

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 346 408**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: 02717057 .0

⑨6) Fecha de presentación : 12.03.2002

97 Número de publicación de la solicitud: 1368060

⑨7) Fecha de publicación de la solicitud: 10.12.2003

54 Título: Inhibidores y/o antagonistas de la proteína HMGB1 destinados al tratamiento de enfermedades vasculares.

⑩ Prioridad: 16.03.2001 IT MI01A0562

73 Titular/es: **Bio3 Research S.R.L.**
Corso Venezia, 24
20121 Milan- IT

④(5) Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.10.2010

(72) Inventor/es: **Bianchi, Marco, E.;
Bonaldi, Tiziana;
Scaffidi, Paola;
Mueller, Susanne y
Degryse, Bernard**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.10.2010

74 Agente: **Morgades Manonelles, Juan Antonio**

ES 2346 408 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

Inhibidores y/o antagonistas de la proteína HMGB1 destinados al tratamiento de enfermedades vasculares.

5 La presente invención se refiere al campo de la biología molecular y más particularmente a los inhibidores de la proteína HMGB1 y los antagonistas de la HMGB1 a utilizar en el tratamiento de enfermedades vasculares, entre ellas las debidas a la angioplastia.

10 La proteína HMGB1 (conocida, antes de 2001, como HMG; Bustin, 2001, *Trends Biochem. Sci.*, 26: 152-153) es la proteína arquetípica de la familia con la secuencia de la HMG, que se caracteriza por la presencia de dominios de enlace con ADN, denominados cajas HMG. La HMG1 es una proteína pequeña de 25 kD, de 215 aminoácidos, con una secuencia muy conservada entre los mamíferos. La molécula de HMGB1 se organiza en tres dominios: dos dominios de enlace con ADN, HMG Secuencia A y Secuencia B, que vienen seguidos por una parte terminal ácida COOH compuesta de 30 residuos glutámico y aspártico. Las dos secuencias HMG, la secuencia A y la secuencia B, 15 presentan 80 segmentos de aminoácidos (29% idénticos, 65% similares), con una estructura tridimensional en forma de L (Hardman *et al.*, 1995, *Biochemistry*, 34: 16536-16607; Read *et al.*, 1993, *Nucleic Acids Res.*, 21: 3427-3436; Weir *et al.*, 1993, *EMBO J.*, 12: 1311-1319).

20 La HMGB1 se identificó originalmente como una proteína nuclear abundante y ampliamente expresada. Se encuentra presente en más de 1 millón de copias por núcleo simple y se enlaza con el ADN bícatenario sin especificidad de secuencia. En cambio, la HMGB1 se enlaza con alta afinidad a estructuras específicas de ADN tal como ADN doblado o plegado y uniones cuádruples. Sin embargo, la HMGB1 se puede incorporar al ADN bícatenario mediante la interacción con distintas proteínas de enlace con el ADN. Cuando se enlaza con el ADN bícatenario, provoca la distorsión de la estructura, lo que permite la formación de complejos de nucleoproteínas en los que diversas proteínas 25 de enlace con el ADN pueden entrar en contacto entre sí al mismo tiempo que se enlazan con sus respectivos sitios análogos de ADN (Müller *et al.*, 2001, *EMBO J.*, 16: 4337-4340 y otras referencias que se citan en la presente memoria). El fenotipo de ratones Hmgb1 -/- concuerda con este modo (Calogero *et al.*, 1999, *Nat. Genet.*, 22: 276-280).

30 Recientemente, ha pasado a ser el centro de atención un papel adicional que desempeña la HMGB1 en el exterior del núcleo celular: la HMGB1 actúa como mediador tardío en la letalidad provocada por endotoxinas así como en la inflamación pulmonar aguda en ratones; así como el nivel levado en suero de HMGB1 en pacientes septicémicos constituye un marcador del pronóstico (solicitud internacional de patente n.º WO 00/47104). La HMGB1 se puede secretar mediante macrófagos y pituitarios en cultivo como respuesta a las citocinas y a endotoxinas bacterianas (Abraham *et al.*, 2000, *J. Immunol.*, 165: 2950-2954; Wang *et al.*, 1999, *Surgery* (St. Luis), 126: 389-392; Wang *et al.*, 1999, *Science*, 285: 248-251). La liberación de HMGB1 de células de eritroleucemia murina se puede relacionar con la diferenciación celular y se puede encontrar la proteína en una forma asociada a la membrana plasmática en dichas células (Passalacqua *et al.*, 1997, *FEBS Lett.*, 400: 275-279; Sparatore *et al.* 1996, *Biochem. J.*, 320: 253-256). Una proteína denominada amfoterina, con una secuencia idéntica a la HMGB1, se ha descrito en el encéfalo, donde se ha encontrado en el núcleo y el citoplasma de neuronas así como en el espacio extracelular. Si se añade exógenamente, la HMGB1 interviene en el crecimiento de las consecuencias de los axones, y la migración de células de neuroblastoma y glioma que depende de la laminina se ve inhibida por anticuerpos contra la HMGB1 (Fages *et al.*, 2000, *J. Cell Sci.*, 113: 611-620; Merenmies *et al.*, 1991, *J. Biol. Chem.*, 266: 16722-16729; Parkkinen *et al.*, 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 19726-19738; Rauvala *et al.*, 1988, *J. Cell Biol.*, 107: 2293-2305). Las interacciones entre la HMGB1 y el sistema de activación del plasminógeno, en particular el t-PA (activador del plasminógeno de tipo tisular), tiene como resultado 40 una aumento en la formación de plasmina (Parkkinen y Rauvala, 1991, *J. Biol. Chem.*, 266: 16730-16735). La degradación de las proteínas de la matriz extracelular constituye una etapa importante en el proceso de migración celular y el aumento de la actividad de la proteasa extracelular estimulado por la HMGB1 puede permitir que las células migren.

50 Se ha identificado la HMGB1 como uno de los ligandos que se enlaza con el receptor RAGE (receptor para los productos finales de la glucación avanzada) (Hori *et al.*, 1995, *J. Biol. Chem.*, 270: 25752-25761). El RAGE es un receptor multiligando de la superfamilia de la inmunoglobulina y se expresa en diversos tipos celulares, entre ellos las células endoteliales, las fibras musculares lisas, los fagocitos mononucleares y las neuronas (Brett *et al.*, 1993, *Am. J. Pathol.*, 143: 1699-1712; Neer *et al.*, 1992, *J. Biol. Chem.*, 267: 14998-15004). Interviene en diversos procesos patológicos, tales como la diabetes, amiloidosis y la ateroesclerosis (Schmidt *et al.*, 1999, *Circ. Res.*, 84: 489-497). 55 La interacción entre la HMGB1 y el RAGE provoca el crecimiento de los axones, y las dos proteínas se encuentran juntas en la parte anterior de axones en progreso durante el desarrollo embrionario (Huttunen *et al.*, 1999, *J. Biol. Chem.*, 274: 19919-19924). Se observó el bloqueo del crecimiento tumoral y la metástasis al prevenir las interacciones entre la HMGB1 y el RAGE; además, la inhibición de dicha interacción evita la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP) y la expresión de metaloproteinasas matriciales, unas moléculas que se relacionan significativamente con la proliferación e invasión tumoral (Taguchi *et al.*, 2000, *Nature*, 405: 354-360).

60 Además, se conoce actualmente que los inhibidores de la HMGB1 (es decir, la glicirrizina) se pueden utilizar como antiinflamatorios (Sakamoto *et al.*, 2001, *Biol. Pharm. Bull.*, 24(8) 906-911; Yoh *et al.*, *Dig. Dis. Sci.*, 47(8) 1775-1781).

65 Los inventores de la presente invención han demostrado que la HMGB1 ejerce un potente efecto biológico en las fibras musculares lisas (SMC), uno de los tipos celulares en los que el RAGE se expresa en la superficie. Las SMC vasculares son las células predominantes en los vasos sanguíneos grandes; se encuentran en la túnica media donde se

integran en la matriz extracelular. En los vasos intactos, las SMC se encuentran contraídas y presentan un fenotipo caracterizado por la ausencia de la división celular y la migración responsables del mantenimiento de la rigidez y la elasticidad de las paredes de los vasos y del control de la tensión arterial.

5 Cuando se daña el endotelio, tras lesiones mecánicas o inflamatorias, las SMC cambian a un fenotipo sintético y experimentan la división celular y la migración celular. La migración de las SMC de la túnica media a la túnica íntima, que tiene como resultado el aumento de espesor de la íntima, desempeña un papel importante en la fisiopatología de diversos trastornos vasculares, tales como la ateroesclerosis y la reestenosis tras una angioplastia coronaria. En el estado de síntesis, las SMC producen asimismo unas cantidades superiores de endopeptidasas extracelulares, factores 10 de crecimiento y citocinas, y secretan una matriz extracelular fibrosa. Tras la lesión de la pared del vaso, la liberación de diversos factores de crecimiento y/o factores quimiotácticos tanto por parte de monocitos, macrófagos o trombocitos circulantes, como por parte de las células endoteliales lesionadas puede provocar que las SMC cambien del fenotipo contráctil al sintético y pueden dirigir la migración de las SMC hacia la íntima del vaso. Entre dichos factores, parece 15 ser que uno de los más importantes es el bFGF pero, sin embargo, las SMC pueden iniciar asimismo la migración como respuesta a estímulos angiogénicos (Schwartz, 1997, *J. Clin. Invest.*, 99: 2814-2816; Van Leeuwen, 1996, *Fibrinolysis*, 10: 59-74).

Al tratar de definir el efecto y el mecanismo mediante el que HMGB1 provoca la migración celular de las RSMC, los presentes inventores demostraron que la HMGB1 es un fuerte factor quimiotáctico y que provoca cambios en su 20 forma celular y la reorganización del citoesqueleto. Dichos episodios se inhiben mediante la adición de un anticuerpo anti-RAGE y la toxina de la tos ferina, lo que pone de manifiesto que tanto el RAGE y como la proteína G_{i/o} pueden estar implicados en la vía. Además, las pruebas de que la HMGB1 estimula la translocación de las proteínas fosforiladas ERK 1 y 2 en el núcleo, indican la implicación de la vía de la MAP cinasa. Entonces se ha demostrado que la HMGB1 se libera con la lesión o la necrosis de diversos tipos celulares, entre ellos las células endoteliales.

25 Por lo tanto, la HMGB1 presenta todas las características de una molécula que puede estimular la ateroesclerosis y la reestenosis tras una lesión vascular.

Los presentes inventores demostraron asimismo que fragmentos de HMGB1, que corresponden a secuencias de la 30 HMG, son más eficaces que la molécula entera con toda su longitud e incluso los dominios de la secuencia de la HMG de otras proteínas de la familia de la secuencia de la HMG pueden provocar los mismos efectos.

Por consiguiente, cada tipo de molécula con capacidad para bloquear la interacción entre la HMGB1 y su receptor RAGE (es decir todas las moléculas que pertenecen a la clase de los inhibidores: anticuerpos o fragmentos de 35 anticuerpos, ADN tetracatenario; y todas las moléculas que pertenecen a la clase antagonista de la secuencia de la HMG: moléculas de fragmentos de HMGB1 que contienen el dominio de la secuencia de la HMG) se pueden utilizar eficientemente en la producción de preparaciones farmacéuticas para evitar, retardar o inhibir la ateroesclerosis y la reestenosis tras una lesión en el epitelio vascular incluso debido a la angioplastia.

40 Las moléculas de enlace con HMGB1 o los inhibidores de la HMGB1 se pueden inyectar o liberar con instrumentos que se utilizan en cirugía angioplástica, o dichas moléculas se pueden enlazar a la superficie de los instrumentos.

La presente invención se define en las reivindicaciones.

45 El objetivo de la presente invención es la utilización de moléculas que puedan bloquear la interacción entre la HMGB1 y el RAGE para la preparación de fármacos para el tratamiento de las enfermedades vasculares.

En una forma de realización preferida de la presente invención dichas moléculas se liberan mediante catéteres, instrumentos quirúrgicos o endoprótesis vasculares para la angioplastia, durante o después de dicha intervención.

50 Las características y ventajas adicionales de la presente invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada haciendo referencia a los dibujos adjuntos. En los dibujos:

La figura 1 representa la actividad quimiotáctica de la HMGB1 en las RSMC en los ensayos de quimiotaxis realizados utilizando cámaras de Boyden modificadas. El valor del 100% corresponde al número de células que migran a falta de cualquier estimulador (migración celular aleatoria). Los datos representan la media ± DT (n = 3). La figura 1-A 55 representa la respuesta migratoria que depende de la concentración de las RSMC con respecto a la HMGB1 purificada a partir del timo de ternera. La figura 1-B representa la comparación del efecto quimiotáctico de la proteína HMGB1, tanto purificada a partir del timo de ternera como expresada en levadura, con el de los de factores quimiotácticos fMLP y bFGF. La figura 1-C representa el efecto de anticuerpos anti-HMGB1 en la migración provocada por el fMLP y la HMGB1. El asterisco (*) indica tratamientos en los que la respuesta migratoria resultó estadísticamente distinta de la del control más allá del límite p = 0,0001 en la prueba t de Student. La figura 1-D representa la respuesta migratoria 60 que depende de la concentración de las RSMC con respecto a la HMGB1 expresada en levadura (*Pichia pastoris*).

65 La figura 2 representa el efecto de la HMGB1 en la morfología de las RSMC y la organización del citoesqueleto. La figura 2-A representa el efecto de HMGB1 purificada a partir del timo de ternera o expresada en levadura o en *E. coli* en cultivos subconfluentes de RSMC. Se visualizaron los filamentos de actina utilizando TRIC-faloidina. La figura 2-B representa como los anticuerpos de conejo anti-HMGB1 inhiben la reorganización del citoesqueleto estimulada por

ES 2 346 408 T3

la HMGB1. Las células en reposo (estado 1) presentan numerosas fibras en tensión. Las células que no se encuentran en reposo (estado 2) presentan una reorganización del citoesqueleto de actina.

La figura 3 representa la respuesta quimiotáctica de las RSMC a los dominios de la secuencia de la HMG de la HMGB1. La figura 3-A representa la respuesta que depende de la concentración a la Secuencia A y la Secuencia B, ambas expresadas en *E. coli*. Se hace referencia a la migración celular aleatoria como una migración del 100%. Los datos representan la media \pm DT (n = 3). La significación estadística del resultado es $p < 0,0001$ en un modelo de análisis de la varianza, para tanto la Secuencia A como la Secuencia B. La figura 3-B representa los efectos de la HMGB1 completa expresada en *E. coli*, la Secuencia A + B, la Secuencia A o la Secuencia B en la organización del citoesqueleto de actina. Se visualizaron los filamentos de actina utilizando TRIC-faloidina.

La figura 4 representa los efectos de la HMGB1 y de sus secuencias de la HMG en la migración de las RSMC en una herida. El valor del 100% corresponde al número de células que migran a falta de algún estimulador (migración basal). Los datos representan la media \pm DT (n = 5). La significación estadística es de $0,05 < p < 0,01$ para el tratamiento con bFGF y HMGB1 completa sintetizada por bacterias, $0,01 < p < 0,001$ para el tratamiento con la Secuencia A y la Secuencia B y $0,001 < p < 0,0001$ para el tratamiento con HMGB1 de timo de ternera.

La figura 5 representa como la HMGB1 se enlaza con la superficie de las RSMC y estimula la motilidad celular mediante el RAGE. La figura 5-A representa grandes cantidades de HMGB1 enlazándose con la superficie de las RSMC. En la figura 5-B se representan las RSMC que expresan el RAGE. La figura 5-C representa como el anticuerpo anti-RAGE inhibe la migración de las RSMC provocada por la HMGB1. La significación estadística es de $0,001 < p < 0,0001$ para el tratamiento con HMGB1 y HMGB1 más un anticuerpo inespecífico.

La figura 6 representa como la toxina de la tos ferina (PT) inhibe la migración de las RSMC provocada por la HMGB1 y la reorganización del citoesqueleto de actina. En la figura 6-A se representan los ensayos de quimiotaxis realizados utilizando cámaras de Boyden modificadas. El valor del 100% corresponde a la migración basal celular en ausencia de cualquier estimulador; los datos representan la media \pm DT. La figura 6-B representa la reorganización evidente del citoesqueleto, los filamentos de actina se visualizaron utilizando TRITC-faloidina conjugada.

La figura 7 demuestra que la vía de la MAP cinasa se encuentra implicada en la señalización de la HMGB1. Se tiñen las células con un anticuerpo específico contra la ERK1/2 fosforilada y la DAPI, y se tiñen unas muestras separadas de células con TRITC-faloidina para visualizar la reorganización del citoesqueleto.

La figura 8 representa la liberación de la HMGB1 por parte de células necróticas y lesionadas. La figura 8-A representa los resultados del análisis de inmunotransferencia de tipo Western de las proteínas liberadas por las HeLa necróticas o permeabilizadas; la presencia de HMGB1 resulta evidente en la serie 1 y la serie 3. La figura 8-B representa los resultados de los ensayos de inmunofluorescencia realizados en HeLa necróticas y vivas.

La figura 9 representa como la HMGB1 se encuentra presente en los núcleos de las células endoteliales, pero no en los de las SMC vasculares. En la figura 9-A y en la figura 9-B se representa como la HMGB1 se encuentra presente en los núcleos de las células endoteliales pero no se puede detectar en los núcleos de fibras de músculo liso vascular de una sección de la arteria pancreática humana teñida con el anticuerpo anti-HMGB1 y sometida a tinción de contraste con hematoxilina, a un aumento bajo (A) y elevado (B). Los marcos rojos indican la posición del área representada en la figura B y las flechas señalan los núcleos de las SMC. En la figura 9-C el análisis de inmunotransferencia de tipo Western representa el nivel de expresión de la HMGB1 en las RSMC en comparación con las células HeLa.

La figura 10 representa el efecto quimiotáctico de la HMGB1 en fibroblastos embrionarios de ratón en ensayos de quimiotaxis realizados utilizando cámaras de Boyden modificadas, en presencia o a falta de anticuerpos anti-RAGE (1000 ng/ml). El valor del 100% corresponde al número de células que migran a falta de algún estimulador (migración celular aleatoria). Los datos representan la media \pm DT (n = 3).

Expresión y purificación de la HMGB1 y derivados

En la primera etapa, ha resultado necesario expresar y purificar la HMGB1 y derivados.

La expresión de la HMGB1 completa se realizó en *E. coli* sometida a transformación con el plásmido pT7-7-rHMGlcm (cortesía del Prof. J. O. Thomas, Cambridge University) y se realizó la purificación siguiendo un protocolo muy conocido (Muller *et al.*, 2001, *Biochemistry*, 40: 10254-10261).

La expresión y la purificación de la HMGB1 completa en la levadura *Pichia Pastoris* se realizó siguiendo un protocolo muy conocido (Mistry *et al.*, 1997, *Biotechniques*, 22: 718-729).

Los conocidos plásmidos pRNHMG1/M1-V176, pT7HMG1bA y pT7HMG1bB se utilizaron en la expresión y purificación de la Secuencia A + la Secuencia B, la Secuencia A y la Secuencia B respectivamente siguiendo procedimientos muy conocidos de purificación de secuencias simples y dobles (Bianchi *et al.*, 1992, *EMBO J.*, 11: 1055-1063).

Para demostrar el efecto quimiotáctico de la HMGB1, se realizaron tres ensayos independientes de migración celular: ensayo de quimiotaxia, ensayo de quimiocinesis y ensayo de heridas *in vitro*. Se investigó la relación funcional entre migración celular provocada por la HMGB1 y los cambios morfológicos (es decir, reorganización de las fibras de actina, elongación celular y polarización de la forma celular) de las células que no se encuentran en reposo.

5

Ensayo de quimiotaxia

Se realizaron los ensayos de quimiotaxia utilizando protocolos muy conocidos (Degryse *et al.*, 1999, *Blood*, 94: 10 649-662). Se utilizaron cámaras de Boyden modificadas con filtros que presentaban un tamaño de poro de 0,5 μm (Corning, Acton, MA) y se trataron con colágeno I (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en ácido acético 0,5 M) y fibronectina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Roche). Las células RSMC (cortesía del Dr. Marco Bertulli, Bayer Research Laboratories, Milán) se cultivaron en DMEM sin suero y se añadió una muestra de 20.000 a 40.000 células al pocillo superior de la cámara de Boyden. Las 15 moléculas a analizar se diluyeron en el mismo medio sin suero y se añadieron al pocillo inferior.

15

Se utilizaron distintas preparaciones de HMGB1: HMGB1 purificada a partir del timo de ternera (cortesía de J. Bernués, C.S.I.C., Barcelona, España), HMGB1 recombinante expresada en *E. coli*, y una forma ligeramente modificada de HMGB1 (que contenía los aminoácidos EAEAYVEF enlazados en el extremo N) producida en la levadura *Pichia pastoris* (Mistry *et al.*, 1997, *Biotechniques*, 22: 718-729).

20

Si resultaba necesario, se añadieron a ambos pocillos el anti-HMGB1 políclonal de conejo (Pharmingen BD, Torrey Pines, CA), la toxina de la tos ferina (PT) obtenida de *Bordetella pertussis* (cortesía del Dr. M. G. Pizza, I.R.I.S., Siena) o los inhibidores.

25

Se permitió la migración celular durante la noche a 37°C, a continuación se desprendieron las células que permanecían en la superficie superior de los filtros y se fijaron los filtros en metanol y se tiñeron en una disolución de violeta cristal al 10% en metanol al 20%. Se realizaron todos los experimentos por lo menos dos veces por triplicado.

30

Los resultados, tal como se representan en las figuras 1-A, 1-B, 1-C, 1-D, son la media \pm DT del número de células contadas en 10 campos de gran potencia por filtro y expresadas como número de veces con respecto al control. A la migración celular aleatoria (es decir, la migración a falta de factor quimiotáctico) se le otorgó el valor arbitrario del 100%.

35

Se realizó el análisis estadístico utilizando la prueba t de Student para comparación de datos aparejados de los tratamientos, o un modelo de análisis de la varianza para evaluar los tratamientos con dosis crecientes de un reactivo.

40

La HMGB1 procedente del timo de ternera estimula la migración de las RSMC de un modo que depende de la concentración, partiendo de dosis bajas de 0,1 ng/ml y con una respuesta máxima de 2,5 veces a 100 ng/ml (véase la figura 1-A). El efecto de la HMGB1 es comparable en amplitud a los efectos los factores quimiotácticos bien caracterizados fMLP y bFGF (véase la figura 1-B). Los anticuerpos políclonales contra la HMGB1, pero no los anticuerpos específicos de control, bloquean completamente la respuesta migratoria (véase la figura 1C), demostrando que ello se debe específicamente a la HMGB1. Dichos anticuerpos no consiguen alterar el efecto del péptido del factor quimiotáctico fMLP utilizado como control positivo. Se obtienen unos resultados similares con la HMGB1 recombinante producida en la levadura *P. pastoris* (véase la figura 1-D).

45

Ensayo de inmunofluorescencia

50

Se sembraron unas muestras de 15.000 a 20.000 RSMC, con un 20-40% de confluencia, 2 en cubreobjetos de cristal en pocillos de 2 cm y se cultivaron durante 24 horas en DMEM más FCS al 10%, se lavaron con PBS y se cultivaron durante otras 24 horas en DMEM sin FCS. Se estimularon las RSMC con 100 ng/ml de HMGB1 durante unos intervalos de tiempo crecientes, desde 5 a 120 minutos a 37°C. Tras la estimulación, se fijaron las RSMC durante 20 minutos a temperatura ambiente con una disolución de paraformaldehído al 3%, sacarosa al 2% en PBS, a un pH de 7,5, seguido por tres lavados con PBS-BSA al 0,2%. Se permeabilizaron las células con Hepes 20 mM a un pH de 7,4, sacarosa 300 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, Triton X-100 al 0,5% (v/v) durante 3 minutos a 4°C, y se lavaron de nuevo tres veces con PBS-BSA al 0,2%. A continuación, se incubaron las RSMC con PBS-BSA al 2% durante 15 minutos a 37°C, con anticuerpos primarios durante 30 minutos a 37°C, se lavaron tres veces con PBS-BSA al 0,2%, y se continuaron incubando con PBS-BSA al 2% durante 15 minutos. Al final, se tiñeron las células con anticuerpos secundarios y/o faloidina conjugada con rodamina para la visualización de la actina filamentosa; en algunos casos, se 55 utilizó DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo, Roche) para marcar el núcleo.

60

Tras la incubación posterior, se lavaron tres veces los cubreobjetos con PBS-BSA al 0,2%, dos veces con agua desilada, se montaron con Mowiol al 20% en PBS y se analizaron en un microscopio Axiophot (Carl Zeiss). Se tomaron fotografías de fluorescencia en película T-Max 400 o EPH P1600X (Eastman Kodak) utilizando lentes Neofluar Zeiss 40 y 100.

65

Las fotografías de poco aumento de la figura 2-A representan como la concentración de fibras en tensión, la forma y el tamaño celular, y la organización del citoesqueleto cambian en 30 minutos, pero se invierten tras 120 minutos.

ES 2 346 408 T3

Las fotografías de gran aumento (véase la figura 2-B) representan como antes de la estimulación resultan muy visibles numerosas fibras en tensión y la forma celular no está polarizada. En un período de 15 a 30 minutos, se produce un cambio completo de morfología y organización del citoesqueleto: las RSMC presentan una morfología alargada y polarizada que refleja la reestructuración espacial del citoesqueleto de actina. Los efectos de la HMGB1 disminuyen lentamente: al cabo de 1-2 horas, la concentración de fibras en tensión aumenta de nuevo hasta el nivel inicial y la morfología celular vuelve a una similar a la de las células de control sin estimular.

En determinados experimentos, se trataron previamente las células durante la noche con anticuerpos o PT o inhibidores. Tal como se representa en la figura 2-B, los anticuerpos contra la HMGB1 inhiben completamente la reorganización del citoesqueleto y el cambio morfológico de las RSMC provocado por la HMGB1. Los anticuerpos de control no pueden inhibir los efectos de la HMGB1.

Por último, para determinar si los efectos observados de la HMGB1 en las RSMC reflejan realmente una transición dinámica de los estados de reposo a los móviles, se cuantificó la proporción de células en cada estado distinto. Se tomaron fotografías de poco aumento y se clasificaron las células en dos estados:

- estado 1, en el que las células presentan el aspecto típico de las células sin estimular caracterizado por un número elevado de fibras en tensión y una forma celular no polarizada;
- estado 2, en el que las RSMC presentan una baja concentración de fibras en tensión, erizamiento de la membrana, semianillos de actina o una forma alargada.

Se representa claramente en la figura 2-C que en los cultivos sin estimular el 60% de las células se encuentran en el estado 1 y el 40% en el estado 2; 5 minutos después de la estimulación, la proporción de células en estado 2 aumenta hasta el 60%, y alcanzó el 80% tras 15-30 minutos. Una hora después de la estimulación con HMGB1, dichas proporciones volvieron a los valores de los cultivos sin estimular, con un 60% de RSMC en el estado 1 y un 40% en el estado 2. Dichos datos demuestran que los efectos de la HMGB1 son transitorios y representan el cambio de un estado de reposo a uno de migración, confirmando dichos datos los resultados de la quimiotaxis: la HMGB1 es un factor quimiotáctico para las RSMC.

30

Ensayo de heridas in vitro

Unos cultivos confluentes de RSMC, sembrados en cubreobjetos de cristal en pocillos de 2 cm², se lavaron una vez con PBS, y se dejaron sin nutrir con FCS durante 24 horas en DMEM sin suero. A continuación, para estimular la herida, se realizó una línea simple con la punta de una pipeta en la región central de las monocapas. Las monocapas tratadas de este modo se lavaron una vez con PBS y se dejaron recuperar durante 48 horas en un medio sin suero enriquecido o no con HMGB1 (100 ng/ml). A continuación se fijaron las células y se tiñeron con TRITC-faloidina. Se realizó la cuantificación de la migración tomando fotografías de bajo aumento y contando el número de células que habían migrado hacia el espacio sin células. Los datos representan la media ± DT y el valor 100% corresponde al número de células que migran a falta de algún estimulador (migración basal).

Tal como se representa en la figura 4, la estimulación con la HMGB1 aumenta el número de células que migran 5-2 veces. Se analizaron asimismo la Secuencia A y la Secuencia B (10 ng/ml) y ambas estimulan la migración celular 1,8 veces. Por último, la comparación con el bFGF (50 ng/ml) pone de manifiesto que las moléculas mencionadas anteriormente son más efectivas. Resulta posible suponer que la cicatrización de las heridas se basa en la misma vía de señalización de la quimiotaxis y de la quimiocinesis.

50 Vía de señalización

A continuación se ha detectado la vía de señalización.

Para que actúe como señal de migración, la HMGB1 ha de alcanzar la membrana de las células sensibles y enlazarse con un receptor. Para analizar si la HMGB1 se enlaza con la superficie de las RSMC, un millón de células se sometieron a tripsina y se incubaron durante 20 minutos a 4°C en PBS que contenía 800 ng del péptido de la Secuencia A + B y 5 pg de BSA. El polipéptido de la Secuencia A + la Secuencia B es ligeramente menor que la HMGB1 endógena completa y, por lo tanto, se puede distinguir con facilidad en los geles SDS-PAGE. A continuación, se sedimentaron las células y se guardó el sobrenadante; tras dos lavados en 500 µl de PBS frío, se volvieron a suspender las células en una disolución amortiguadora para la muestra de SDS-PAGE, se calentaron durante 5 minutos a 100°C y se cargaron en un gel de tricina-SDS al 12% (serie P), adyacente a 20 µl de sobrenadante (serie S). A continuación, se procedió a la transferencia del gel en un filtro Immobilon, que se tiñó con tinta china.

En la figura 5-A se representa un gel SDS-PAGE, a partir del que se puede calcular la cantidad de Secuencia A + B recuperada en el sedimento celular y en el sobrenadante, y se puede estimar que más que 500.000 moléculas de la Secuencia A + B se enlanzan con una única RSMC. Este resultado demuestra que la HMGB1 extracelular se puede enlazar con las RSMC, pero muy probablemente no refleja el número real de receptores. Por supuesto, ya se ha demostrado que la HMGB1 se enlaza con la heparina y los proteoglicanos (Bianchi, 1988, *EMBO J.*, 7: 843-849;

Nair y Jungalwala, 1997, *J. Neurochem.*, 68: 1286-1297; Salmivirta *et al.*, 1992, *Exp. Cell Res.*, 200: 444-451); por lo tanto, se puede relacionar asimismo la HMGB1 con la matriz extracelular producida por las RSMC, tal como ya demostraron los presentes inventores con las HeLa, en las que únicamente unas cantidades pequeñas de HMGB1 se enlazan con las células ya que dichas células producen poca matriz extracelular.

5 Se ha descrito que la HMGB1 se enlaza con el RAGE que se expresa en una amplia gama de tipos celulares. Para demostrar que el RAGE se encuentra presente en la membrana de las RSMC, se procedió a la lisis de un millón de RSMC en una placa que contenía disolución amortiguadora para la muestra de SDS-PAGE (50 mM de Tris a un pH de 6,8, 2-mercaptopropanoal 2%, SDS al 4%, glicerol al 12%, azul de bromofenol al 0,05%), se desnaturizaron durante 5 minutos a 100°C y se separaron en acrilamida al 12%. Las proteínas separadas se sometieron a inmunotransferencia en una membrana Immobilon (Millipore) utilizando un sistema de inmunotransferencia en recipiente con 25 mM de Tris a un pH de 7,5, glicina 0,192 M, metanol al 20%. Se bloqueó la inmunotransferencia durante una hora a temperatura ambiente en 5% leche desnatada/TBST (20 mM de Tris, a un pH de 7,5, NaCl 137 mM, Tween 20 al 0,1%), se lavó tres veces en TBST, y se incubó con anticuerpos anti-HMGB1 en TBST-BSA al 0,01%. Se realizó la incubación 10 con anticuerpos secundarios tras lavar con TBST-BSA al 0,01%. Se detectaron las proteínas con un sistema ECL (Amersham). Se detectó la presencia de RAGE utilizando anticuerpos anti-RAGE (cortesía de Dr. A. M. Schmidt, Columbia University, NY). Los resultados representados en la figura 5-B demuestran que el RAGE se encuentra 15 presente en las RSMC. Además, la quimiotaxis provocada por la HMGB1 no se inhibe únicamente con anticuerpos anti-HMGB1 sino también con anticuerpos anti-RAGE, tal como se representa en la figura 5-C. Los anticuerpos anti-RAGE bloquean la reorganización del citoesqueleto y los cambios morfológicos de las RSMC como respuesta a la 20 señal de migración de la HMGB1; los anticuerpos irrelevantes no pueden bloquear la reorganización del citoesqueleto.

Estos datos indican que el receptor RAGE receptor es necesario para las respuestas provocadas por la HMGB1 de las RSMC.

25 Conociendo que diversos factores quimiotácticos actúan mediante los receptores de membrana asociados a proteínas de enlace con la GTP heterotrimérica (proteínas G), se analizó si las proteínas G podrían estar implicadas en la señalización de la HMGB1. Se utilizó la toxina de la tos ferina (PT) ya que inhibe una subclase específica de proteínas G, las proteínas Gi/o, y pone de manifiesto su implicación en la vía de señalización (Baggiolini *et al.*, 1994, *Adv. Immunol.*, 55: 97-179; Haribabu *et al.*, 1999, *J. Biol. Chem.*, 274: 37007-37092). Se utilizó la mPT, un mutante inactivo de la PT, como control. Se trataron previamente las RSMC con PT o con mPT (50 ng/ml) durante 6 horas, estimuladas de este modo con la HMGB1 (100 ng/ml), la Secuencia A o la Secuencia B (10 ng/ml) durante 30 minutos. Los ensayos de quimiotaxis se realizaron tal como se ha descrito anteriormente. Los datos representan la media ± DT y el valor del 100% corresponde a la migración basal a falta de algún estimulador. En la figura 6-A se representa el efecto inhibidor 30 efecto de la PT en la quimiotaxis provocada por la HMGB1. Dichos datos indican la implicación de las proteínas Gi/o en la vía de señalización controlada por la HMGB1. En la figura 6-B se representa la reorganización del citoesqueleto, los filamentos de actina se visualizaron tal como se ha descrito anteriormente. A continuación se investigó si la señalización provocada por la HMGB1 implica la vía de la MAP cinasa; de hecho, se conoce que dichas proteínas se activan 35 con los RAGE y que desempeñan un papel directo en la regulación de la maquinaria de la motilidad intracelular. Se trataron previamente las RSMC con PD98059 (50 mM) durante una hora o no se sometieron a un tratamiento previo, se estimularon durante 30 minutos con HMGB1 de timo de ternera (100 ng/ml) y se tiñeron con anticuerpos específicos contra la ERK1/2 fosforilada (New England Biolabs, Beverly, MA) y DAPI. Una muestra separada de células se tiñó con TRITC-faloidina para visualizar la reorganización del citoesqueleto. En la figura 7 se representa como, 40 antes de 30 minutos, la estimulación con la HMGB1 provoca la activación de las proteínas ERK1/2 en las RSMC y provoca su translocación nuclear; en cambio, las proteínas ERK fosforiladas difícilmente se pueden detectar y localizar en el citoplasma de las RSMC sin estimular. Además, el PD98059, el inhibidor selectivo de la MEK, el regulador retrógrado de las ERK, inhibe la fosforilación de las ERK provocada por la HMGB1 y la translocación nuclear, así 45 como la migración y la reorganización del citoesqueleto de las RSMC. Por consiguiente, dichos datos demuestran que la vía de la MAP cinasa desempeña un papel esencial en la migración celular provocada por la HMGB1.

50

Provocación de daños celulares

Considerando el estado de la técnica, se ha detectado si las células lesionadas o las células que están experimentando necrosis pueden liberar la HMGB1 en el medio extracelular.

55 Se provocaron las células HeLa y HUVEC para que experimentaran necrosis mediante un tratamiento con 5 μ M de ionomicina (Sigma) y 20 μ M de CCCP, o mM de desoxiglucosa y azida sódica 10 mM. Tras 16 horas a 37°C, se valoró morfológicamente el número de células que experimentaban la necrosis y, cuando se aproximó al 50% se recogió el sobrenadante.

60 Para el análisis de inmunotransferencia de tipo Western, se recogió el medio procedente de las células tratadas y sin tratar y se concentró 50 veces utilizando filtros Amicon Ultrafree-MC; se disolvieron las células en la disolución amortiguadora para la muestra de SDS-PAGE.

65

Para el análisis de inmunofluorescencia, se fijaron las células con PFA al 4%, se incubaron con un anticuerpo anti-HMGB1, y se tiñeron con un anticuerpo secundario y DAPI. La permeabilización de las células se realizó utilizando NP-40 al 0,1% en PBS.

En la figura 8-A se representa el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la proteína en los sobrenadantes (S) y sedimentos celulares (P). La HMGB1 se recuperó en el sobrenadante de tanto las células necróticas como de las células lesionadas. En la figura 8-B se representan los ensayos de inmunofluorescencia realizados en HeLa vivas y necróticas simples. La HMGB1 no está relacionada con los restos de células necróticas.

5 En la figura 9 se representan los resultados de los ensayos de inmunohistoquímica. Dichos datos confirman que la HMGB1 se encuentra en los núcleos de células endoteliales que recubren las arterias humanas pero no en los núcleos de las RSMC (la figura 9-A a poco aumento; la figura 9-B a gran aumento). De hecho, la mayoría de los núcleos de las fibras musculares lisas contienen cantidades indetectables de HMGB1 (cuadro de la figura 9-B). En la figura 9-C, el análisis de inmunotransferencia de tipo Western representa el nivel de expresión de la HMGB1 en las RSMC en comparación con las células HeLa y demuestra que los cultivos *in vitro* de RSMC contienen unas cantidades bajas de HMGB1 en comparación con las células HeLa.

10 15 En conjunto, dichos datos indican que las moléculas HMGB1 que señalan las fibras musculares lisas vasculares se pueden originar simplemente por necrosis o lesiones mecánicas de las células próximas.

20 En resumen, los datos experimentales mencionados anteriormente, que constituyen la base de la presente invención, demuestran que la proteína nuclear HMGB1 es un fuerte mediador de la reestructuración vascular que se produce después de lesiones mecánicas y/o inflamaciones y la pueden liberar pasivamente las células lesionadas o necróticas.

25 En particular, dichos datos indican lo siguiente:

La HMGB1 actúa como factor quimiotáctico

30 35 La HMGB1 es un potente factor quimiotáctico como el bFGF o el fMLP en ensayos de quimiotaxis y ensayos de heridas, y estimula cambios en la forma celular y la organización del citoesqueleto similares a los observados con la pruropacina; dichos efectos se deben específicamente a la HMGB1 y no a contaminantes potenciales. Además, los anticuerpos dirigidos contra la HMGB1 inhiben sus efectos sobre la migración celular, mientras que los anticuerpos no específicos de control anticuerpos son incapaces de realizarlo.

El enlace con el RAGE desencadena la vía de señalización de la HMGB1 en las RSMC

40 45 Los experimentos descritos anteriormente demuestran que el RAGE se expresa en las RSMC, y los anticuerpos anti-RAGE inhiben el efecto de la HMGB1 en las RSMC.

50 Se confirmó que las MAP cinasas se encuentran implicadas en la migración celular provocada por la HMGB1 de las RSMC, ya que las ERK1/2 están fosforiladas y translocadas al núcleo celular mediante la estimulación con la HMGB1, y el inhibidor de la MEK PD98059 puede bloquear la migración celular provocada por la HMGB1. Los datos indican asimismo que una proteína G_{i/o} se encuentra implicada en el proceso que se activa mediante la HMGB1, ya que la migración celular provocada por la HMGB1 se puede bloquear con la toxina de la *Bordetella pertussis*. La proteína G se relaciona habitualmente a receptores de siete hélices transmembrana (7TM), pero hasta el momento no se ha descrito una relación directa entre el RAGE y la proteína G. Hasta la fecha, se desconoce si la HMGB1 necesita enlazarse a un receptor 7TM/receptor de la proteína G además de al RAGE, si una proteína G se encuentra implicada en un punto anterógrado con respecto al RAGE o en un mecanismo de retroalimentación.

Función paracrina de la HMGB1

55 La HMGB1 se libera de un modo sin regulación, lo que significa mediante la estimulación con citocinas o lipopolisacáridos, cuando las células están lesionadas mecánicamente o experimentan necrosis. De este modo, la HMGB1 puede señalar la lesión o la destrucción de una célula individual a una célula vecina de un modo paracrino. Las células que responden a la HMGB1 extracelular parecen contener muy poca HMGB1 en sí mismas, y prácticamente nada en el núcleo. Las RSMC contienen muy poca HMGB1 en comparación con las células HeLa o las células endoteliales y el escaso contenido de HMGB1 se ubica principalmente en el citoplasma. La migración de las RSMC tiende a concentrar la HMGB1 en su superficie en la parte anterior de la célula. Se puede suponer que las células sensibles a la HMGB1 podrían contener poca HMGB1 para reducir la probabilidad de respuestas inapropiadas a su propia HMGB1. La concentración de HMGB1 en la parte anterior de las células en migración podría provocar las respuestas provocadas por la HMGB1 en las células vecinas: la reubicación de moléculas implicadas en la migración celular, tales como las integrinas, el receptor de la urocinasa, o la c-Src, es una característica de la motilidad de las RSMC. La migración implica asimismo la activación de endopeptidasas extracelulares y la interacción entre la HMGB1 y el sistema de activación del plasminógeno puede facilitar la migración celular en la matriz extracelular.

65 *Papel de la HMGB1 en las vasculopatías*

Considerando la sensibilidad de las fibras musculares lisas a la HMGB1, la observación de que las células endoteliales contienen unas cantidades elevadas de HMGB1 mientras que las SMC vasculares contienen poca y la liberación

de HMGB1 de las células que sufren lesiones mecánicas, todos los resultados anteriores indican un posible papel de la HMGB1 durante la reorganización tisular que se produce en la ateroesclerosis y la reestenosis.

Los resultados experimentales descritos anteriormente permiten identificar las moléculas, objetivo de la presente invención, capaces de inhibir la interacción entre la HMGB1 y el receptor RAGE; dichas moléculas se clasifican, considerando sus características estructurales y funcionales, del siguiente modo:

1. Antagonistas de la HMGB1: fragmentos de HMGB1, análogos de la secuencia de la HMG, que pueden resultar más efectivos que la molécula entera, y proteínas que contienen dominios de la secuencia de la HMG, pudiendo estos dos últimos enlazarse con el receptor RAGE.

2. Inhibidores de la HMGB1: moléculas, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo y ADN tetracatenario, que se enlazan con el dominio de la secuencia de la HMG y evitan el enlace de la HMGB1 con el RAGE.

Dichas moléculas se utilizan ventajosamente en una preparación farmacológica que evite, retarde o minimice la ateroesclerosis y/o la reestenosis una vez se han producido lesiones del epitelio vascular, entre ellas aquellos episodios que tienen lugar después de una angioplastia.

Además, los inventores de la presente invención demostraron que la HMGB1 tiene un fuerte efecto biológico en los fibroblastos embrionarios de ratón. Resulta muy conocido que los fibroblastos son el principal componente celular de los tejidos conjuntivos y que son responsables de la síntesis y el mantenimiento de la matriz extracelular conjuntiva. Más particularmente, HMGB1 actúa *in vitro* como un potente factor quimiotáctico para los fibroblastos y los anticuerpos anti-RAGE bloquean dicho efecto.

Por consiguiente, se puede utilizar cada tipo de molécula que presente homología con la HMGB1, tal como la proteína completa, en la preparación de fármacos que se regulan positivamente, facilitando y/o provocando de este modo la migración celular de los fibroblastos. Del mismo modo, cada tipo de molécula capaz de bloquear la interacción entre la HMGB1 y su receptor RAGE (es decir todas las moléculas que pertenecen al grupo de los inhibidores: anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, ADN tetracatenario; y todas las moléculas que pertenecen a la secuencia del grupo de antagonistas de la HMG: fragmentos de HMGB1, moléculas que contienen el dominio de la secuencia de la HMG) se puede utilizar eficientemente en la producción de fármacos a fin de retardar o reducir la regeneración del tejido conjuntivo.

Un objetivo adicional de la presente invención es la utilización de la HMGB1, fragmentos de la HMGB1 que corresponden a la secuencia de la HMG, dominios de la secuencia de la HMG de otras proteínas que pertenecen a la familia de la secuencia de la HMG y otras proteínas de la familia de la secuencia de la HMG, en la preparación de fármacos que faciliten y/o provoquen la migración de los fibroblastos y, por consiguiente, regulen positivamente la regeneración del tejido conjuntivo.

Forma parte integral de la presente invención la utilización de todas las moléculas, antagonistas y/o inhibidores, que inhiban la interacción entre la HMGB1 y el receptor RAGE, en la preparación de fármacos que reduzcan, retarden y eviten la regeneración de los tejidos conjuntivos, tal como se precisa en los experimentos siguientes.

45 *Ensayo de quimiotaxis en fibroblastos*

Se realizaron ensayos de quimiotaxis utilizando protocolos muy conocidos (Degryse *et al.*, 1999, *Blood*, 94: 649-662). Se utilizaron cámaras de Boyden modificadas con filtros que presentaban un tamaño de poro de 0,5 µm (Corning, Acton, MA) y se trataron con colágeno I (100 µg/ml en ácido acético 0,5 M) y fibronectina (10 µg/ml) (Roche). Los fibroblastos embrionarios de ratón se cultivaron siguiendo protocolos muy conocidos (Calogero *et al.*, 1999, *Nat. Genet.*, 22: 276-280) y después de 24 horas de cultivo sin suero, se añadió una muestra de 20.000 a 40.000 células al pocillo superior de la cámara de Boyden. Se diluyó la HMGB1 recombinante expresada en *E. Coli* en el mismo medio sin suero y se añadió al pocillo inferior.

Los anticuerpos anti-RAGE (1000 ng/ml) (cortesía del Dr. A. M. Schmidt, Columbia University, NY) se añadieron a ambos pocillos.

Se permitió la migración celular durante la noche a 37°C, a continuación se desprendieron las células que permanecían en la superficie superior de los filtros y se fijaron los filtros en metanol y se tiñeron en una disolución de violeta cristal al 10% en metanol al 20%. Todos los experimentos se realizaron por lo menos dos veces por triplicado.

Los resultados, tal como se representa en la figura 10 son la media ± DT del número de células contadas en 10 campos de gran potencia por filtro y expresadas como el número de veces con respecto al control sin tratar. A la migración celular aleatoria (es decir, la migración a falta de factor quimiotáctico) se le asignó el valor arbitrario del 100%. Se realizó el análisis estadístico utilizando un modelo de análisis de la varianza para la evaluación de los tratamientos con dosis crecientes de un reactivo.

La HMGB1 recombinante expresada en *E. Coli* estimula la migración de los fibroblastos de un modo que depende de la concentración, partiendo de unas dosis bajas de 0,1 ng/ml y con una respuesta máxima a 100 ng/ml. A dosis superiores (1000 ng/ml) la respuesta es inferior a la del control. Los anticuerpos anti-RAGE (1000 ng/ml) bloquen completamente la respuesta migratoria (parte derecha del gráfico de la figura 10) demostrando que ello se debe 5 específicamente a la HMGB1.

Papel de la HMGB1 en la regulación de la regeneración del tejido conjuntivo

10 La sensibilidad de los fibroblastos a la HMGB1 indica un posible papel de la HMGB1 durante la remodelación del tejido conjuntivo que se produce después de lesiones debidas a episodios traumáticos o a intervenciones quirúrgicas. Además, el hecho de que los anticuerpos anti-RAGE bloquen dicha respuesta demuestra que la interacción entre la HMGB1 y el receptor RAGE en la superficie celular constituye la circunstancia básica que provoca la sensibilidad de los fibroblastos con respecto a la HMGB1.

15 En resumen:

20 - La HMGB1 y/o los fragmentos de la HMGB1 que corresponden a la secuencia de la HMG, los dominios de la secuencia de la HMG de otras proteínas que pertenecen a la familia de la secuencia de la HMG y otras proteínas 25 de la familia de la secuencia de la HMG se utilizan ventajosamente en preparaciones farmacéuticas que regulan positivamente, es decir facilitan y/o provocan la regeneración del tejido conjuntivo.

25 - cada tipo de molécula capaz de inhibir la interacción entre la HMGB1 y el RAGE, que pertenecen al grupo de antagonistas, (capaces de enlazarse al receptor RAGE), y que pertenecen al grupo de los inhibidores, (es decir capaces de enlazarse con el dominio de la secuencia de la HMG que bloquea el enlace de la HMGB1 con el receptor RAGE) se utilizan ventajosamente en preparaciones farmacéuticas que regulan negativamente, es decir, bloquean, retardan o reducen la regeneración del tejido conjuntivo.

30 **Referencias citadas en la descripción**

La presente lista de referencias citadas por el solicitante se presenta únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque la recopilación de las referencias se ha realizado muy cuidadosamente, no se pueden descartar errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina toda responsabilidad 35 en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 0047104 A [0004]

40 **Documentos citados en la descripción que no corresponden a patentes**

- **Bustin.** *Trends Biochem. Sci.*, 2001, vol. 26, 152-153 [0002]
- **Hardman et al.** *Biochemistry*, 1995, vol. 34, 16536-16607 [0002]
- **Read et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1993, vol. 21, 3427-3436 [0002]
- **Weir et al.** *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 1311-1319 [0002]
- **Müller et al.** *EMBO J.*, 2001, vol. 16, 4337-4340 [0003]
- **Calogero et al.** *Nat. Genet.*, 1999, vol. 22, 276-280 [0003] [0063]
- **Abraham et al.** *J. Immunol.*, 2000, vol. 165, 2950-2954 [0004]
- **Wang et al.** *Surgery (St. Luis)*, 1999, vol. 126, 389-392 [0004]
- **Wang et al.** *Science*, 1999, vol. 285, 248-251 [0004]
- **Passalacqua et al.** *FEBS Lett.*, 1997, vol. 400, 275-279 [0004]
- **Sparatore et al.** *Biochem. J.*, 1996, vol. 320, 253-256 [0004]
- **Fages et al.** *J. Cell Sci.*, 2000, vol. 113, 611-620 [0004]
- **Merenmies et al.** *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 16722-16729 [0004]

- **Parkkinen** *et al. J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 19726-19738 [0004]
- **Rauvala** *et al. J. Cell Biol.*, 1988, vol. 107, 2293-2305 [0004]
- 5 • **Parkkinen; Rauvala.** *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 16730-16735 [0004]
- **Hori** *et al. J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 25752-25761 [0005]
- 10 • **Brett** *et al. Am. J. Pathol.*, 1993, vol. 143, 1699-1712 [0005]
- **Nepper** *et al. J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 14998-15004 [0005]
- 15 • **Schmidt** *et al. Circ. Res.*, 1999, vol. 84, 489-497 [0005]
- **Huttunen** *et al. J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 19919-19924 [0005]
- **Taguchi** *et al. Nature*, 2000, vol. 405, 354-360 [0005]
- 20 • **Sakamoto** *et al. Biol. Pharm. Bull.*, 2001, vol. 24 (8), 906-911 [0006]
- **Yoh** *et al. Dig. Dis. Sci.*, 2002, vol. 47 (8), 1775-1781 [0006]
- **Schwartz.** *J. Clin. Invest.*, 1997, vol. 99, 2814-2816 [0008]
- 25 • **Van Leeuwen.** *Fibrinolysis*, 1996, vol. 10, 59-74 [0008]
- **Müller** *et al. Biochemistry*, 2001, vol. 40, 10254-10261 [0018]
- 30 • **Mistry** *et al. Biotechniques*, 1997, vol. 22, 718-729 [0019] [0023]
- **Bianchi** *et al. EMBO J.*, 1992, vol. 11, 1055-1063 [0020]
- **Degryse** *et al. Blood*, 1999, vol. 94, 649-662 [0022] [0063]
- 35 • **Bianchi.** *EMBO J.*, 1988, vol. 7, 843-849 [0039]
- **Nair; Jungalwala.** *J. Neurochem.*, 1997, vol. 68, 1286-1297 [0039]
- **Salmivirta** *et al. Exp. Cell Res.*, 1992, vol. 200, 444-451 [0039]
- 40 • **Baggiolini** *et al. Adv. Immunol.*, 1994, vol. 55, 97-179 [0042]
- **Haribabu** *et al. J. Biol Chem.*, 1999, vol. 274, 37007-37092 [0042]

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un antagonista de la HMGB1 y de moléculas inhibidoras, en la que la molécula se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo contra la HMGB1, o un fragmento de anticuerpo, o un ADN tetracatenario, o un fragmento de HMGB1 que compite con la HMGB1 por el enlace con el receptor e inhibe la activación del receptor, en la preparación de fármacos destinados al tratamiento de la reestenosis y/o de la ateroesclerosis.
- 10 2. Utilización de moléculas según la reivindicación 1, en la que la reestenosis comprende una reestenosis que se produce durante una angioplastia.
- 15 3. Utilización de moléculas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichas moléculas se liberan mediante catéteres, instrumentos quirúrgicos o endoprótesis vasculares para la angioplastia.
- 20 4. Utilización de una molécula de HMGB1 en la preparación de fármacos que estimulan la regeneración del tejido conjuntivo.
- 25 5. Utilización de una molécula de HMGB1 en la preparación de fármacos que estimulan la cicatrización de una herida.
- 30 6. Utilización de un antagonista de la HMGB1 y de moléculas inhibidoras, en la que la molécula se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo contra la HMGB1, o un fragmento de anticuerpo, o un ADN tetracatenario, o un fragmento de HMGB1 en la preparación de fármacos que retardan o reducen o bloquean la regeneración del tejido conjuntivo.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

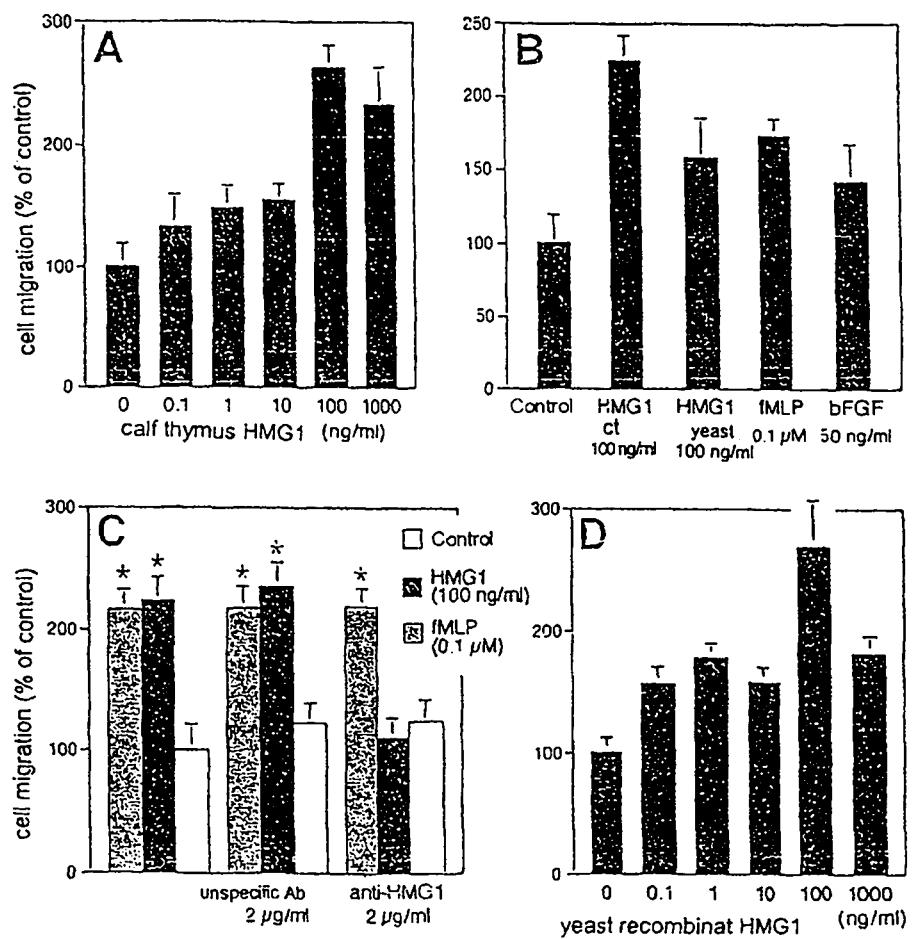


Figura 1

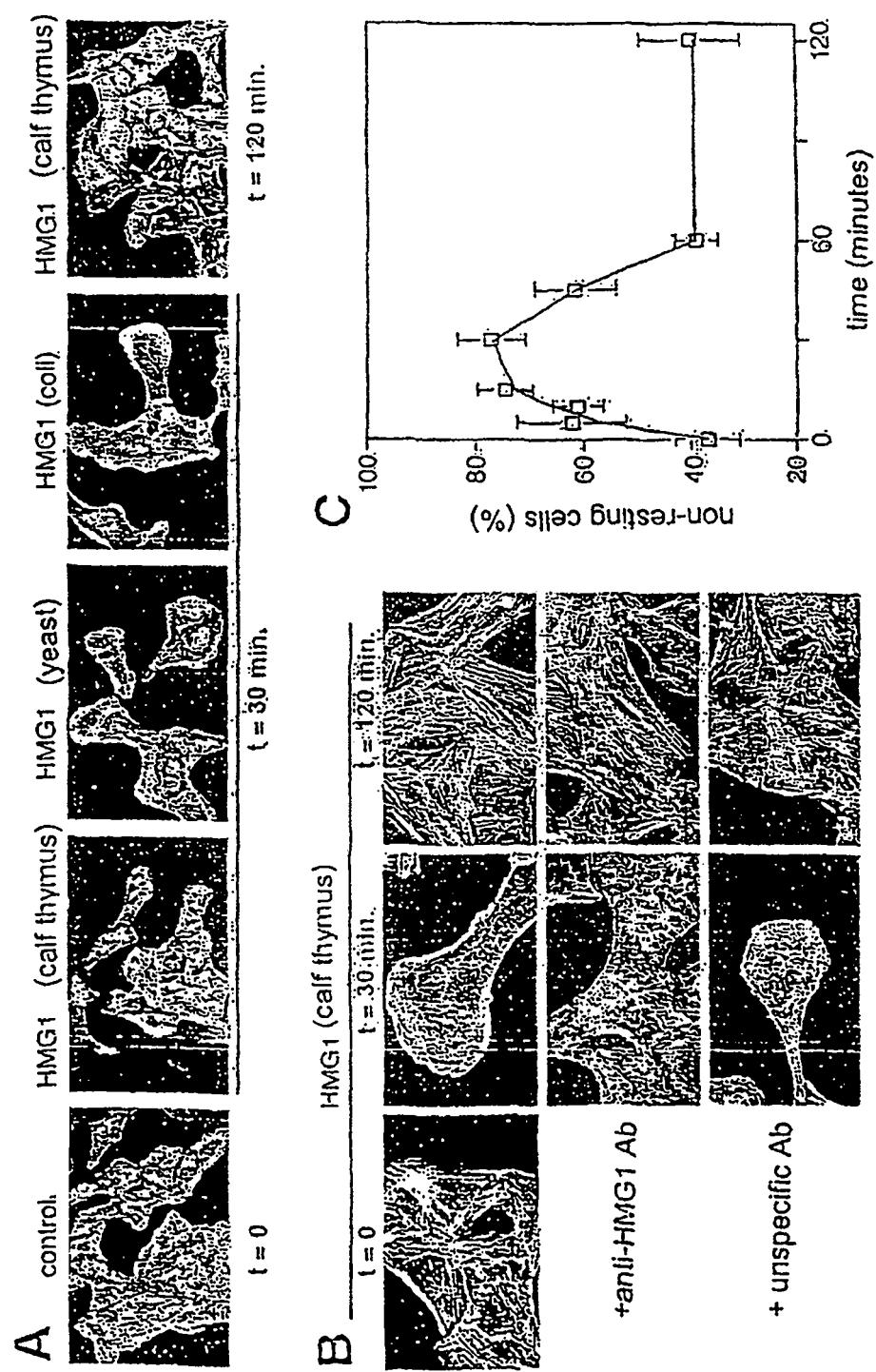


Figura 2

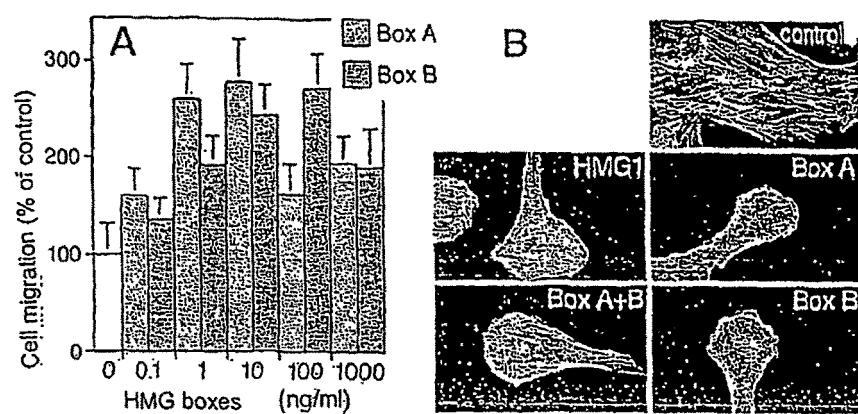


Figura 3

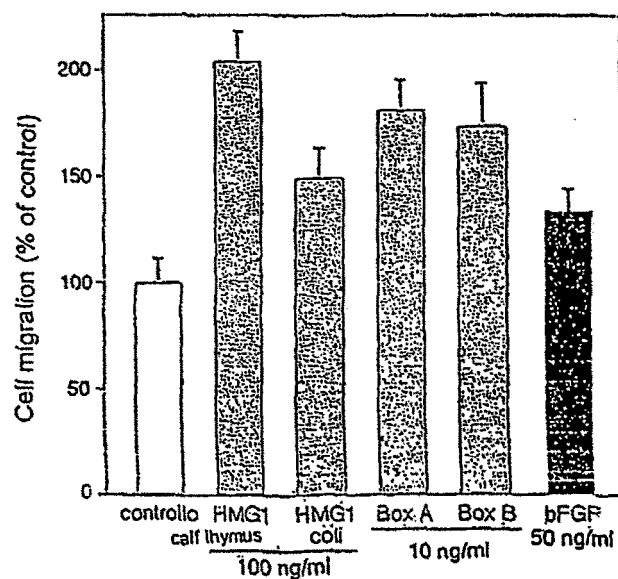


Figura 4

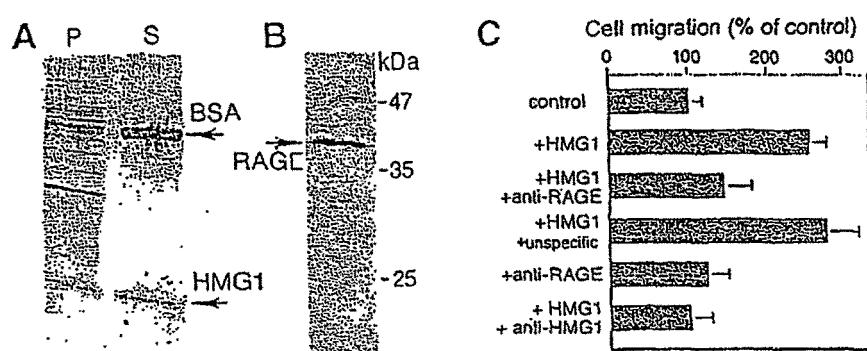


Figura 5

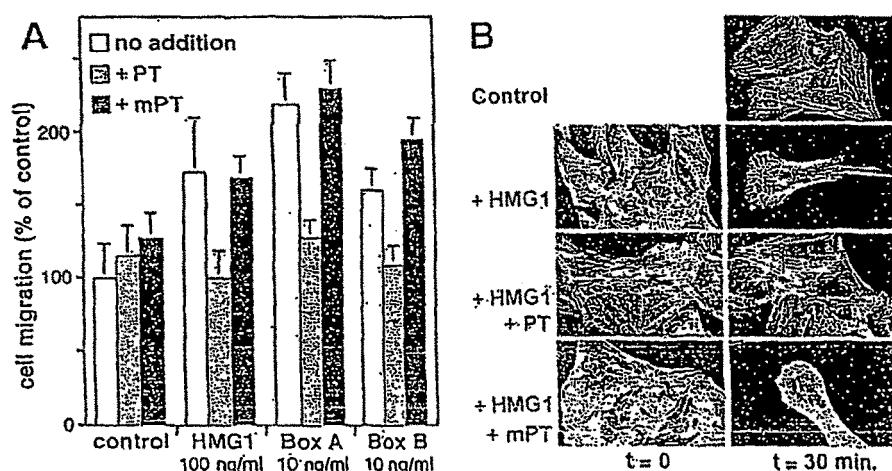


Figura 6

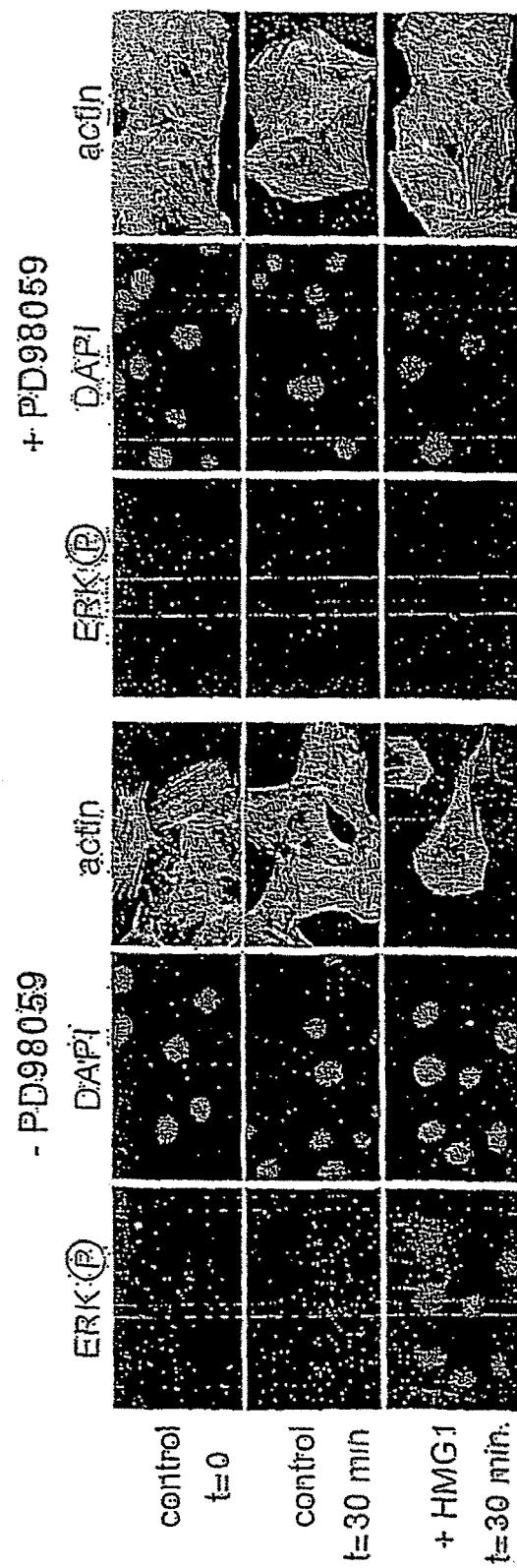


Figura 7

ES 2 346 408 T3

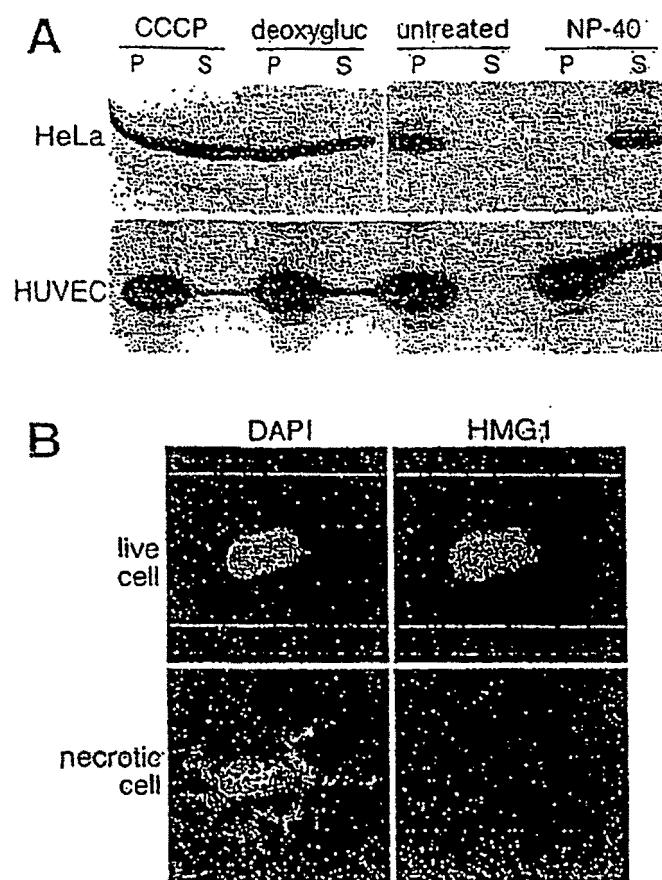


Figura 8

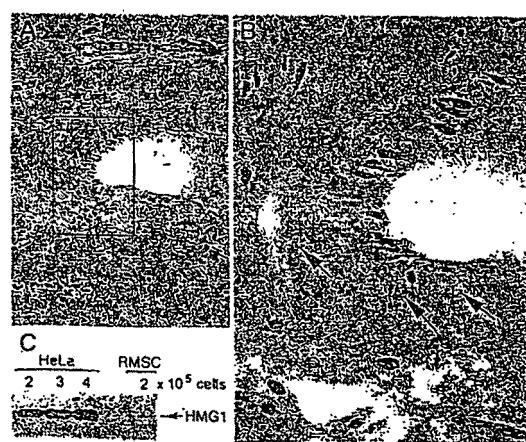


Figura 9

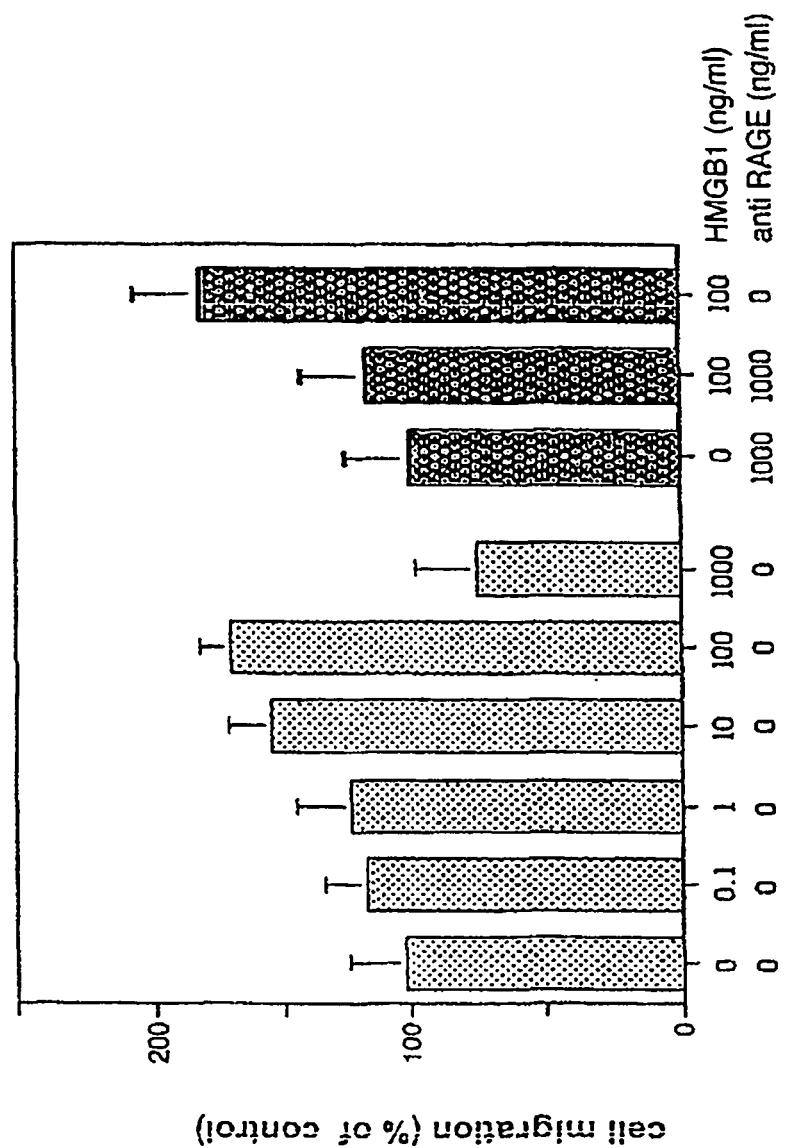


Figura 10

ES 2 346 408 T3

Figura 1A:

migración celular (% de control)
HMG1 de timo de ternera (ng/ml)

Figura 1B:

"yeast" = levadura

Figura 1C:

migración celular (% de control)
Ac inespecífico [En las figuras, traducir todos los
"Ab" por "Ac"]

Figura 1D:

HMG1 recombinante de levadura

Figura 2A:

control HMG1 (timo de ternera) HMG1 (levadura) HMG1
(coli) HMG1 (timo de ternera)

Figura 2B:

HMG1 (timo de ternera)
+ Ac anti-HMG1
+ Ac inespecífico

Figura 2C:

células que no se encuentran en reposo (%)
tiempo (minutos)

Figura 3A:

migración celular (% de control)
Secuencia A
Secuencia B
Secuencias de HMG (ng/ml)

Figura 3B:

control
HMG1
Secuencia A
Secuencia A + B
Secuencia B

Figura 4:

migración celular (% de control)

ES 2 346 408 T3

control HMG1 de timo de ternera HMG1 coli Secuencia A
Secuencia B bFGF

Figura 5C:

migración celular (% de control)

"unspecific" = inespecífico

Figura 6A:

migración celular (% de control)

sin adición

control HMG1 Secuencia A Secuencia B

Figura 7:

"actin" = actina

Figura 8A:

CCCP desoxiglucosa sin tratar NP-40

Figura 8B:

célula viva

célula necrótica

Figura 9:

"cells" = células

Figura 10:

migración celular (% de control)