la presente invención es un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad como se define adicionalmente en el presente documento. Los síntomas de enfermedad se seleccionan del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos en un sujeto en donde dicho anticuerpo o fragmento se une en particular a ADM de los aminoácidos 1 a 52 (SEQ ID NO: 1), o a fragmentos de la misma.

Antecedentes

10 Diversas enfermedades o dolencias pueden tener síntomas comunes, parcialmente no específicos que pueden variar de desagradables a insopportables para el individuo que las padece. Bastante a menudo, los individuos que experimentan más de un síntoma necesitan tomar varios fármacos para experimentar el alivio de estos síntomas. Existe una necesidad continua de nuevas formas de terapia o prevención de síntomas asociados con muchas enfermedades o dolencias subyacentes diferentes. En particular, sería útil proporcionar medicamentos o fármacos que puedan usarse en la terapia o prevención de más de un síntoma asociado con una enfermedad o dolencia subyacente. La presente invención aborda esta necesidad.

15 El péptido adrenomedulina (ADM) se describió por primera vez en 1993 (Kitamura K. *et al.* 1993. Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 192 (2): 553-560) como un nuevo péptido hipotensor que comprende 52 aminoácidos, que se había aislado de un feocromocitoma humano. En el mismo año, se describió también el ADNc que codifica un péptido precursor que comprende 185 aminoácidos y la secuencia de aminoácidos completa de este péptido precursor. El péptido precursor, que comprende, entre otros, una secuencia señal de 21 aminoácidos en el extremo N-terminal, se denomina "preproadrenomedulina" (pre-proADM). En la presente descripción, todas las posiciones de aminoácidos especificadas se refieren habitualmente a la pre-proADM que comprende los 185 aminoácidos. El péptido adrenomedulina (ADM) es un péptido que comprende 52 aminoácidos (SEQ ID NO: 1) y que comprende los aminoácidos 95 a 146 de pre-proADM, a partir de la cual se forma por escisión proteolítica. Hasta la fecha, solo unos pocos fragmentos de los fragmentos peptídicos formados en la escisión de la pre-proADM se han caracterizado más exactamente, 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 señal en la pre-proADM. El descubrimiento y caracterización de la ADM en 1993 desencadenó una actividad de investigación intensiva, cuyos resultados se han resumido en diversos artículos de revisión, en el contexto de la presente descripción, haciéndose referencia en particular a los artículos que van a encontrarse en un número de "Peptides" dedicado a ADM en particular (Editorial, Takahashi K. 2001. Peptides 22:1691) y (Eto T. 2001. Peptides 22: 1693-1711). Una revisión adicional es (Hinson *et al.* 2000. Endocrine Reviews 21(2):138-167). En las investigaciones científicas hasta la fecha, se ha encontrado, entre otras cosas, que la ADM puede considerarse como un péptido regulador polifuncional. Se libera en la circulación en una forma inactiva extendida por glicina (Kitamura K. *et al.* 1998. Biochem. Biophys. Res. Commun. 244(2):551-555). También hay una proteína de unión (Pio R. *et al.* 2001. The Journal of Biological Chemistry 276(15):12292-12300) que es específica para ADM y probablemente modula asimismo el efecto de ADM. Los efectos fisiológicos de ADM, así como de PAMP, que son de una importancia fundamental en las investigaciones hasta la fecha, fueron los efectos que influyen en la tensión arterial.

20 40 La ADM es un vasodilatador eficaz, y es posible asociar el efecto hipotensor con los segmentos peptídicos particulares en la parte C-terminal de la ADM. Además, se ha encontrado que el péptido PAMP adicional fisiológicamente activo mencionado anteriormente formado a partir de pre-proADM presenta asimismo un efecto hipotensor, incluso si parece tener un mecanismo de acción diferente del de ADM.

45 55 Además, se ha encontrado que las concentraciones de ADM, que pueden medirse en la circulación y otros líquidos biológicos, están, en varios estados patológicos, significativamente por encima de las concentraciones que van a encontrarse en personas sanas de control. Así, el nivel de ADM en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva, infarto de miocardio, enfermedades renales, trastornos hipertensivos, diabetes mellitus, en la fase aguda del choque y en septicemia y choque séptico aumenta significativamente, aunque en diferentes grados. Las concentraciones de PAMP también aumentan en algunos de dichos estados patológicos, pero los niveles plasmáticos son menores en relación con la ADM ((Eto, T., citado anteriormente). Además, se sabe que, en la septicemia, se observan concentraciones inusualmente altas de ADM, y las concentraciones más altas en el choque séptico (véase (Eto, T., citado anteriormente) y (Hirata *et al.* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1996, 81(4): 1449-1453; Ehlenz K. *et al.* 1997. Exp Clin Endocrinol Diabetes 105: 156-162); Tomoda Y. *et al.* 2001. Peptides 22: 1783-1794; Ueda S. *et al.* 1999. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 160: 132-136; y Wang P. Peptides 2001. 22: 1835-1840).

55 Sólo existe un conocimiento limitado sobre el papel de la adrenomedulina en la migraña. Como la adrenomedulina tiene efectos vasodilatadores dentro de la circulación cerebral, se plantea la hipótesis de que está implicada en la migraña. Por un lado, la administración de infusión intravenosa de ADM humana a pacientes que padecen migraña no indujo significativamente más cefalea o migraña en comparación con placebo (Petersen *et al.* 2008. Cephalgia 29:

23-30). Además, Akcali *et al.* notificaron bajos niveles plasmáticos de adrenomedulina en el curso natural de los pacientes con migraña (Akcali A. 2016. Medical Science and Discovery 3(4): 153-158). Por otra parte, Kis *et al.* han establecido que existe la necesidad de desarrollar antagonistas de receptores novedosos, potentes, específicos y posiblemente no peptídicos como posibles herramientas terapéuticas para la supresión de efectos proliferativos mediados por ADM como fármacos contra la migraña (Kis *et al.* 2003. Hypertens Res 26 (Supl): S61-S70). El documento EP2594587 A1 divulga anticuerpos antiadrenomedulina murinos y humanizados que reducen la mortalidad en un modelo de ratón de septicemia.

Definiciones

Antes de describir la invención en detalle, se considera conveniente proporcionar definiciones para ciertos términos técnicos usados a lo largo de la descripción. Aunque la presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares, esta descripción no debe interpretarse en un sentido limitativo. Antes de describir en detalle realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención, se dan definiciones importantes para entender la presente invención.

Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de "un" y "una" también incluyen los respectivos plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

En el contexto de la presente invención, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" denotan un intervalo de precisión que un experto en la técnica comprenderá que garantiza aún el efecto técnico de la característica en cuestión. El término indica normalmente una desviación del valor numérico indicado de $\pm 20\%$, preferiblemente $\pm 15\%$, más preferiblemente $\pm 10\%$, e incluso más preferiblemente $\pm 5\%$.

Debe entenderse que el término "que comprende" no es limitativo. Para los fines de la presente invención, el término "que consiste" en se considera que es una realización preferida del término "compuesto" por. Si a continuación en el presente documento se define que un grupo comprende al menos un cierto número de realizaciones, esto pretende abarcar también un grupo, que preferiblemente consiste solo en estas realizaciones.

También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Como se usa en el presente documento, el término "náuseas" se refiere a una sensación de malestar e incomodidad en la parte superior del estómago con una urgencia involuntaria de vomitar (Metz A. 2017. Australian Family Physician Vol. 36 (9): 688-692). Pueden preceder a los vómitos, pero una persona puede tener náuseas sin vómitos. Cuando se prolonga, es un síntoma debilitante. Las náuseas son un síntoma no específico, lo que significa que tiene muchas causas posibles. Algunas causas comunes de náuseas son cinetosis, mareo, migraña, desmayos, bajo contenido de azúcar en sangre, gastroenteritis (infección estomacal) o intoxicación alimentaria. Las náuseas son un efecto secundario de muchos medicamentos, incluida la quimioterapia, o las náuseas del embarazo en el embarazo temprano. Las náuseas también pueden estar causadas por ansiedad, disgusto y depresión.

Como se usa en el presente documento, el término "cefalea" es el síntoma de dolor en cualquier lugar en la región de la cabeza o el cuello. Se produce en migrañas (dolores agudos o pulsátiles), cefaleas tensionales y cefaleas en racimo (Waldman *et al.* 2014. J. Yoga Phys Ther 2014, 4:1). También hay un mayor riesgo de depresión en aquellos con cefaleas graves. Las cefaleas pueden producirse como resultado de muchas afecciones, ya sean graves o no. Existen varios sistemas de clasificación diferentes para las cefaleas. Está bien reconocido que las causas de las cefaleas pueden incluir fatiga, privación del sueño, estrés, efectos de medicaciones, los efectos de drogas recreativas, infecciones víricas, ruidos fuertes, resfriados comunes, traumatismos craneales, ingestión rápida de un alimento o bebida muy fríos, y problemas dentales o sinusales.

Las cefaleas se clasifican en términos generales como "primarias" o "secundarias" (Oleson 2005. Functional Neurology 20(2): 61-68). Las cefaleas primarias son cefaleas benignas y recurrentes no causadas por problemas estructurales o patológicos subyacentes. Por ejemplo, la migraña es un tipo de cefalea primaria. Aunque las cefaleas primarias pueden causar dolor e incapacidad diarios significativos, no son peligrosas. Las cuatro categorías de cefaleas primarias son: migraña, cefalea tensional (TTH), cefalea en racimos y otrascefalalgias autónomas del trigémino, y otras cefaleas primarias.

Las cefaleas secundarias, que son de origen orgánico, metabólico o inducido por fármacos, están causadas por una enfermedad subyacente, como una infección, traumatismo craneal, trastornos vasculares, hemorragia cerebral o tumores. Las cefaleas secundarias pueden ser inocuas o peligrosas. Una migraña es un trastorno de cefalea primaria caracterizado por cefaleas recurrentes que son de moderadas a graves (para una revisión véase: Diener *et al.* 2012. Nat Rev Neurol. 8(3):162-71). Normalmente, las cefaleas afectan a la mitad de la cabeza, son de naturaleza pulsante y duran de dos a 72 horas. Los síntomas asociados pueden incluir náuseas, vómitos y sensibilidad a la luz, los sonidos y los olores. El dolor empeora generalmente por la actividad física. Hasta un tercio de las personas tienen un aura: normalmente un corto período de alteración visual, que señala que pronto se producirá la cefalea. Ocasionalmente, puede producirse un aura con poca o ninguna cefalea después de la misma.

Como se usan en el presente documento, los términos "dolores musculares" o "dolor muscular", también denominado

5 "mialgia", se refieren a un síntoma de muchas enfermedades y trastornos (para una revisión véase: Kyriakides *et al.* 2013. European Journal of Neurology 20: 997-1003). Las causas más comunes son el uso excesivo o estiramiento excesivo de un músculo o grupo de músculos. La mialgia sin antecedentes traumáticos se debe a menudo a infecciones víricas. Las mialgias a largo plazo pueden ser indicativas de una miopatía metabólica, algunas deficiencias nutricionales o síndrome de fatiga crónica.

10 Como se usa en el presente documento, el término "dolor de espalda" se refiere a sensaciones dolorosas en cualquier parte de la espalda. Los episodios de dolor de espalda pueden ser agudos, subagudos o crónicos dependiendo de la duración. El dolor puede caracterizarse como dolor sordo, dolor fulgurante o punzante, o sensación de quemazón. El dolor puede irradiar en los brazos y manos, así como en las piernas o pies, y puede incluir parestesia (hormigueo sin causa aparente), debilidad o entumecimiento en las piernas y los brazos. La clasificación anatómica del dolor de espalda sigue los segmentos de la columna vertebral: dolor de cuello (cervical), dolor de la espalda media (torácico), dolor de la espalda inferior (lumbar) o coccigodinia (dolor de los huesos de la cola o sacro) con el área de las vértebras lumbares más común para el dolor. El dolor puede originarse a partir de músculos, nervios, huesos, articulaciones u otras estructuras en la columna vertebral (espina dorsal), sin embargo, estructuras internas tales como la vesícula biliar y el páncreas también pueden provocar dolor referido en la espalda (Cohen *et al.* 2008. BMJ. 337:a2718).

15 Como se usa en el presente documento, el término "escalofríos" (también denominado "estremecimiento") es una función corporal en respuesta a hipotermia temprana o simplemente sensación de frío en animales de sangre caliente. Cuando la temperatura corporal central disminuye, se desencadena el reflejo de escalofríos para mantener la homeostasis. Los músculos esqueléticos comienzan a sacudirse en pequeños movimientos, creando calor al gastar energía. Los escalofríos también puede ser una respuesta a la fiebre, ya que una persona puede sentir frío. Durante la fiebre, el punto de ajuste hipotalámico para la temperatura aumenta. El punto de ajuste aumentado provoca que la temperatura corporal aumente (pirexia), pero también hace que el paciente sienta frío hasta que se alcanza el nuevo punto de ajuste. Los temblores intensos con escalofríos violentos se denominan rigores. Los rigores se producen porque el cuerpo del paciente está experimentando escalofríos en un intento fisiológico de aumentar la temperatura corporal hasta el nuevo punto de ajuste. Los escalofríos también puede aparecer después de una cirugía, conocidos como escalofríos posanestésicos.

20 Como se usa en el presente documento, el término "vómitos", también conocido como emesis y vomitar, entre otros términos, es la expulsión involuntaria y forzosa del contenido del estómago a través de la boca y, a veces, de la nariz (Metz A. 2017. Australian Family Physician Vol. 36 (9): 688-692). Los vómitos pueden estar causados por una amplia variedad de afecciones; pueden presentarse como una respuesta específica a dolencias como gastritis o envenenamiento, o como una secuela no específica de trastornos que varían de tumores cerebrales y presión intracranal elevada a sobreexposición a radiación ionizante.

25 Como se usa en el presente documento, los síntomas de dolencias o enfermedades en un paciente que necesita terapia y/o prevención de tales síntomas se seleccionan de los grupos de indicaciones de enfermedad que comprenden afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades metabólicas, enfermedades cerebrales, enfermedades cardiovasculares y enfermedades inducidas por fármacos.

30 A continuación, los tipos de síntomas y enfermedades asociadas con el presente documento se proporcionan en forma de listas no limitativas. Se observa que la terapia o prevención descrita en el presente documento puede dirigirse a más de un tipo de síntoma. Además, se observa que una indicación médica, afección o enfermedad dada puede estar asociada con más de uno de los síntomas.

35 El síntoma "náuseas" puede estar asociado con enfermedades dentro del abdomen, por ejemplo trastornos obstrutivos (por ejemplo obstrucción pilórica, obstrucción del intestino delgado, obstrucción colónica, síndrome de la arteria mesentérica superior), infecciones entéricas (por ejemplo infección vírica o bacteriana), enfermedades inflamatorias (tales como colecistitis, pancreatitis, apendicitis, hepatitis), disfunción sensoriomotora (por ejemplo, gastroparesia, pseudoobstrucción intestinal, enfermedad por reflujo gastroesofágico, náuseas idiopáticas crónicas, vómitos funcionales, síndrome de vómitos cílicos, síndrome de rumiación) o cólico biliar; enfermedades fuera del abdomen, por ejemplo, trastorno cardiopulmonar (tales como miocardiopatía, infarto de miocardio), enfermedades del oído interno (tales como cinetosis, laberintitis, tumores malignos), trastornos intracerebrales (por ejemplo hemorragia, abscesos, hidrocefalia, tumores malignos), enfermedades psiquiátricas (por ejemplo anorexia y bulimia nerviosa, depresión), vómitos posoperatorios, náuseas asociadas con medicamentos y fármacos (por ejemplo quimioterapia y terapia biológica, antibióticos, antiarrítmicos, digoxina, medicamentos hipoglucémicos orales, anticonceptivos orales), náuseas asociadas con enfermedades endocrinas/metabólicas (tales como embarazo, uremia, cetoadicosis, enfermedad tiroidea y paratiroidea, insuficiencia suprarrenal), náuseas debidas a intoxicación debido a insuficiencia hepática, alcoholismo, etc.

40 45 50 55 El síntoma "dolor de espalda" puede estar asociado con enfermedades debidas a inflamación, especialmente en la fase aguda, que normalmente dura de dos semanas a tres meses, y puede estar asociado con lumbago, traumatismo, lesión, infecciones, cáncer (especialmente cánceres conocidos por diseminarse a la columna vertebral como cáncer de mama, pulmón y próstata), etc.

55 El síntoma "mialgia" o "dolor muscular" puede estar asociado con lesión o traumatismo, incluidos esguinces, hematoma

o sobreuso, en donde se usó demasiado un músculo, con demasiada frecuencia, incluido protección de una lesión separada, tensión crónica, dolor muscular debido a rabdomiólisis, asociado con, por ejemplo, infecciones víricas, lesión por compresión, relacionado con fármacos, por ejemplo, debido a fibratos y estatinas, inhibidores de ACE, cocaína, algunos fármacos antirretrovirales, deficiencia de potasio grave, fibromialgia, síndrome de Ehlers-Danlos, trastornos 5 autoinmunitarios (incluidos, por ejemplo, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, lupus eritematoso sistémico, polimialgia reumática, miositis, tal como polimiositis, dermatomiositis y miositis por cuerpos de inclusión, esclerosis múltiple, encefalomielitis miálgica (síndrome de fatiga crónica), fiebre mediterránea familiar, poliarteritis nudosa, enfermedad de Devic, morfea, sarcoidosis), enfermedades metabólicas (tales como deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa II, síndrome de Conn, insuficiencia suprarrenal, hipertiroidismo, hipotiroidismo, diabetes, 10 hipogonadismo, así como canalopatía, síndrome de Stickler, hipopotasemia, hipotonía (tono muscular bajo), intolerancia al ejercicio, mastocitosis, neuropatía periférica, síndrome de eosinofilia-mialgia, fiebre de Barcoo, herpes, hemocromatosis también conocida como trastorno de sobrecarga de hierro, dolor muscular de inicio retardado, SIDA, infecciones por VIH, osteomalacia inducida por tumor, hipovitaminosis D, infarto de miocardio.

15 El síntoma "cefalea" puede estar asociado con cefaleas primarias. El 90 % de todas las cefaleas son cefaleas primarias. Las cefaleas primarias comienzan habitualmente por primera vez cuando las personas tienen entre 20 y 40 años de edad. Los tipos más comunes de cefaleas primarias son migrañas y cefaleas tensionales. Tienen diferentes características. Las migrañas normalmente presentan dolor de cabeza pulsante, náuseas, fotofobia (sensibilidad a la luz) y fonofobia (sensibilidad al sonido).

20 Las cefaleas tensionales normalmente presentan presión "similar a una banda" no pulsante en ambos lados de la cabeza, no acompañada por otros síntomas. Otros tipos muy raros de cefaleas primarias incluyen: cefaleas en racimo: episodios cortos (15-180 minutos) de dolor intenso, habitualmente alrededor de un ojo, con síntomas autónomos (desgarro, ojo rojo, congestión nasal) que ocurren a la misma hora cada día. Las cefaleas en racimo pueden tratarse con triptanos y prevenirse con prednisona, ergotamina o litio; neuralgia trigeminal o neuralgia occipital caracterizada por dolor de la cara fulgurante, hemicrania continua, es decir, dolor unilateral continuo con episodios de dolor intenso; 25 cefaleas punzantes primarias, por ejemplo, episodios recurrentes de "dolor punzante" o "golpes y sacudidas" durante de 1 segundo a varios minutos sin síntomas autónomos (desgarro, ojo rojo, congestión nasal); cefalea por tors primaria que comienza repentinamente y dura varios minutos después de toser, estornudar o hacer esfuerzos (cualquier cosa que pueda aumentar la presión en la cabeza). Deben descartarse causas graves (véase la sección de señales de alerta de cefaleas secundarias) antes de que pueda realizarse un diagnóstico de cefalea por tors primaria "benigna"; 30 cefalea por esfuerzo primaria caracterizada por dolor pulsante, pulsátil que comienza durante o después del ejercicio, que dura de 5 minutos a 24 horas. El mecanismo detrás de estas cefaleas no está claro, posiblemente debido a esfuerzos que provocan que las venas de la cabeza se dilaten, provocando dolor; cefalea sexual primaria caracterizada por una cefalea sorda bilateral que comienza durante la actividad sexual y empeora mucho durante el orgasmo; cefalea hípica; cefaleas secundarias que pueden estar provocadas por problemas en cualquier otro lugar de la cabeza o el cuello. Algunas de estas no son nocivas, tales como cefalea cervicogénica (dolor que surge de los músculos del cuello), cefalea por sobreuso de medicamentos en aquellos que usan excesivos analgésicos para las cefaleas, 35 meningitis caracterizada por inflamación de las meninges que se presenta con fiebre y meningismo, o cuello rígido; sangrado dentro del cerebro (hemorragia intracraneal); hemorragia subaracnoidea (cefalea aguda, grave, cuello rígido sin fiebre); aneurisma roto, malformación arteriovenosa, hemorragia intraparenquimal; arteritis temporal, es decir, una enfermedad inflamatoria de arterias comunes en ancianos (edad promedio 70), polimialgia reumática; glaucoma agudo de ángulo cerrado (presión aumentada en el globo ocular); cefaleas posictales que se producen después de una convulsión u otro tipo de ataques, como parte del período después del ataque (el estado posictal); los trastornos gastrointestinales pueden causar cefaleas, incluyendo infección por *Helicobacter pylori*, enfermedad celíaca, sensibilidad al gluten no celíaca, síndrome del intestino irritable, enfermedad inflamatoria del intestino, gastroparesia y trastornos hepatobiliarias. El tratamiento de los trastornos gastrointestinales puede conducir a una remisión o mejora de las cefaleas.

40 El término cefalea se define como cefalea primaria o secundaria. La cefalea primaria se define como migraña, cefalea tensional (TTH), cefalea en racimos y otras cefalalñas autónomas del trigémino, y otras cefaleas primarias.

45 El diagnóstico o la evaluación de la cefalea está bien establecido en la técnica. La evaluación puede realizarse basándose en medidas subjetivas, tales como la caracterización de los síntomas por parte del paciente. Por ejemplo, la migraña puede diagnosticarse basándose en los siguientes criterios: 1) ataques episódicos de cefalea que duran de 4 a 72 horas; 2) con dos de los siguientes síntomas: dolor unilateral, pulsante, agravamiento con el movimiento y dolor de intensidad moderada o grave; y 3) uno de los siguientes síntomas: náuseas o vómitos y fotofobia o fonofobia (Goadsby *et al.*, N. Engl. J. Med. 346: 257-270, 2002).

55 El síntoma "escalofríos" puede estar asociado con fiebre, sensibilidad al frío, menopausia, ataque de pánico, ansiedad, infección bacteriana, infección rickettsial, infección vírica, abstinencia de fármacos, etc.

60 El síntoma "vómitos" puede estar asociado con gastritis (inflamación de la pared gástrica), gastroenteritis, enfermedad por reflujo gastroesofágico, enfermedad celíaca, sensibilidad al gluten no celíaca, estenosis pilórica, obstrucción intestinal, sobreingesta, abdomen agudo y/o peritonitis, íleo, alergias alimentarias (a menudo junto con urticaria o hinchazón); colecistitis, pancreatitis, apendicitis, hepatitis; intoxicación alimentaria, reacción alérgica a proteínas de la leche de vaca, por ejemplo, alergia a la leche o intolerancia a la lactosa; cinetosis, enfermedad de Ménière, conmoción

cerebral, hemorragia cerebral, migraña, tumores cerebrales, hipertensión intracraneal benigna e hidrocefalia, alteraciones metabólicas tales como hipercalcemia, insuficiencia urémica suprarrenal, hipoglucemia, hiperglucemia, reacción a fármacos, intoxicación por alcohol, captación de opioides, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina; uso de fármacos quimioterápicos; inflamación gástrica provocada por una variedad de virus y bacterias, por ejemplo, norovirus, influenza; o enfermedades psiquiátricas/conductuales tales como bulimia nerviosa y trastorno de purga.

Descripción detallada de realizaciones de la invención

A continuación, se proporcionan realizaciones de la invención. Se observa que, en general, las realizaciones pueden combinarse con cualquier otra realización de la misma categoría (producto, proceso, uso, método).

- 10 La materia objeto de la presente invención es un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad en un sujeto que lo necesita, en donde el sujeto es humano, y
- en donde los síntomas de enfermedad se seleccionan del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda y/o escalofríos,
- 15 en donde la enfermedad se caracteriza por una cantidad de proteína C reactiva (CRP) en una muestra que es ≥ 10 mg/l, y/o en donde la cantidad de TNF en una muestra es ≥ 50 pg/ml, y/o en donde la cantidad de bio-ADM en una muestra es ≥ 43 pg/ml, y en donde dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, plasma, suero, y
- en donde dicho anticuerpo o fragmento es un anticuerpo monoclonal humanizado o fragmento que se une a ADM o un fragmento de la misma,
- 20 20 en donde la cadena pesada comprende las secuencias:
- CDR1: SEQ ID NO: 5
GYTFSRYW
- CDR2: SEQ ID NO: 6
ILPGSGST
- 25 25 CDR3: SEQ ID NO: 7
TEGYEYDGFDY
- y en donde la cadena ligera comprende las secuencias:
- CDR1: SEQ ID NO: 8
QSIVYSNGNTY
- 30 30 CDR2:
RVS
- CDR3: SEQ ID NO: 9
FQGSHIPYT.
- 35 35 El anticuerpo o fragmento se une a ADM madura, por ejemplo, a ADM de los aminoácidos 1 a 52 (SEQ ID NO 1), en particular a ADM N-terminal (SEQ ID NO 4), como se detalla a continuación.
- En una realización adicional, la enfermedad es migraña.
- La muestra se selecciona del grupo que comprende sangre completa, plasma y suero.
- 40 40 La tensión arterial media (MAP) se define como la presión promedio en las arterias de un paciente durante un ciclo cardíaco. Se considera como indicador de perfusión a órganos vitales. Se cree que una MAP que es mayor de 70 mmHg es suficiente para sustentar los órganos de la persona promedio. En el contexto de la presente invención, el término "la tensión arterial media disminuye" significa una MAP por debajo de 75 mmHg.
- 45 45 El péptido de adrenomedulina maduro es un péptido amidado (ADM-NH₂), que comprende 52 aminoácidos (SEQ ID NO 1) y que comprende los aminoácidos 95 a 146 de pre-proADM 1-146, a partir de los cuales se forma por escisión proteolítica. ADM madura, bio-ADM y ADM-NH₂ se usan como sinónimos en toda esta solicitud y es una molécula según SEQ ID No.: 1.

La parte N-terminal (aa 1-21) de ADM tiene la secuencia

YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC (SEQ ID No. 4).

Otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM como se define en el presente documento para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos, en un sujeto que lo necesita según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o fragmento presenta una afinidad de unión a ADM de al menos 10^{-7} M mediante resonancia de plasmón superficial libre de marcador usando un sistema Biacore 2000.

5 El anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM como se define en el presente documento para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos en un sujeto que lo necesita según cualquiera de las realizaciones anteriores, no es la proteína-1 de unión a ADM (factor H del complemento).

10 Otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM como se define en el presente documento para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos en un sujeto que lo necesita según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o fragmento reconoce y se une al extremo N-15 terminal (aa1) de ADM.

15 Otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM como se define en el presente documento para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos en un sujeto que lo necesita según 20 cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o fragmento es un anticuerpo o fragmento estabilizador de ADM que potencia la semivida (mitad del tiempo de retención $t_{1/2}$) de ADM en suero, sangre, plasma al menos un 10 %, preferiblemente al menos un 50 %, más preferiblemente > 50 %, lo más preferiblemente > 100 %.

25 Otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM como se define en el presente documento para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos en un sujeto que lo necesita según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o fragmento bloquea la bioactividad de ADM no más del 80 %, preferiblemente no más del 50 % usando hADM 22-52 como antagonista de referencia en células CHO-K1 que expresan receptor de ADM recombinante humano.

30 Otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM como se define en el presente documento para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde dicho sujeto que lo necesita se selecciona del grupo de sujetos que padecen una enfermedad 35 seleccionada del grupo que comprende migraña, infecciones víricas, síntomas de enfermedad inducidos por fármacos (por ejemplo, inducidos por quimioterapia o inducidos por tratamiento con productos biológicos, antibióticos, compuestos antivirales, etc.). En una realización particular, la enfermedad o dolencia (estos términos pueden usarse indistintamente) es migraña.

40 Otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM como se define en el presente documento para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos en un sujeto según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde dichos sujetos se someten a terapia contra el cáncer (quimioterapia).

45 La quimioterapia es una categoría de tratamiento del cáncer que usa uno o más fármacos antineoplásicos (agentes quimioterápicos) como parte de un régimen de quimioterapia estandarizado. Los fármacos quimioterápicos pueden incluir las siguientes categorías de fármacos: agentes alquilantes, inhibidores de quinasa, alcaloides de la vinca, antraciclinas, antimetabolitos, inhibidores de aromatasa, inhibidores de topoisomerasa, agentes antineoplásicos modificados por ingeniería genética tales como anticuerpos monoclonales, citocinas, vectores de terapia génica, moléculas antisentido y peptídicas.

50 El anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos en un sujeto según cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo monoclonal humanizado o fragmento que se une a la región N-terminal (aa 1-21) de ADM (SEQ ID No. 4) o un fragmento de anticuerpo del mismo en donde la cadena pesada comprende las secuencias:

CDR1: SEQ ID NO: 5

GYTFSRYW

CDR2: SEQ ID NO: 6

ILPGSGST

CDR3: SEQ ID NO: 7

TEGYEYDGFDY

y en donde la cadena ligera comprende las secuencias:

5 CDR1: SEQ ID NO: 8

QSIVYSNGNTY

CDR2:

RVS

CDR3: SEQ ID NO: 9

10 FQGSHIPYT.

Otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal humanizado o fragmento que se une a ADM o un fragmento de anticuerpo del mismo tal como se define en el presente documento para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos en un sujeto según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o fragmento comprende una secuencia seleccionada del grupo que comprende como región VH:

15 SEQ ID NO: 10 (AM-VH-C)

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSRYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILP
GSGSTNYNEKFKGKATITADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGFD
YWGQGTTLVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSN
SGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR
VEPKHHHHHH

SEQ ID NO: 11 (AM-VH1)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGRIL
PGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFD
YWGQGTTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSN
SGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR
VEPKHHHHHH

20 SEQ ID NO: 12 (AM-VH2-E40)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGRIL
PGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFD
YWGQGTTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSN
SGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR
VEPKHHHHHH

SEQ ID NO: 13 (AM-VH3-T26-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGEIL
PGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFD
YWGQQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAIGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAPVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR
VEPKHHHHHH

SEQ ID NO: 14 (AM-VH4-T26-E40-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEIL
PGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFD
YWGQQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAIGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAPVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR
VEPKHHHHHH

5 y comprende la siguiente secuencia como región VL:

SEQ ID NO: 15 (AM-VL-C)

DVLLSQTPLSLPVSLGDQATISCRSSQSIVYNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYR
VSNRFSGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHIPYTFGGGTKE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

SEQ ID NO: 16 (AM-VL1)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYNGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYR
VSNRDSGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGGGTKE
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
EC

10 SEQ ID NO: 17 (AM-VL2-E40)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYNGNTYLEWLFQQRPGQSPRRLIYR
VSNRDSGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGGGTKE
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
EC

15 También se divulga un anticuerpo monoclonal humanizado o fragmento que se une a ADM o un fragmento de anticuerpo del mismo como se define en el presente documento para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos en un sujeto según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o fragmento comprende la siguiente secuencia como cadena pesada:

SEQ ID NO: 22

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWIGEIL
 PGSGSTNYNQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGF
 DYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFScSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

y comprende la siguiente secuencia como cadena ligera:

SEQ ID NO: 23

DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLEWYLQRPGQSPRLLIY
 RVSNRFGVPDRFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGGT
 KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
 5 FNRGEC

El anticuerpo comprende la siguiente secuencia como cadena pesada:

SEQ ID NO: 22

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWIGEILP
 GSGSTNYNQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGF
 YWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSN
 SGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
 KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
 SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 o una secuencia que es > 95 % idéntica a ella, preferiblemente > 98 %, preferiblemente > 99 %, y que comprende la siguiente secuencia como cadena ligera:

SEQ ID NO: 23

DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLEWYLQRPGQSPRLLIYR
 VSNRFGVPDRFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGGT
 IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
 C

o una secuencia que es > 95 % idéntica a ella, preferiblemente > 98 %, preferiblemente > 99 %.

Para evaluar la identidad entre dos secuencias de aminoácidos, se realiza un alineamiento por parejas. La identidad define el porcentaje de aminoácidos con una coincidencia directa en el alineamiento.

Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según lo indicado anteriormente.

5 Otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM como se define en el presente documento para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos en un sujeto que lo necesita según cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en combinación con medicamentos conocidos contra las náuseas.

10 Otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM como se define en el presente documento para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos en un sujeto que lo necesita según cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en combinación con medicamentos conocidos contra la cefalea.

15 Otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM como se define en el presente documento para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos en un sujeto que lo necesita según cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en combinación con medicamentos conocidos contra la mialgia.

20 Otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM como se define en el presente documento para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos en un sujeto que lo necesita según cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en combinación con medicamentos conocidos contra los escalofríos.

25 Otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM como se define en el presente documento para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos en un sujeto que lo necesita según cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en combinación con medicamentos conocidos contra los vómitos.

30 Otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM como se define en el presente documento para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos en un sujeto que lo necesita según cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en combinación con medicamentos conocidos contra el dolor de espalda.

35 Otra realización de la invención se refiere a una formulación farmacéutica para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos como se define en el presente documento en un sujeto que lo necesita que comprende un anticuerpo o fragmento según cualquiera de las realizaciones anteriores.

40 Otra realización de la invención se refiere a una formulación farmacéutica para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos como se define en el presente documento en un sujeto según la realización anterior, en donde dicha formulación farmacéutica es una solución; preferiblemente una solución lista para su uso.

45 Otra realización de la invención se refiere a una formulación farmacéutica para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos como se define en el presente documento en un sujeto según la realización anterior, en donde dicha formulación farmacéutica está en un estado liofilizado.

50 Otra realización de la invención se refiere a una formulación farmacéutica para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos como se define en el presente documento en un sujeto que lo necesita según cualquiera de las realizaciones anteriores relacionadas con tales formulaciones, en donde dicha formulación farmacéutica se administra por vía intramuscular.

55 Otra realización de la invención se refiere a una formulación farmacéutica para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos como se define en el presente documento en un sujeto que lo necesita según cualquiera de las realizaciones anteriores relacionadas con tales formulaciones, en donde dicha formulación farmacéutica se administra por vía intravascular.

Otra realización de la invención se refiere a una formulación farmacéutica para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos como se define en el presente documento en un sujeto según la realización anterior, en donde dicha formulación farmacéutica se administra por medio de infusión.

Otra realización de la invención se refiere a una formulación farmacéutica para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad seleccionados del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos como se define en el presente documento en un sujeto según cualquiera de las realizaciones anteriores relacionadas con tales formulaciones, en donde dicha formulación farmacéutica se administra de manera sistémica.

5 Como se usa en el presente documento, la definición de la "puntuación de enfermedad" se refiere a síntomas clínicos inducidos por LPS que incluyen náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda, escalofríos y vómitos. Esos síntomas se combinaron en una puntuación (= puntuación de enfermedad): como ejemplo, cada síntoma en una escala de 0 a 5, excepto los vómitos (0 o 3, dependiendo de haber vomitado en los 30 minutos anteriores). La puntuación de la enfermedad es una suma de todos los síntomas (intervalos teóricos de 0 a 28).

10 Debe enfatizarse que las realizaciones descritas en el presente documento relacionadas con el anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM pretenden aplicarse en aras de la terapia o prevención de síntomas asociados con enfermedades, y por lo tanto no están necesariamente destinadas a ningún método de tratamiento primario o tratamiento de primera línea para la enfermedad aguda o afección aguda en sí misma que debe considerarse como enfermedad(es) subyacente(s). Esto significa que la presente invención no proporciona una terapia de alivio/curación, por ejemplo, cáncer, septicemia, choque séptico, EPOC, cardiopatía congestiva (insuficiencia cardíaca aguda).

15 Además, el anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM es monoespecífico. Anticuerpo anti-ADM monoespecífico o fragmento de anticuerpo anti-ADM monoespecífico significa en particular que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a una región específica que abarca al menos 5 aminoácidos dentro de la ADM diana. El anticuerpo anti-ADM monoespecífico o fragmento de anticuerpo anti-ADM monoespecífico son anticuerpos anti-ADM o fragmentos de anticuerpo anti-ADM que tienen todos afinidad por el mismo antígeno.

20 25 El anticuerpo anti-ADM monoespecífico o fragmento de anticuerpo anti-ADM monoespecífico se une en particular a una región específica que abarca al menos 4 aminoácidos dentro de la ADM diana. Monoespecífico significa en particular 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 la ADM diana. Los anticuerpos o fragmentos monoespecíficos son anticuerpos o fragmentos que tienen afinidad por el mismo antígeno. Los anticuerpos monocionales son monoespecíficos, pero también pueden producirse anticuerpos monoespecíficos por otros medios que producirlos a partir de una célula germinal común.

30 35 Un anticuerpo según la presente invención es una proteína que incluye uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina que se unen específicamente a un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de regiones constantes kappa, lambda, alfa (IgA), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta (IgD), epsilon (IgE) y mu (IgM), así como la mirada de genes de regiones variables de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras de inmunoglobulina de longitud completa tienen en general aproximadamente 25 kDa o 214 aminoácidos de longitud. Las cadenas pesadas de inmunoglobulina de longitud completa tienen en general aproximadamente 50 kDa o 446 aminoácidos de longitud. Las cadenas ligeras están codificadas por un gen de región variable en el extremo NH₂-terminal (aproximadamente 110 aminoácidos de longitud) y un gen de región constante kappa o lambda en el extremo COOH-terminal. Las cadenas pesadas están codificadas de manera similar por un gen de región variable (de aproximadamente 116 aminoácidos de longitud) y uno de los otros genes de región constante.

40 45 50 La unidad estructural básica de un anticuerpo es generalmente un tetrámero que consiste en dos pares idénticos de cadenas de inmunoglobulina, teniendo cada par una cadena ligera y una pesada. En cada par, las regiones variables de cadena ligera y pesada se unen a un antígeno, y las regiones constantes median funciones efectoras. Las inmunoglobulinas también existen en una variedad de otras formas que incluyen, por ejemplo, Fv, Fab y (Fab')2, así como anticuerpos híbridos bifuncionales y cadenas sencillas (por ejemplo, Lanzavecchia *et al.* 1987. Eur. J. Immunol. 17: 105; Huston *et al.*, 1988. PNAS 85:5879-5883; Bird *et al.* 1988. Science 242: 423-426; Hood *et al.* 1984. Immunology, Benjamin, N. Y., 2^a, ed.; Hunkapiller y Hood, 1986. Nature 323:15-16). Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina incluye una región marco interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR) (véase, Sequences of Proteins of Immunological Interest, E. Kabat *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, 1983). Como se ha indicado anteriormente, las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítopo de un antígeno. Un complejo inmunitario es un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal, anticuerpo químérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano, o fragmento de anticuerpo funcional, unido específicamente al antígeno.

55 60 Los anticuerpos químéricos son anticuerpos cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, normalmente por ingeniería genética, a partir de genes de región variable y constante de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos, tales como kappa y gamma 1 o gamma 3. En un ejemplo, un anticuerpo químérico terapéutico es por tanto una proteína híbrida compuesta por el dominio variable o de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio constante o efector de un anticuerpo humano, aunque pueden usarse otras especies de mamífero, o la región variable puede producirse mediante técnicas moleculares. Se conocen bien en la técnica métodos para preparar anticuerpos químéricos, por ejemplo, véase la patente de EE. UU. n.º 5,807,715. Una inmunoglobulina "humanizada" es una inmunoglobulina que incluye un marco humano 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 "donador" y la inmunoglobulina humana que proporciona la región marco se denomina "aceptor". En una realización, todas las CDR son de la inmunoglobulina donadora en una inmunoglobulina humanizada. No es necesario que estén presentes regiones constantes, pero si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente el 85-90 %, tal como aproximadamente el 95 % o más idénticas. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de secuencias de inmunoglobulina humana natural. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una cadena ligera humanizada y una inmunoglobulina de cadena pesada humanizada. Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno que el anticuerpo donador que proporciona las CDR. El marco aceptor de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado 5 puede tener un número limitado de sustituciones por aminoácidos tomados del marco donador. Los anticuerpos humanizados u otros anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones conservadoras de aminoácidos adicionales, que sustancialmente no tienen 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; 10 ser, thr; lys, arg; y phe, tyr. Pueden construirse inmunoglobulinas humanizadas por medio de ingeniería genética (por ejemplo, véase la patente de EE. UU. núm. 5,585,089). Un anticuerpo humano es un anticuerpo en donde los genes de las cadenas ligera y pesada son de origen humano. Los anticuerpos humanos pueden generarse usando métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos humanos pueden producirse inmortalizando una célula B humana que secreta el anticuerpo de interés. La inmortalización puede conseguirse, por ejemplo, mediante infección por EBV o fusionando una célula B humana con una célula de mieloma o hibridoma para producir una célula de trioma. Los anticuerpos 15 humanos también pueden producirse mediante métodos de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Dower *et al.*, publicación PCT núm. WO 91/17271; McCafferty *et al.*; publicación PCT núm. WO92/001047; y Winter, publicación PCT núm. WO 92/20791), o seleccionarse de una biblioteca combinatoria humana de anticuerpos monoclonales (véase el sitio web de Morphosys). Los anticuerpos humanos también pueden prepararse usando animales 20 transgénicos que llevan un gen de inmunoglobulina humana (por ejemplo, véase la publicación PCT núm. WO 93/12227; y la publicación PCT núm. WO 91/10741).

En una realización preferida, los anticuerpos según la presente invención son anticuerpos producidos de manera recombinante como, por ejemplo, IgG, una inmunoglobulina de longitud completa típica, o fragmentos de anticuerpo que contienen al menos el dominio variable F de la cadena pesada y/o ligera como, por ejemplo, anticuerpos acoplados químicamente (unión a antígeno de fragmento) que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab que incluyen minicuerpos Fab, anticuerpo Fab de cadena sencilla, anticuerpo Fab monovalente con etiquetas de epítopo, por ejemplo, Fab-V5Sx2; Fab bivalente (minianticuerpo) dimerizado con el dominio CH3; Fab bivalente o Fab multivalente, 30 por ejemplo, formado por medio de multimerización con la ayuda de un dominio heterólogo, por ejemplo, por medio de dimerización de dominios dHLX, por ejemplo, Fab-dHLX-FSx2; fragmentos F(ab')2, fragmentos scFv, fragmentos scFv multimerizados multivalentes y/o multiespecíficos, diacuerpos bivalentes y/o biespecíficos, BITE® (acoplador de células T biespecífico), anticuerpos trifuncionales, anticuerpos polivalentes, por ejemplo, de una clase diferente a G; 35 anticuerpos de dominio único, por ejemplo, nanocuerpos derivados de inmunoglobulinas de camélidos o peces y muchos otros.

Un fragmento de anticuerpo según la presente invención es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo según la presente invención.

40 En una realización preferida, el formato de anticuerpo frente a ADM se selecciona del grupo que comprende fragmento Fv, fragmento scFv, fragmento Fab, fragmento scFab, fragmento (Fab)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 conjugados de los mismos optimizados para la biodisponibilidad, tales como fragmentos pegilados. Uno de los formatos más preferidos es el formato scFab.

45 Los anticuerpos pueden producirse tal como sigue: Se inmunió un ratón Balb/c con 100 µg de conjugado de péptido de ADM-BSA en los días 0 y 14 (emulsionado en 100 µl de adyuvante completo de Freund) y 50 µg en 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 del conjugado disuelto en 100 µl de solución salina, administrado como una inyección intraperitoneal y una intravenosa. Se fusionaron esplenocitos del ratón inmuniizado y células de la línea celular de mieloma SP2/0 con 50 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 mediante crecimiento en medio HAT (medio de cultivo RPMI 1640 complementado con suero de ternero fetal al 20 % y suplemento HAT). Después de dos semanas, el medio HAT se reemplaza con medio HT durante tres pases seguido de retorno al medio de cultivo celular normal. Los sobrenadantes del cultivo celular se cribaron en primer lugar para anticuerpos IgG específicos de antígeno tres 55 semanas después de la fusión. Los microcultivos positivos sometidos a prueba se transfirieron a placas de 24 pocillos para la propagación. Después de volver a someter a prueba, los cultivos seleccionados se clonaron y volvieron a clonarse usando la técnica de dilución limitante y se determinaron los isotipos (véase también Lane, R.D. 1985. J. Immunol. Meth. 81: 223-228; Ziegler B. *et al.* 1996. Horm. Metab. Res. 28: 11-15).

60 Los anticuerpos también pueden producirse por medio de presentación en fagos según el siguiente procedimiento: Las bibliotecas génicas de anticuerpos humanos sin tratamiento previo HAL7/8 se usaron para el aislamiento de dominios variables F de cadena sencilla recombinantes (scFv) contra el péptido de ADM. Las bibliotecas génicas de anticuerpos se examinaron con una estrategia de cribado que comprende el uso de péptidos que contienen una

etiqueta de biotina unida por medio de dos espaciadores diferentes a la secuencia peptídica de ADM. Se usó una mezcla de rondas de cribado usando antígeno unido no específicamente y antígeno unido a estreptavidina para minimizar el fondo de agentes de unión no específicos. Los fagos eluidos de la tercera ronda de cribado se han usado para la generación de cepas de *E. coli* que expresan scFv monoclonal. Los sobrenadantes del cultivo de estas cepas clonales se han usado directamente para un ensayo ELISA de antígeno (véanse las referencias citadas en el documento WO 2013/072513, incorporado en el presente documento en su totalidad).

La humanización de anticuerpos murinos puede realizarse según el siguiente procedimiento: Para la humanización de un anticuerpo de origen murino, la secuencia de anticuerpo se analiza para determinar la interacción estructural de regiones marco (FR) con las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y el antígeno. Basándose en el

modelado estructural, se selecciona una FR apropiada de origen humano y las secuencias de CDR murinas se trasplantan en la FR humana. Pueden introducirse variaciones en la secuencia de aminoácidos de las CDR o FR para recuperar interacciones estructurales, que se suprimieron por el cambio de especie para las secuencias de FR. Esta recuperación de interacciones estructurales puede lograrse mediante un enfoque aleatorio usando bibliotecas de presentación en fagos o por medio de un enfoque dirigido guiado por modelado molecular (Almagro y Fransson 2008.

Front Biosci. 13: 1619-33). En una realización preferida, el formato de anticuerpo frente a 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 conjugados de los mismos optimizados para la biodisponibilidad, tales como fragmentos pegilados. Uno de los formatos más preferidos es el formato scFab. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-ADM o fragmento de anticuerpo anti-ADM es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de longitud completa.

Según un ejemplo que no forma parte de la redacción literal de las reivindicaciones tal como se concedieron, el anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM o armazón distinto de Ig anti-ADM se dirige a y puede unirse a un epítopo de al menos 5 aminoácidos de longitud contenido en ADM.

Según un ejemplo adicional que no forma parte de la redacción literal de las reivindicaciones tal como se concedieron, el anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM o armazón distinto de Ig anti-ADM se dirige a y puede unirse a un epítopo de al menos 4 aminoácidos de longitud contenido en ADM.

Según un ejemplo que no forma parte de la redacción literal de las reivindicaciones tal como se concedieron, el anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM se une a una región de ADM que está localizada en la parte N-terminal (aminoácidos 1-21) de ADM.

Según un ejemplo adicional que no forma parte de la redacción literal de las reivindicaciones tal como se concedieron, dicho anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM reconoce y se une al extremo N-terminal (aa1) de ADM. Extremo N-terminal significa que el aminoácido 1, que es "Y" de la SEQ ID No. 1 o 4 es obligatorio para la unión del anticuerpo. Dicho anticuerpo o fragmento no se unirá a ADM extendida en el extremo N-terminal ni modificada en el extremo N-terminal ni a ADM degradada en el extremo N-terminal.

Según un ejemplo que no forma parte de la redacción literal de las reivindicaciones tal como se concedieron, el anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM se dirige a y puede unirse a un epítopo de al menos 5 aminoácidos de longitud contenido en ADM, preferiblemente en ADM humana.

Según un ejemplo que no forma parte de la redacción literal de las reivindicaciones tal como se concedieron, el anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM se dirige a y puede unirse a un epítopo de al menos 4 aminoácidos de longitud contenido en ADM, preferiblemente en ADM humana.

En una realización específica, se prefiere usar un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM según la presente invención, en donde dicho anticuerpo anti-ADM o dicho fragmento de anticuerpo anti-ADM es un anticuerpo estabilizador de ADM o un fragmento de anticuerpo estabilizador de ADM que potencia la semivida ($t_{1/2}$; mitad del tiempo de retención) de ADM en suero, sangre, plasma al menos un 10 %, preferiblemente al menos un 50 %, más preferiblemente >50 %, lo más preferiblemente >100 %. La semivida (mitad del tiempo de retención) de ADM puede determinarse en plasma humano en ausencia y presencia de un anticuerpo estabilizador de ADM o un fragmento de anticuerpo estabilizador de ADM, respectivamente, usando un inmunoensayo para la cuantificación de ADM.

Pueden realizarse las siguientes etapas:

- 50 - la ADM puede diluirse en plasma con citrato humano en ausencia y presencia de un anticuerpo estabilizador de ADM o un fragmento de anticuerpo estabilizador de ADM, respectivamente, y puede incubarse a 24 °C;
- se toman alícuotas en puntos de tiempo seleccionados (por ejemplo, en 24 horas) y la degradación de ADM puede detenerse en dichas alícuotas congelando a -20 °C;
- 55 - la cantidad de ADM puede determinarse mediante un inmunoensayo de hADM directamente, si el anticuerpo estabilizador no influye en el ensayo seleccionado. Alternativamente, la alícuota puede tratarse con agentes desnaturalizantes (como HCl) y, después de aclarar la muestra (por ejemplo, por centrifugación), el pH puede

neutralizarse y cuantificarse la ADM mediante un inmunoensayo de ADM. Alternativamente, pueden usarse tecnologías distintas de inmunoensayo (por ejemplo, RP-HPLC) para la cuantificación de ADM.

- La semivida de ADM se calcula para ADM incubada en ausencia y presencia de un anticuerpo estabilizador de ADM o un fragmento de anticuerpo estabilizador de ADM, respectivamente.

5 - La potenciación de la semivida se calcula para la ADM estabilizada en comparación con la ADM que se ha incubado en ausencia de un anticuerpo estabilizador de ADM o un fragmento de anticuerpo estabilizador de ADM.

Un aumento de dos veces de la semivida de ADM es una mejora de la semivida del 100 %. La semivida (mitad del tiempo de retención) se define como el periodo durante el cual la concentración de un producto químico o fármaco especificado disminuye hasta la mitad de la concentración basal en el fluido o sangre especificados.

10 Según un ejemplo que no forma parte de la redacción literal de las reivindicaciones tal como se concedieron, el anticuerpo anti-ADM o fragmento de anticuerpo anti-ADM es un anticuerpo o fragmento no neutralizante. Un anticuerpo anti-ADM o fragmento de anticuerpo anti-ADM neutralizante bloquearía la bioactividad de ADM hasta casi el 100 %, hasta al menos más del 90 %, preferiblemente hasta al menos más del 95 %.

15 Por el contrario, un anticuerpo anti-ADM, o fragmento de anticuerpo anti-ADM no neutralizante bloquea la bioactividad de ADM menos del 100 %, preferiblemente hasta menos del 95 %, preferiblemente hasta menos del 90 %, más preferido hasta menos del 80 % e incluso más preferido hasta menos del 50 %. Esto significa que la bioactividad residual de ADM unida al anticuerpo anti-ADM, o fragmento de anticuerpo anti-ADM no neutralizante sería de más del 0 %, preferiblemente más del 5 %, preferiblemente más del 10 %, más preferido más del 20 %, más preferido más del 50 %. En este contexto, (una(s)) molécula(s), siendo un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo con "actividad anti-ADM no neutralizante", denominados colectivamente en el presente documento por simplicidad anticuerpo anti-ADM o fragmento de anticuerpo "no neutralizante", que, por ejemplo, bloquea la bioactividad de ADM hasta menos del 80 %, se define(n) como una molécula o moléculas que se unen a ADM, que tras la adición a un cultivo de una línea celular eucariota, que expresa receptor de ADM recombinante humano funcional compuesto por CRLR (receptor similar al receptor de calcitonina) y RAMP3 (proteína modificadora de la actividad del receptor 3), reduce la cantidad de AMPc producida por la línea celular a través de la acción del péptido de ADM sintético humano añadido en paralelo, en donde dicha ADM sintética humana añadida se añade en una cantidad que, en ausencia del anticuerpo no neutralizante que va a analizarse, 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 en un grado que no es superior al 80 %, incluso cuando la(s) molécula(s) no neutralizante(s) que se une(n) a ADM que va a analizarse se añade(n) en una cantidad que es 10 veces superior a la cantidad que se necesita para obtener la reducción máxima de la síntesis de AMPc obtenible con el anticuerpo no neutralizante que va a analizarse. La misma definición se aplica a los otros intervalos; 95 %, 90 %, 50 % etc.

30 Según un ejemplo que no forma parte de la redacción literal de las reivindicaciones tal como se concedieron, se usa un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo bloquea la bioactividad de ADM hasta menos del 80 %, preferiblemente menos del 50 % (de los valores basales). Esto tiene el sentido de bloquear la ADM circulante de no más del 80 % o no más del 50 %, respectivamente. Se ha entendido que el bloqueo limitado de la bioactividad de ADM ocurre incluso a una concentración en exceso del anticuerpo o fragmento de anticuerpo, lo que significa un exceso del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en relación con ADM. Dicho bloqueo limitado es una propiedad intrínseca del propio agente de unión a ADM. Esto significa que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo tiene una inhibición máxima del 80 % o el 50 %, respectivamente. Por implicación, esto significa que permanece presente una bioactividad residual de ADM del 20 % o el 50 % aunque se administren cantidades apropiadas o cantidades en exceso de anticuerpo o fragmento de anticuerpo, respectivamente.

35 Según un ejemplo que no forma parte de la redacción literal de las reivindicaciones tal como se concedieron, dicho anticuerpo anti-ADM, fragmento de anticuerpo anti-ADM bloquearía la bioactividad de ADM al menos un 5 %. Por implicación, esto significa que permanece presente bioactividad residual de ADM circulante al 95 %. Este es el umbral inferior de bioactividad restante después de la administración de dicho anticuerpo anti-ADM, fragmento de anticuerpo anti-ADM. La bioactividad se define como el efecto que una sustancia toma en un organismo vivo o tejido u órgano o unidad funcional *in vivo* o *in vitro* (por ejemplo, en un ensayo) después de su interacción. En el caso de la bioactividad de ADM, este puede ser el efecto de ADM en un ensayo funcional de AMPc de receptor de ADM recombinante humano. Según un ejemplo que no forma parte de la redacción literal de las reivindicaciones tal como se concedieron, la bioactividad se define por medio de un ensayo funcional de AMPc de receptor de ADM. Las siguientes etapas pueden realizarse para determinar la bioactividad de ADM en tal ensayo:

- Se realizan curvas de respuesta a la dosis con ADM en dicho ensayo funcional de AMPc de receptor de ADM recombinante humano.
- Puede calcularse la concentración de ADM de estimulación de AMPc semimáxima.
- 55 - A concentraciones de ADM estimulantes de AMPc semimáximas constantes, se realizan curvas de respuesta a la dosis (hasta 100 µl de concentración final) mediante un anticuerpo estabilizador de ADM o un fragmento de anticuerpo estabilizador de ADM, respectivamente.

Una inhibición máxima (a dosis máxima) por dicho anticuerpo estabilizador de ADM del 50 % significa que dicho anticuerpo frente a ADM o dicho fragmento de anticuerpo frente a ADM, respectivamente, bloquea la bioactividad hasta el 50 % de los valores basales. Una inhibición máxima en dicho bioensayo de ADM del 80 % significa que dicho anticuerpo anti-ADM o dicho fragmento de anticuerpo anti-ADM, respectivamente, bloquea la bioactividad de ADM hasta el 80 %. Esto tiene el sentido de bloquear la bioactividad de ADM hasta no más del 80 %.

5 Según un ejemplo que no forma parte de la redacción literal de las reivindicaciones tal como se concedieron, se usa un anticuerpo anti-ADM modulador o un fragmento de anticuerpo anti-ADM modulador. Un anticuerpo anti-ADM "modulador" o un fragmento de anticuerpo anti-ADM modulador es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo frente a ADM que potencia la semivida (mitad del tiempo de retención t) de ADM en suero, sangre, plasma al menos un 10 %, preferiblemente al menos un 50 %, más preferiblemente >50 %, lo más preferiblemente >100 % y bloquea la bioactividad de ADM hasta menos del 80 %, preferiblemente menos del 50 % y en donde dicho anticuerpo anti-ADM o fragmento de anticuerpo anti-ADM bloquearía la bioactividad de ADM al menos un 5 %. Estos valores relacionados con la semivida y el bloqueo de la bioactividad deben entenderse en relación con los ensayos mencionados anteriormente para determinar estos valores. Esto tiene el sentido de bloquear la ADM circulante de no más del 80 % 10 o no más del 50 %, respectivamente. Esto significa que permanece presente una bioactividad de ADM residual del 20 %, o permanece presente una bioactividad de ADM residual del 50 %, respectivamente. Tal anticuerpo anti-ADM modulador o fragmento de anticuerpo anti-ADM modulador ofrece la ventaja de que se facilita la dosificación de la 15 administración. La combinación de bloquear parcialmente o reducir parcialmente la bioactividad de ADM y aumentar la semivida *in vivo* (aumento de la bioactividad de ADM) conduce a una simplicidad beneficiosa de la dosificación de 20 anticuerpo anti-ADM o fragmento de anticuerpo anti-ADM. En una situación de exceso de ADM endógena, el efecto reductor de la actividad es el principal impacto del anticuerpo o fragmento, limitando el efecto (negativo) de ADM. En el caso de concentraciones bajas o normales de ADM endógena, el efecto biológico del anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM es una combinación de disminución (por bloqueo parcial) y aumento al aumentar la semivida de ADM. Por lo tanto, el anticuerpo de ADM o fragmento de anticuerpo de ADM no neutralizante y 25 modulador actúa como un tampón de la bioactividad de ADM con el fin de mantener la bioactividad de ADM dentro de un cierto intervalo fisiológico.

30 El anticuerpo anti-ADM o fragmento de anticuerpo anti-ADM según la presente invención presenta una afinidad hacia ADM humana de manera que la constante de afinidad es mayor de 10^{-7} M, preferido 10^{-8} M, la afinidad preferida es mayor de 10^{-9} M, lo más preferido es superior a 10^{-10} M. Un experto en la técnica sabe que puede considerarse compensar una menor afinidad aplicando una dosis más alta de compuestos y esta medida no conduciría fuera del alcance de la invención. Las constantes de afinidad pueden determinarse según el método tal como se describe en el ejemplo 1 del documento WO 2013/072513.

35 Un objeto de la presente invención es además una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-ADM o fragmento de anticuerpo anti-ADM como se define en el presente documento para el uso según la presente invención. Un 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, un 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 reconstituirse antes de su uso. Dicha formulación farmacéutica puede administrarse por vía intramuscular. Dicha formulación farmacéutica puede administrarse por medio de infusión. En otra realización, un objeto de la presente invención es además una formulación farmacéutica según la presente invención en donde dicha formulación farmacéutica está en un estado liofilizado.

40 En otra realización más preferida, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-ADM o un fragmento de anticuerpo anti-ADM que se une a ADM como se define en el presente documento para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad en un paciente como se define en el presente documento, en donde dicha formulación farmacéutica va a administrarse a un paciente que lo necesita.

45 En otra realización de la presente invención, la formulación farmacéutica según la presente invención va a administrarse a un paciente para la terapia y/o prevención de síntomas asociados con enfermedades como se definieron anteriormente con la condición de que dicho paciente necesite tal tratamiento.

50 Según un ejemplo que no forma parte de la redacción literal de las reivindicaciones tal como se concedieron, el anticuerpo frente a ADM o un fragmento de anticuerpo frente a ADM según la invención es un anticuerpo frente a ADM no neutralizante o un fragmento de anticuerpo frente a ADM no neutralizante.

Como se usa en el presente documento, el formato de anticuerpo se selecciona del grupo que comprende fragmento Fv, fragmento scFv, fragmento Fab, fragmento scFab, fragmento (Fab)2 y proteína de fusión scFv-Fc.

55 En realizaciones de la presente invención, el anticuerpo frente a ADM o un fragmento de anticuerpo frente a ADM según cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en un tratamiento de un paciente que lo necesita, en donde dicho anticuerpo o fragmento puede administrarse en una dosis de al menos 0,5 mg/kg de peso corporal, particularmente al menos 1,0 mg/kg de peso corporal, más particularmente, de 1,0 a 20,0 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, de 2,0 a 10 mg/kg de peso corporal, de 2,0 a 8,0 mg/kg de peso corporal, o de 2,0 a 5,0 mg/kg de peso corporal.

En realizaciones de la presente invención, los síntomas de enfermedad a los que se hace referencia en el presente documento no están asociados con ninguna enfermedad seleccionada del grupo que comprende septicemia, diabetes, cáncer, insuficiencia cardíaca (insuficiencia cardíaca aguda) y choque séptico.

- 5 En realizaciones preferidas de la presente invención, los síntomas de enfermedad que se tratan o previenen usando cualquiera del anticuerpo frente a ADM o un fragmento de anticuerpo frente a ADM según cualquiera de las realizaciones anteriores están asociados con migraña.
- 10 En realizaciones preferidas de la presente invención, los síntomas de enfermedad que se tratan o previenen usando cualquiera del anticuerpo frente a ADM o un fragmento de anticuerpo frente a ADM según cualquiera de las realizaciones anteriores están asociados con infecciones víricas, en donde dichos virus se seleccionan del grupo que comprende hepadnaviridae, adenoviridae, herpesviridae, virus influenza, arenaviridae, filoviridae, togaviridae, norovirus, flaviviridae, retroviridae, virus del sarampión, reoviridae, enteroviridae, picomaviridae, caliciviridae, etc.
- 15 En realizaciones preferidas de la presente invención, los síntomas de enfermedad que se tratan o previenen usando cualquiera del anticuerpo frente a ADM o un fragmento de anticuerpo frente a ADM según cualquiera de las realizaciones anteriores están asociados con el tratamiento farmacológico de enfermedades primarias, tales como quimioterapia, terapia con productos biológicos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos), antibióticos o cualquier medicamento que cause cualquiera de los síntomas de enfermedad mencionados anteriormente.
- 20 Realizaciones preferidas adicionales de la presente invención se refieren a métodos de terapia (por ejemplo, tratamiento, curación, alivio, mejora, mejoría, etc.) o prevención de síntomas como se definen en cualquiera de las realizaciones anteriores que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita el anticuerpo frente a ADM o un fragmento de anticuerpo frente a ADM según cualquiera de las realizaciones anteriores. El sujeto es preferiblemente un ser humano.
- 25 La administración del anticuerpo frente a ADM o un fragmento de anticuerpo frente a ADM puede ser por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo: por vía oral, intravenosa, subcutánea, intraarterial, intramuscular, intracardiaca, intraespinal, intratorácica, intraperitoneal, intraventricular, sublingual, transdérmica y/o por medio de inhalación. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, por vía intravenosa, o localizada.
- 30 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir la cefalea, preferiblemente cefalea primaria, más preferido migraña en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo frente a ADM o un fragmento de anticuerpo frente a ADM como se define en el presente documento.
- 35 En una realización adicional, la invención proporciona métodos para mejorar, controlar, reducir la incidencia de o retrasar el desarrollo o progresión de la cefalea, preferiblemente cefalea primaria, más preferido migraña en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo frente a ADM o un fragmento de anticuerpo frente a ADM.
- 40 El anticuerpo frente a ADM o un fragmento de anticuerpo frente a ADM puede administrarse antes, durante y/o después de la cefalea. En algunas realizaciones, el anticuerpo frente a ADM o un fragmento de anticuerpo frente a ADM se administra antes del ataque de cefalea.
- 45 En algunas realizaciones, el anticuerpo frente a ADM o un fragmento de anticuerpo frente a ADM como se define en el presente documento puede administrarse como se define en el presente documento junto con otro agente, tal como otro agente para tratar la cefalea.
- 50 "Desarrollo" o "progresión" de la cefalea significa manifestaciones iniciales y/o progresión consiguiente del trastorno. El desarrollo de la cefalea puede ser detectable y evaluarse usando técnicas clínicas estándar bien conocidas en la técnica. Sin embargo, el desarrollo también se refiere a progresión que puede ser indetectable. Para los fines de esta invención, el desarrollo o la progresión se refiere al curso biológico de los síntomas. "Desarrollo" incluye aparición, recaída y comienzo. Como se usa en el presente documento, "comienzo" o "aparición" de la cefalea incluye el comienzo inicial y/o la recaída.
- 55 Como se usa en el presente documento, una "dosificación eficaz" o "cantidad eficaz" de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados tales como eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar el comienzo de la enfermedad, incluidos síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como reducir la intensidad del dolor, la duración o la frecuencia del ataque de cefalea, y disminuir uno o más síntomas resultantes de la cefalea (bioquímicos, histológicos y/o conductuales), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad, aumentar la calidad de vida de los que padecen la enfermedad, disminuir la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, potenciar el efecto de otro medicamento y/o retrasar la progresión de la enfermedad de los pacientes. Una dosificación eficaz puede administrarse en una o más administraciones. Para los fines de esta invención, una dosificación eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para lograr el

tratamiento profiláctico o terapéutico directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una dosificación eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no lograrse junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por lo tanto, una "dosificación eficaz" puede considerarse en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y un único agente puede considerarse que se administra en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes diferentes, puede lograrse o se logra un resultado deseable.

5

Ejemplos

Generación de anticuerpos y determinación de sus constantes de afinidad

Se produjeron varios anticuerpos humanos y murinos y se determinaron sus constantes de afinidad (véase la tabla 1).

Péptidos / conjugados para inmunización:

10 Se sintetizaron péptidos para la inmunización, véase la tabla 1, (JPT Technologies, Berlín, Alemania) con un residuo de cisteína N-terminal adicional (si no hay cisteína presente dentro de la secuencia de ADM seleccionada) para la conjugación de los péptidos con albúmina sérica bovina (BSA). Los péptidos se unieron covalentemente a BSA usando gel de acoplamiento Sulfolink (Perbio Science, Bonn, Alemania). El procedimiento de acoplamiento se realizó según el manual de Perbio.

15 Los anticuerpos murinos se generaron según el siguiente método:

Se inmunizó un ratón Balb/c con 100 µg de conjugado de péptido-BSA en los días 0 y 14 (emulsionado en 100 µl de adyuvante completo de Freund) y 50 µg en 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 del conjugado disuelto en 100 µl de solución salina, administrado como una inyección intraperitoneal y una inyección intravenosa.

20 Se fusionaron esplenocitos del ratón inmunizado y células de la línea celular de mieloma SP2/0 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 mediante crecimiento en medio HAT (medio de cultivo RPMI 1640 complementado con suero de ternero fetal al 20 % y suplemento HAT). Después de dos semanas, el medio HAT se reemplaza con medio HT durante tres pases seguido de retorno al medio de cultivo celular normal.

25 Los sobrenadantes del cultivo celular se cribaron en primer lugar para detectar anticuerpos IgG específicos de antígeno tres semanas después de la fusión. Los microcultivos positivos sometidos a prueba se transfirieron a placas de 24 pocillos para la propagación. Después de volver a someter a prueba, los cultivos seleccionados se clonaron y volvieron a clonarse usando la técnica de dilución limitante y se determinaron los isótipos (véase también Lane, R.D. 1985. J. Immunol. Meth. 81: 223-228; Ziegler *et al.* 1996. Horm. Metab. Res. 28: 11-15).

30 Producción de anticuerpos monoclonales de ratón:

Se produjeron anticuerpos por medio de métodos de producción de anticuerpos estándar (Marx *et al.*, 1997. Monoclonal Antibody Production, ATLA 25, 121) y se purificaron por medio de proteína A. Las purezas de los anticuerpos fueron > 95 % basándose en el análisis de electroforesis en gel de SDS.

Anticuerpos humanos:

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

Las bibliotecas génicas de anticuerpos humanos sin tratamiento previo HAL7/8 se usaron para el aislamiento de dominios variables F monocatenarios recombinantes (scFv) contra el péptido de ADM. Las bibliotecas génicas de anticuerpos se examinaron con una estrategia de cribado que comprende el uso de péptidos que contienen una etiqueta de biotina unida por medio de dos espaciadores diferentes a la secuencia peptídica de ADM. Se usó una mezcla de rondas de cribado usando antígeno unido no específicamente y antígeno unido a estreptavidina para minimizar el fondo de agentes de unión no específicos. Los fagos eluidos de la tercera ronda de cribado se han usado para la generación de cepas de *E. coli* que expresan scFv monoclonal. El sobrenadante del cultivo de estas cepas clonales se ha usado directamente para un ensayo ELISA de antígeno (véase también Hust *et al.* 2011. Journal of Biotechnology 152, 159-170; Schütte *et al.* 2009. PLoS One 4, e6625).

40 45 Se han seleccionado clones positivos basándose en la señal de ELISA positiva para antígeno y negativa para placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina. Para caracterizaciones adicionales, el marco de lectura abierto de scFv se ha clonado en el plásmido de expresión pOPE107 (Hust *et al.* 2011. Journal of Biotechnology 152, 159-170), se ha capturado del sobrenadante de cultivo por medio de cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados y se ha purificado mediante cromatografía de exclusión molecular.

50 50 Constantes de afinidad:

Para determinar la afinidad de los anticuerpos por ADM, se determinó la cinética de unión de ADM a anticuerpo inmovilizado por medio de resonancia de plasmón superficial libre de marcador usando un sistema Biacore 2000 (GE

Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Alemania). La inmovilización reversible de los anticuerpos se realizó usando un anticuerpo anti-Fc de ratón acoplado covalentemente en alta densidad a una superficie de sensor CM5 según las instrucciones del fabricante (kit de captura de anticuerpos de ratón; GE Healthcare) (Lorenz *et al.* 2011. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(1): 165-173).

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

Tabla 1:

Número de secuencia	Antígeno/inmunógeno	Región de ADM	Designación	Constantes de afinidad Kd (M)
SEQ ID: 4	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC	1-21	NT-H	$5,9 \times 10^{-9}$
SEQ ID: 21	CTVQKLAHQIYQ	21-32	MR-H	2×10^{-9}
SEQ ID: 2 amidada (con cisteína adicional en el extremo N-terminal)	C-APRSKISPQGY-NH ₂	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 amidada (con cisteína adicional en el extremo N-terminal)	C-APRNKISPQGY-NH ₂	C-40-50	CT-M	9×10^{-9}

- 10 Generación de fragmentos de anticuerpo 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 de F(ab)2 basado en pepsina (Pierce 44988) y b) el kit de preparación de Fab basado en 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 fragmentación de F(ab)2 durante 8 h a 37 °C. La digestión de fragmentación de Fab se llevó a cabo 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 × g durante 1 minuto. El tampón se desechó después. La columna de desalación se preparó retirando la disolución de almacenamiento y lavándola con tampón de digestión, centrifugándola cada vez después a 1000 × g durante 2 minutos. Se añadieron 0,5 ml de la muestra de IgG preparada al tubo de la columna de centrifugación que contenía la papaína inmovilizada equilibrada. El tiempo de incubación de la reacción de digestión se realizó durante 16 h en un balancín de sobremesa a 37 °C. La columna se centrifugó a 5000 × 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 × g durante 1 minuto. La fracción de lavado se añadió al anticuerpo digerido de manera que el volumen total de la muestra era de 1,0 ml. La columna de proteína A de NAb 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 sódica al 0,02 %) y se equilibró añadiendo 2 ml de PBS, se centrifugó de nuevo durante 1 minuto y se desechó la fracción no retenida. La muestra se aplicó a la columna y se resuspendió por inversión. La incubación se realizó a temperatura ambiente con mezclado de extremo a extremo durante 10 minutos. La columna se centrifugó durante 1 minuto, guardando la fracción no retenida con los fragmentos Fab. (Referencias: Coulter y Harris 1983. *J. Immunol. Meth.* 59, 199-203.; Lindner *et al.* 2010. *J. Immunol. Meth.* 70, 277-87; Kaufmann *et al.* 2010. *PNAS.* 107, 18950-5.; Chen *et al.* 2010. *PNAS.* 107, 14727-32; Uysal *et al.* 2009. *J. Exp. Med.* 206, 449-62; Thomas *et al.* 2009. *J. Exp. Med.* 206, 1913-27; Kong *et al.* 2009. *J. Cell Biol.* 185, 1275-840).

- 35 Procedimiento para la generación y purificación de fragmentos 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 × g durante 1 minuto. El tampón se desechó después. La columna de desalación se preparó retirando la disolución de almacenamiento y lavándola con tampón de digestión, centrifugándola cada vez después a 1000 × 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 pepsina inmovilizada equilibrada. El tiempo de incubación de la reacción de digestión se realizó durante 16 h en un balancín de sobremesa a 37 °C. La columna se centrifugó a 5000 × 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 × g durante

1 minuto. La fracción de lavado se añadió al anticuerpo digerido de manera que el volumen total de la muestra era de 1,0 ml. La columna de proteína A de NAb 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 sódica al 0,02 %) y se equilibró añadiendo 2 ml de PBS, se centrifugó de nuevo durante 1 minuto y se desecharó la fracción no retenida. La muestra se aplicó a la columna y se resuspendió por inversión. La incubación se realizó a temperatura ambiente con mezclado de extremo a extremo durante 10 minutos. La columna se centrifugó durante 1 minuto, guardando la fracción no retenida con los fragmentos Fab. (Referencias: Mariani *et al.* 1991. Mol. Immunol. 28: 69-77; Beale 1987. Exp Comp Immunol 11:287-96; Ellerson *et al.* 1972. FEBS Letters 24 (3):318-22; Kerbel y Elliot 1983. Meth Enzymol 93:113-147; Kulkarni *et al.* 1985. Cancer Immunol Immunotherapy 19:211-4; Lamovi 1986. Meth Enzymol 121:652-663; Parham *et al.* 1982. J Immunol Meth 53:113-73; Raychaudhuri *et al.* 1985. Mol Immunol 22(9):1009-19; Rousseaux *et al.* 1980. Mol Immunol 17: 469-82; Rousseaux *et al.* 1983. J Immunol Meth 64:141-6; Wilson *et al.* 1991. J Immunol Meth 138:111-9).

Humanización de fragmento de anticuerpo NT-H:

El fragmento de anticuerpo se humanizó mediante el método de injerto de CDR (Jones *et al.* 1986. Nature 321, 522-525).

15 Se ejecutaron las siguientes etapas para conseguir la secuencia humanizada:

- Extracción de ARN total: se extrajo ARN total de hibridomas de NT-H usando el kit de Qiagen.
- RT-PCR de primera ronda: se usó el kit de RT-PCR QIAGEN® OneStep (n.º de cat. 210210). Se realizó RT-PCR con conjuntos de cebadores específicos para las cadenas pesada y ligera. Para cada muestra de ARN, se establecieron 12 reacciones de RT-PCR de cadena pesada y 11 de cadena ligera individuales usando mezclas de cebadores directos degenerados que cubrían las secuencias líder de regiones variables. Los cebadores inversos se localizan en las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera. No se diseñaron por ingeniería genética sitios de restricción en los cebadores.
- Configuración de la reacción: tampón de RT-PCR QIAGEN® OneStep 5x, 5,0 µl, mezcla de dNTP (que contiene 10 mM de cada dNTP), 0,8 µl, conjunto de cebadores, 0,5 µl, mezcla de enzimas de RT-PCR QIAGEN® OneStep, 0,8 µl, ARN molde, 2,0 µl, agua libre de RNasa hasta 20,0 µl, volumen total 20,0 µl, condición de PCR: transcripción inversa: 50 °C, 30 min; activación de PCR inicial: 95 °C, 15 min, ciclado: 20 ciclos de 94 °C, 25 s; 54 °C, 30 s; 72 °C, 30 s; extensión final: 72 °C, 10 min. PCR semianidada de segunda ronda: Los productos de RT-PCR de las reacciones de primera ronda se amplificaron adicionalmente en la PCR de segunda ronda. 12 reacciones de RT-PCR de cadena pesada y 11 de cadena ligera se establecieron usando conjuntos de cebadores semianidados específicos para regiones variables de anticuerpo.
- Configuración de la reacción: mezcla de PCR 2x, 10 µl; conjunto de cebadores, 2 µl; producto de PCR de primera ronda, 8 µl; volumen total 20 µl; condición de PCR del informe de clonación de anticuerpos de hibridoma: 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 10 min 68 °C
- Después de que la PCR finalice, se ejecutan las muestras de reacción PCR sobre gel de agarosa para visualizar fragmentos de ADN amplificados. Después de secuenciar más de 15 fragmentos de ADN clonados amplificados por RT-PCR anidada, se han clonado varias cadenas pesada y ligera de anticuerpo de ratón y parecen correctas. El alineamiento de secuencias de proteínas y el análisis de CDR identifica una cadena pesada y una cadena ligera. Como los aminoácidos en las posiciones 26, 40 y 55 en la cadena pesada variable y el aminoácido en la posición 40 en la cadena ligera variable son críticos para las propiedades de unión, pueden invertirse al original murino. Los candidatos resultantes se representan a continuación. (Padlan 1991. Mol. Immunol. 28, 489-498; Harris y Bajorath. 1995. Protein Sci. 4. 306-310).

Anotación para las secuencias de fragmentos de anticuerpo (SEQ ID NO: 10 a 17): en negrita y subrayadas están las CDR 1, 2, 3 en orden numérico desde el extremo N al extremo C-terminal; en cursiva están las regiones constantes; las regiones bisagra están destacadas con negrita, letras subrayadas y la etiqueta de histidina en el extremo C-terminal con letras en negrita y cursiva.

SEQ ID NO: 10 (AM-VH-C)

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSRYWIEWVKQRPQHGLEWIGEILPGSG
STNYNEFKKGKATITADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYCTEGYEYDGFDYWGQGITLT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGIQTYICNVNHPNSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEQ ID NO: 11 (AM-VH1)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGRILPGS
GSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFDYWGQGTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEQ ID NO: 12 (AM-VH2-E40)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGRILPGS
GSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFDYWGQGTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

5 SEQ ID NO: 13 (AM-VH3-T26-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGEILPGS
GSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFDYWGQGTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEQ ID NO: 14 (AM-VH4-T26-E40-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGS
GSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFDYWGQGTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

SEQ ID NO: 15 (AM-VL-C)

DVLLSQTPLSLPVSLGDQATISCRSSQSIIVYNSGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRVSN
 RFSGVPDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHIPYTFGGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

SEQ ID NO: 16 (AM-VL1)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIIVYNSGNTYLEWFQQRPGQSPRRIYRVSN
 RDSGVPDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 17 (AM-VL2-E40)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIIVYNSGNTYLEWFQQRPGQSPRRIYRVSN
 RDSGVPDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 22 (cadena pesada de Adrecizumab)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWIGEILPGSG
STNYNQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFDYWGQGT
 TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYLFPPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
 GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
 D SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 23 (cadena ligera de Adrecizumab)

DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYNGNTYLEWYLQRPGQSPRLIYRVSN
 RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFOGSHIPYTFGGGTKLEIKRTVA
 APSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- 5 Ejemplo 2 - Un estudio de fase I controlado con placebo de doble enmascaramiento aleatorizado sobre la seguridad, tolerabilidad y farmacocinética/dinámica del aumento de dosis intravenosas individuales de anticuerpo anti-ADM (ADRECIZUMAB) (HAM8101) en sujetos masculinos sanos durante endotoxemia experimental.

Diseño global del ensayo

- 10 Un estudio en fase I controlado con placebo, de doble enmascaramiento, aleatorizado en voluntarios masculinos sanos durante endotoxemia experimental con dosis individuales crecientes por grupo de Adrecizumab administradas como infusión i.v. durante un período de 1 hora. Se usó un modelo continuo de LPS (lipopolisacárido) para inducir endotoxemia experimental; administración de LPS en un bolo inicial de 1 ng/kg seguido de infusión continua a 1 ng/kg/h durante 3 horas. El sujeto recibirá un ciclo de tratamiento con medicación del estudio (Adrecizumab o placebo), 1 hora después del inicio de la administración de LPS. El modelo de inflamación sistémica se ha descrito recientemente (Kiers *et al.* 2017. *Scientific Reports* 7: 40149).

15 Se administró Adrecizumab como infusión individual durante un período de 1 hora en una dosis de 0,5 mg/kg y se aumentó hasta 2,0 y 8,0 mg/kg en los grupos de tratamiento posteriores (véase la tabla 2).

Tabla 2: Grupos de estudio de 8 sujetos recibieron tratamiento por infusión de 1 hora

Grupo	Tratamiento	
Grupo 1	0,5 mg/kg de HAM8101 (n = 6)	Placebo (n=2)
Grupo 2	2,0 mg/kg de HAM8101 (n = 6)	Placebo (n=2)
Grupo 3	8,0 mg/kg de HAM8101 (n = 6)	Placebo (n=2)

- 20 Selección de la población de ensayo

La población del estudio consistió en voluntarios masculinos jóvenes sanos. Para ser incluidos en el ensayo, los sujetos tuvieron que cumplir todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión.

Criterios de inclusión

- 25 1. Consentimiento informado por escrito para participar en este ensayo antes de cualquier procedimiento de estudio obligatorio.
2. Sujetos masculinos de 18 a 35 años inclusive.
3. Los sujetos tienen que estar de acuerdo en usar una forma fiable de anticoncepción con sus parejas desde la

entrada en el estudio hasta 3 meses después de la administración del fármaco del estudio.

4. IMC entre 18 y 30 kg/m², con un límite inferior de peso corporal de 50 kg y un límite superior de 100 kg.

5. Sano según se determina por antecedentes médicos, examen físico, signos vitales, electrocardiograma de 12 derivaciones y parámetros de laboratorio clínico.

5 *Criterios de exclusión*

1. Falta de voluntad de abstenerse de cualquier medicamento, drogas recreativas o suplementos vitamínicos antioxidantes durante el curso del estudio y en el plazo de los 7 días anteriores al día de tratamiento.

2. Falta de voluntad de abstenerse de fumar o tomar alcohol en el plazo de 1 día antes del día de tratamiento.

3. Participación previa en un ensayo en donde se administró LPS.

10 4. Cirugía o traumatismo con pérdida de sangre significativa o donación de sangre en el plazo de 3 meses antes del día de tratamiento.

5. Antecedentes, signos o síntomas de enfermedad cardiovascular, en particular:

- Antecedentes de colapso vasovagal frecuente o de hipotensión ortostática

- Frecuencia de pulso en reposo ≤ 45 o ≥ 100 latidos/min

- Hipertensión (RR sistólica >160 o RR diastólica >90 mmHg)

- Hipotensión (sistólica RR <100 o diastólica RR <50 mmHg)

- Anomalías de conducción en el ECG que consisten en un bloqueo auriculoventricular de 1^{er} grado o un bloqueo de ramificación de haz complejo

- Cualquier arritmia cardíaca crónica (excepto PAC, PVC)

20 6. Insuficiencia renal: creatinina plasmática >120 $\mu\text{mol/l}$

7. Pruebas de la función hepática (fosfatasa alcalina, AST, ALT y/o γ -GT) por encima de 2x el límite superior de lo normal.

8. Antecedentes de asma

9. Constitución atópica

25 10. CRP por encima de 2x el límite superior de lo normal, o enfermedad aguda clínicamente significativa, incluyendo infecciones, en el plazo de 2 semanas antes del día de tratamiento.

11. Tratamiento con fármacos en investigación o participación en cualquier otro ensayo clínico en el plazo de 30 días antes del día de tratamiento.

12. Se sabe o se sospecha que no es capaz de cumplir con el protocolo de ensayo.

30 13. Hipersensibilidad conocida a cualquier excipiente de las formulaciones farmacológicas usadas.

14. Incapacidad para proporcionar personalmente el consentimiento informado por escrito (por ejemplo, por razones lingüísticas o mentales) y/o participar en el estudio.

Lipopolisacárido (LPS) de Escherichia coli tipo 0113

35 Para lograr un estado inflamatorio controlado, los sujetos recibieron lipopolisacárido (LPS, endotoxina de referencia de EE. UU. [Escherichia coli O:113, List Biological Laboratories Inc., Campbell, California, EE. UU.]) por vía intravenosa.

Jerarquía de examen y ventanas de tiempo

40 Las muestras de sangre antes de la dosis se extrajeron en T = 0 (momento basal). Los signos vitales se midieron después de 5 minutos de reposo en posición supina o semisupina. Programa para muestras de sangre y visitas de control (véase la tabla 2 para información más detallada):

- El día del tratamiento (día 0), tenían que tomarse muestras de sangre en los momentos programados ± 5 minutos.

- Después de 24 horas (día 1), la visita de seguimiento y la extracción de sangre tenían que planificarse \pm 1 hora después de la administración IMP.
- El día 7, la visita de seguimiento podría planificarse en cualquier momento, \pm 1 día.
- Los días 14 y 28, la visita de seguimiento podría planificarse en cualquier momento, \pm 2 días.
- Los días 60 y 90, la visita de seguimiento podría planificarse en cualquier momento, \pm 3 días.

5

Monitorización de laboratorio

Se analizaron los siguientes parámetros hematológicos: hemoglobina, hematocrito, RBC, MCV, MCH, MCHC, WBC, plaquetas, hemograma diferencial.

Se recogieron muestras de sangre en tubos de separación de suero y se analizaron los siguientes parámetros 10 bioquímicos: CRP, AF, ALT, AST, γ -GT, creatina cinasa, LDH, urea-N, creatinina, sodio, potasio, PT y APTT

15

Las variables de criterios de valoración primarios son: eventos adversos; signos vitales durante las primeras 10 horas después de la administración de Adrecizumab y en períodos de seguimiento ($T = 24$ horas, $T = 7$ días, $T = 14$ días, $T = 28$ días, $T = 60$ días, $T = 90$ días), por ejemplo, frecuencia cardíaca, tensión arterial, saturación de oxígeno, temperatura; tolerabilidad local en el sitio de infusión i.v.; parámetros de laboratorio de seguridad (Hb, Ht, leucocitos, trombocitos, hemograma diferencial de leucocitos, sodio, potasio, creatinina, urea, fosfatasa alcalina, ALT, AST, GGT, CK, CRP, PT, APTT); electrocardiograma de 12 derivaciones (ECG), 2 y 8 horas después de la administración de Adrecizumab.

20 Los criterios de valoración secundarios son: farmacocinética de Adrecizumab durante endotoxemia experimental (incluyendo AUC, Cmáx, T1/2 terminal, Cl, V); niveles plasmáticos de mediadores inflamatorios el día de la endotoxemia (incluyendo, pero sin limitarse a, TNF α , IL-6, IL-8, IL-10); puntuación de síntomas de enfermedad; opcional: marcadores de daño renal (incluyendo, pero sin limitarse a aclaramiento de creatinina, pro-encefalina y KIM-1).

Tabla 2: características basales por grupo (media \pm DE)

	Placebo	0,5 mg/kg	2,0 mg/kg	8,0 mg/kg	Valor P *
Edad	22,0 \pm 1,1	22,0 \pm 2,8	23,3 \pm 2,5	22,5 \pm 2,7	0,745
IMC	23,7 \pm 1,3	23,3 \pm 1,5	24,7 \pm 1,9	25,6 \pm 3,0	0,263

* Sometido a prueba con ANOVA de una vía

25 No se observaron acontecimientos adversos graves (SAE) o reacciones adversas graves sospechosas inesperadas (SUSAR) durante la duración completa del estudio, incluido el período de seguimiento de 90 días.

Resultados

La puntuación de enfermedad cae más rápidamente en el tratamiento con Adrecizumab en comparación con el placebo.

30 Tanto 2 como 8 mg/kg tienen una puntuación de enfermedad significativamente menor que el placebo entre los puntos de tiempo a 210 min (T210) y 450 min (T450) ($p=0,011$ y 0,005, respectivamente; medidas repetidas de GLM) (Fig. 1).

La Figura 2 muestra la distribución de las puntuaciones de enfermedad por brazo de tratamiento a T270 (punto de tiempo 270 min) y T300 (punto de tiempo 300 min), respectivamente (Fig. 2 A) y B)) apoyando el efecto sorprendentemente beneficioso del anticuerpo de la presente invención.

35 La contribución de los componentes de la puntuación de enfermedad individual al efecto se ilustra en la Figura 3: A) náuseas, B) dolor de cabeza, C) dolores musculares, D) dolor de espalda y E) escalofríos. Todos los síntomas mostrados contribuyen significativamente al efecto. Los vómitos se produjeron solamente en dos pacientes una vez cada uno y no pudieron analizarse.

40 La Figura 4 muestra una evaluación alternativa. En este caso, se evaluó la puntuación de enfermedad usando la única cuestión con respecto a la enfermedad global, en una escala de 0 a 10. De nuevo, la puntuación de enfermedad cae más rápidamente en pacientes tratados con anticuerpo anti-ADM (Adrecizumab).

Administración de NT-H en seres humanos sanos

El estudio se realizó en sujetos masculinos sanos como un estudio aleatorizado, de doble enmascaramiento, controlado con placebo con dosis crecientes individuales de anticuerpo NT-H administradas como infusión intravenosa (i.v.) en 3 grupos secuenciales de 8 sujetos masculinos sanos cada uno (1^{er} grupo 0,5 mg/kg, 2^o grupo 2 mg/kg, 3^{er}

grupo 8 mg/kg) de sujetos masculinos sanos (n=6 activos, n= 2 placebo para cada grupo).

Los principales criterios de inclusión fueron consentimiento informado por escrito, edad de 18 - 35 años, estar de acuerdo en usar una forma fiable de anticoncepción y un IMC de entre 18 y 30 kg/m².

5 Los sujetos recibieron una única dosis i.v. de anticuerpo NT-H (0,5 mg/kg; 2 mg/kg; 8 mg/kg) o placebo mediante infusión lenta durante un periodo de 1 hora en una unidad de investigación.

Los valores de ADM basales en los 4 grupos no difirieron. La mediana de los valores de ADM fueron 7,1 pg/ml en el grupo de placebo, 6,8 pg/ml en el primer grupo de tratamiento (0,5 mg/kg), 5,5 pg/ml en el segundo grupo de tratamiento (2 mg/kg) y 7,1 pg/ml en el tercer grupo de tratamiento (8 mg/ml).

10 Los resultados muestran que los valores de ADM aumentaron rápidamente en las primeras 1,5 horas después de la administración del anticuerpo NT-H en individuos humanos sanos, después alcanzaron una meseta y disminuyeron lentamente (Fig. 5).

15 Dos sujetos del grupo de placebo y 3 sujetos en total del grupo tratado notificaron síntomas de migraña antes de recibir la única dosis de placebo y anticuerpo NT-H, respectivamente. Después de cada punto de tiempo, se solicitaron de nuevo los síntomas. Los sujetos tratados con anticuerpo NT-H no notificaron ningún síntoma de migraña 4 horas después del tratamiento, mientras que los dos sujetos que recibieron placebo todavía padecían síntomas de migraña como antes de la infusión.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad en un sujeto que lo necesita, en donde

el sujeto es humano, y

5 en donde los síntomas de enfermedad se seleccionan del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda y/o escalofríos,

en donde la enfermedad se caracteriza por una cantidad de proteína C reactiva (CRP) en una muestra que es $\geq 10 \text{ mg/l}$, y/o en donde la cantidad de TNF en una muestra es $\geq 50 \text{ pg/ml}$, y/o en donde la cantidad de bio-ADM en una muestra es $\geq 43 \text{ pg/ml}$, y en donde dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, plasma, suero, y

10 en donde dicho anticuerpo o fragmento es un anticuerpo monoclonal humanizado o fragmento que se une a ADM o un fragmento de la misma,

en donde la cadena pesada comprende las secuencias:

CDR1: SEQ ID NO: 5

15 GYTFSRYW

CDR2: SEQ ID NO: 6

ILPGSGST

CDR3: SEQ ID NO: 7

TEGYEYDGFDY

20 y en donde la cadena ligera comprende las secuencias:

CDR1: SEQ ID NO: 8

QSIVYSNGNTY

CDR2:

RVS

25 CDR3: SEQ ID NO: 9

FQGSHIPYT.

2. Anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) o un fragmento de anticuerpo anti-ADM para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad o para el uso en la terapia o prevención de una enfermedad caracterizado por tales síntomas en un sujeto que lo necesita según la reivindicación 1, en donde las enfermedades en un paciente que

30 necesita terapia y/o prevención de tales síntomas o enfermedades se seleccionan del grupo de indicaciones que comprenden afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades metabólicas, enfermedades cerebrales, enfermedades cardiovasculares y enfermedades inducidas por fármacos.

35 3. Formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-adrenomedulina (ADM) según la reivindicación 1, o un fragmento de anticuerpo anti-adrenomedulina según la reivindicación 1 para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad en un sujeto que lo necesita, en donde el sujeto es un ser humano, y

en donde los síntomas de enfermedad se seleccionan del grupo de náuseas, cefalea, dolores musculares, dolor de espalda y/o escalofríos,

en donde la enfermedad se caracteriza por una cantidad de proteína C reactiva (CRP) en una muestra que es $\geq 10 \text{ mg/l}$, y/o en donde la cantidad de TNF en una muestra es $\geq 50 \text{ pg/ml}$, y/o en donde la cantidad de bio-ADM en una muestra es $\geq 43 \text{ pg/ml}$, y en donde dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, plasma, suero.

40 4. Formulación farmacéutica para su uso en la terapia o prevención de síntomas de enfermedad o para el uso en la terapia o prevención de una enfermedad caracterizada por tales síntomas en un sujeto que lo necesita según la reivindicación 3, en donde las enfermedades en un paciente que necesita terapia y/o prevención de tales síntomas o enfermedades se seleccionan del grupo de indicaciones que comprenden afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades metabólicas, enfermedades cerebrales, enfermedades cardiovasculares y enfermedades inducidas por fármacos.

Figura 1

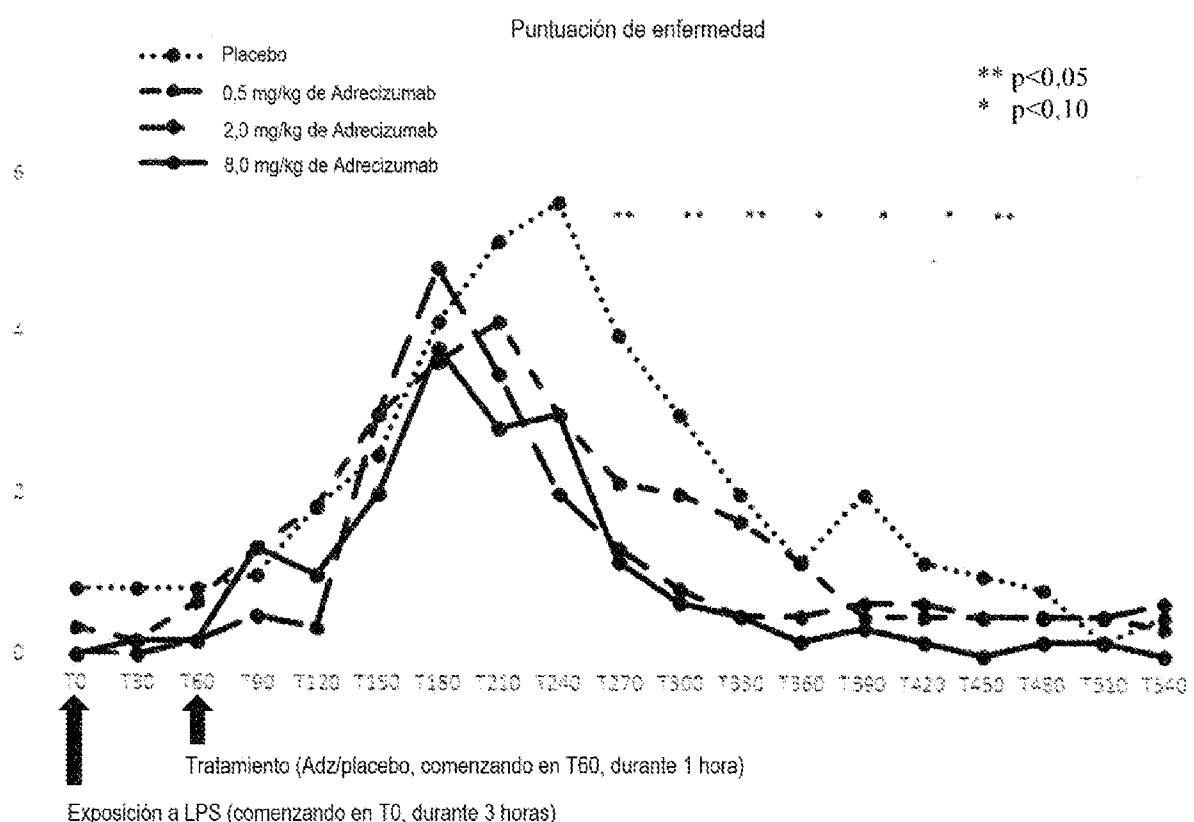


Figura 2

Distribución de la puntuación de enfermedad por brazo de tratamiento a T270 y T300

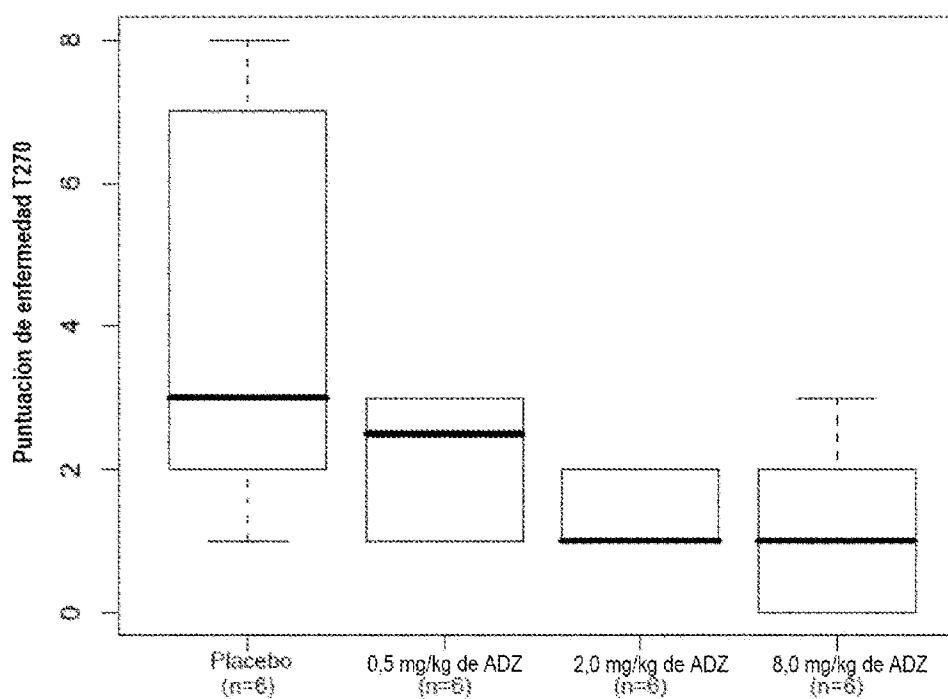
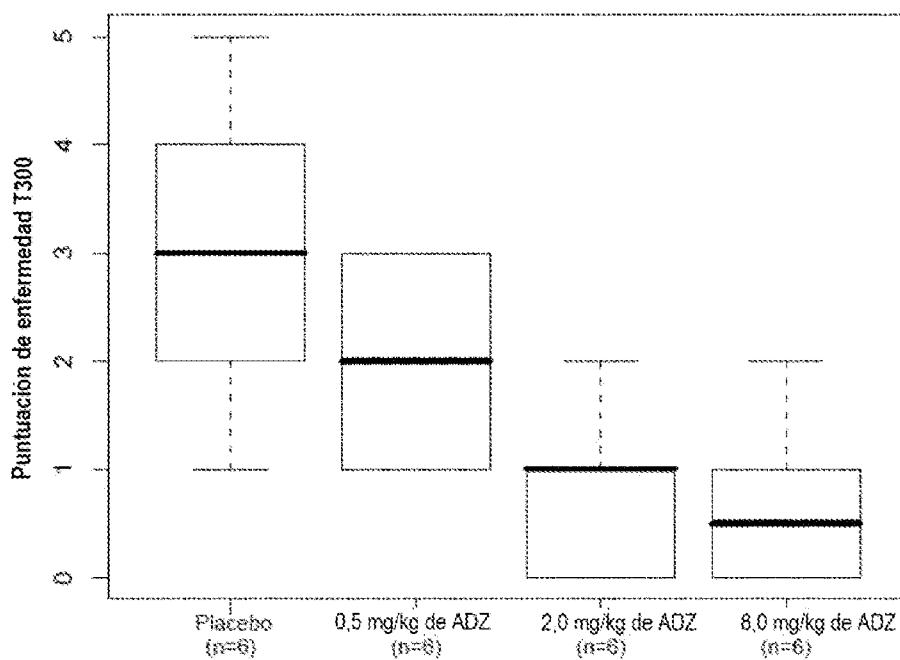
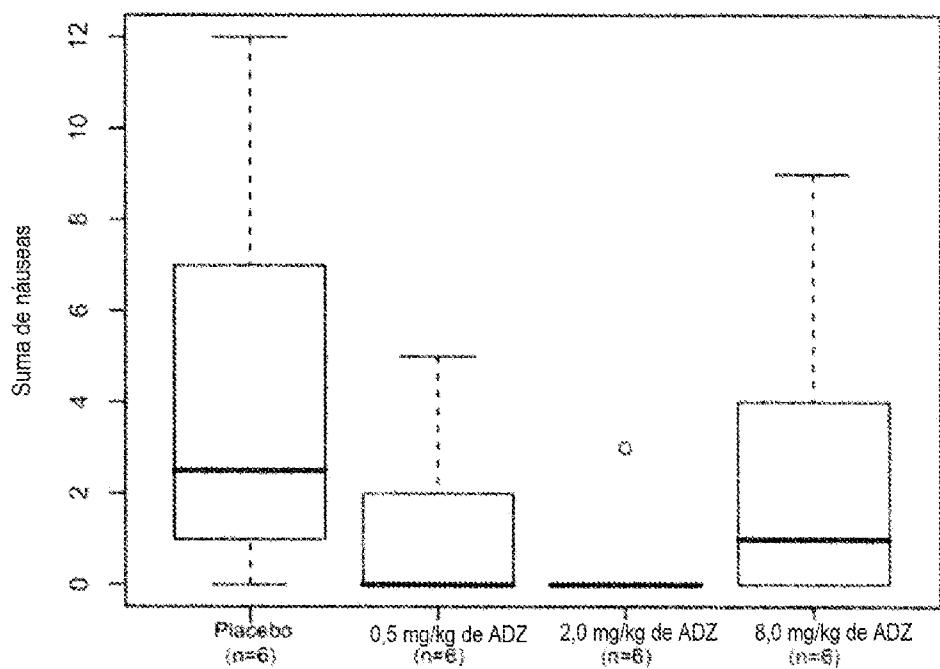
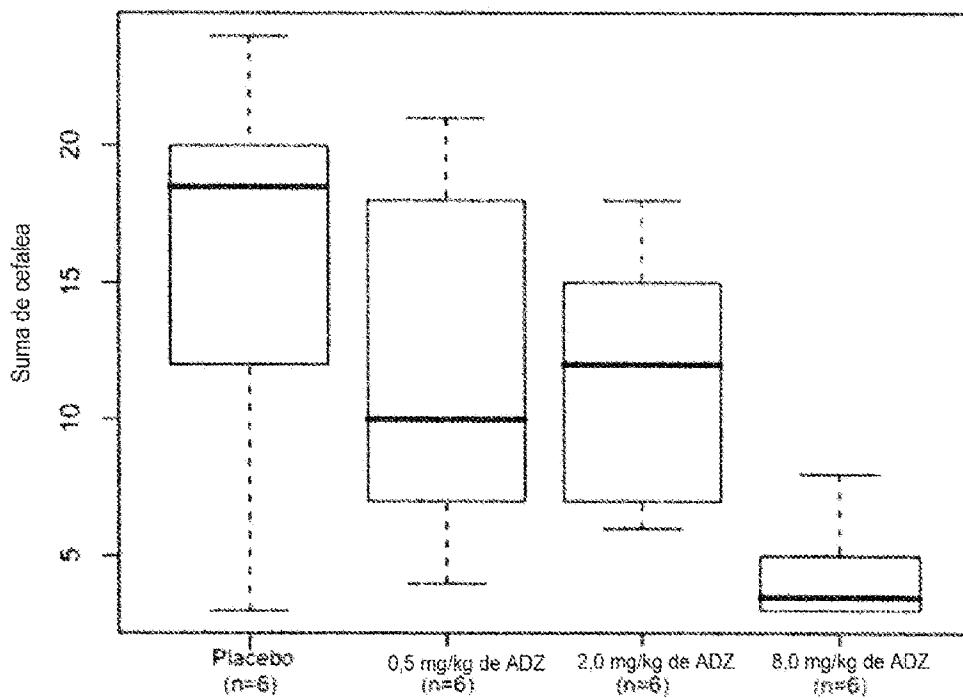
A)**B)**

Figura 3

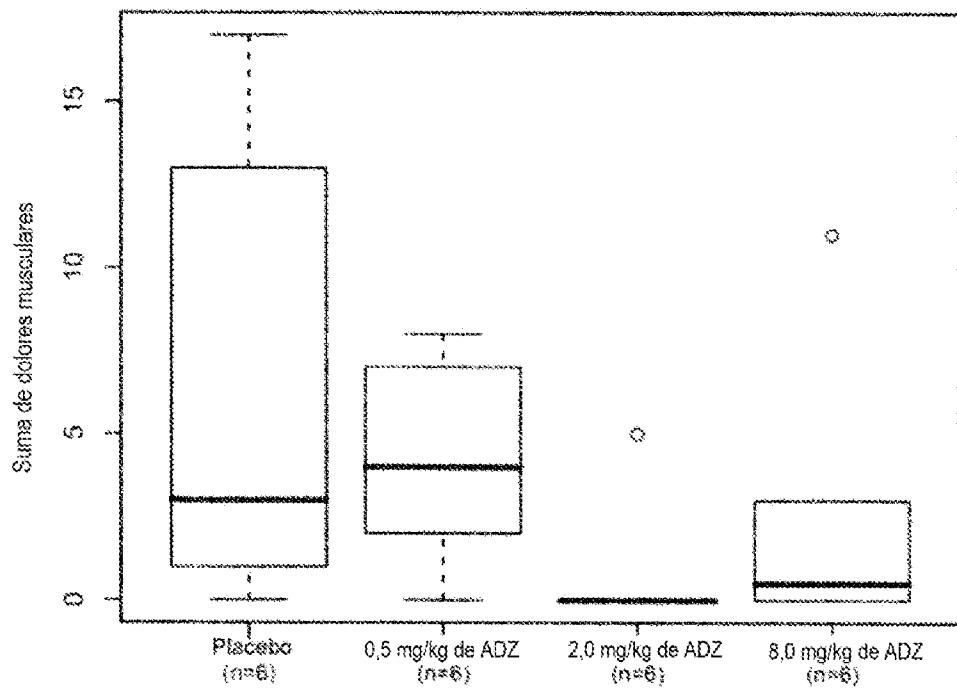
A)



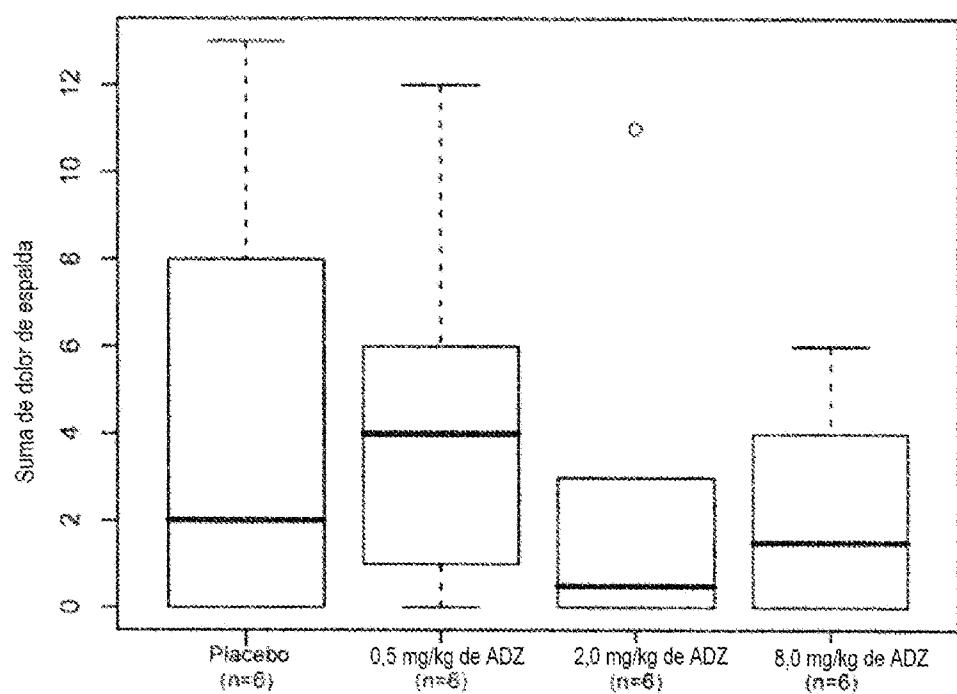
B)



C)



D)



E)

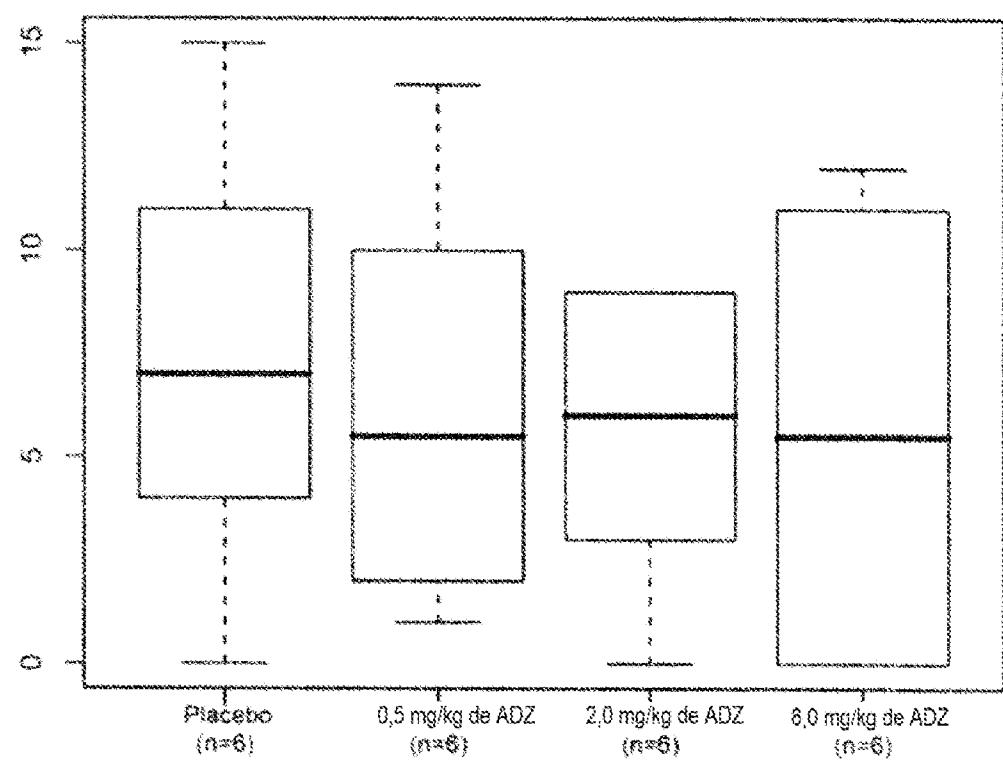


Figura 4

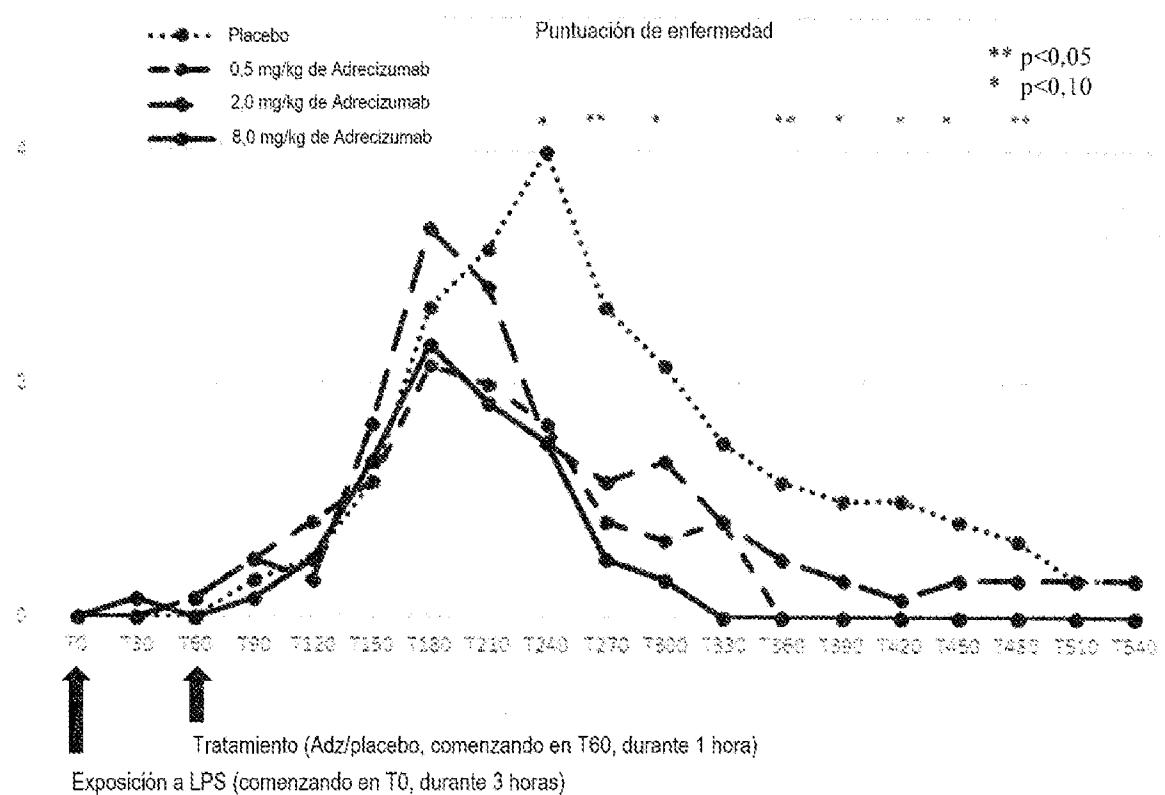


Figura 5

