



(10) **DE 600 28 358 T3** 2017.03.30

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 165 110 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 28 358.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/03583**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 91 5762.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/047104**
(86) PCT-Anmeldetag: **11.02.2000**
(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **17.08.2000**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.01.2002**
(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **31.05.2006**
(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: **16.11.2016**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.03.2017**

(51) Int Cl.: **A61K 38/00** (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:
248574 **11.02.1999** **US**

(73) Patentinhaber:
The Feinstein Institute for Medical Research,
Manhasset, N.Y., US

(74) Vertreter:
Patentanwälte Henkel, Breuer & Partner, 80333
München, DE

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:
TRACEY, Kevin, J., Old Greenwich, CT 06870, US;
WANG, Haichao, Edison, NJ 08820, US

(54) Bezeichnung: **HMG1 ANTAGONISTEN ZUR BEHANDLUNG VON ENTZÜNDUNGEN**

Beschreibung

Technisches Gebiet der Erfindung

[0001] Durch die vorliegende Erfindung erfolgt die Bereitstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung und eines Verfahrens zur Behandlung von Erkrankungen, die durch eine Aktivierung einer Entzündungscytokinkaskade gekennzeichnet sind, insbesondere, wie hierin explizit beansprucht, von Sepsis, umfassend, wie hierin offenbart aber nicht explizit beansprucht ist, septischer Schock und ARDS (akutes Atemnotsyndrom), welches das Verabreichen einer wirksamen Menge eines Antagonisten des High Mobility Group 1-Proteins (HMG1) umfasst. Die vorliegende Erfindung stellt ferner ein diagnostisches Verfahren zur Überwachung der Schwere einer Sepsis und verwandter Zustände bereit, welches das Messen der Serumkonzentration von HMG1 bei einem Patienten, der Symptome einer Erkrankung, die durch die Aktivierung einer Entzündungscytokinkaskade gekennzeichnet ist, zeigt, umfasst. Schließlich wird, wie hierin offenbart aber nicht explizit beansprucht ist, eine pharmazeutische Zusammensetzung und ein Verfahren zum Bewirken einer Gewichtsabnahme oder zur Behandlung von Fettsucht bereitgestellt, welches das Verabreichen einer wirksamen Menge eines HMG1-Proteins oder eines therapeutisch aktiven Fragments des Genprodukts eines HMG1-Gens umfasst.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Sepsis ist häufig ein lebensbedrohliches klinisches Syndrom, das sich nach einer Infektion oder Verletzung entwickelt. Sepsis ist die häufigste Todesursache bei hospitalisierten Patienten. Experimentelle Modelle gramnegativer Sepsis auf der Basis einer Verabreichung eines bakteriellen Endotoxins (Lipopolysaccharid, LPS) führten zu einem verbesserten Verständnis der pathogenen Mechanismen von letaler Sepsis und mit Sepsis verwandten Zuständen aufgrund der Aktivierung einer häufigen zugrundeliegenden Entzündungscytokinkaskade. Diese Kaskade von Wirt-Antwort-Vermittlern umfasst TNF, IL-1, PAF und andere von Makrophagen abgeleitete Faktoren, die in weitem Umfang als akute frühe Vermittler von schließlich erfolgreicher Letalität bei schwerer Endotoxämie untersucht wurden (Zhang und Tracey in "The Cytokine Handbook", 3. Auflage, Hrsg. Thompson (Academic Press Limited, USA), 515-547, 1998).

[0003] Unglücklicherweise waren therapeutische Ansätze auf der Basis der Hemmung dieser individuellen "frühen" Vermittler einer Endotoxämie bei großen prospektiven klinischen Versuchen gegen Sepsis bei humanen Patienten nur beschränkt erfolgreich. Aus diesen enttäuschenden Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass später auftretende Faktoren in der Wirtsantwort entscheidend die Pathogenese und/oder Letalität bei Sepsis und verwandten Störungen bestimmen könnten. Daher besteht Bedarf an der Entdeckung derartiger vermutlicher "später" Vermittler, die für einen Teil der oder die gesamte umfangreiche(n) Multisystempathogenese oder für die Letalität schwerer Endotoxämie notwendig und/oder ausreichend sind, insbesondere da Endotoxämie für klinische Sepsis und verwandte klinische Störungen repräsentativ ist.

[0004] HMG1 ist ein chromosomales Nucleoprotein von 30 kDa, das zur knospenden High Mobility Group (HMG) von Nicht-Histon-Chromatin-assoziierten-Proteinen gehört. Als Gruppe erkennen die HMG-Proteine singuläre DNA-Strukturen und sie sind an verschiedenen zellulären Funktionen, die die Bestimmung der Nucleosomstruktur und -stabilität umfassen, sowie an der Transkription und/oder Replikation beteiligt. Die HMG-Proteine wurden zum ersten Mal durch Johns und Goodwin als Chromatinkomponenten mit hoher elektrophoretischer Mobilität in Polyacrylamidgelen charakterisiert (siehe in "The HMG Chromosomal Proteins", E. W. Johns, Academic Press, London, 1982). Höhere Eukaryoten zeigen drei Familien von HMG-Proteinen: die HMG-1/-2-Familie; die HMG-14/-17-Familie und die HMG-1/-Y-Familie. Obwohl die Familien durch Größe und DNA-Bindungseigenschaften unterscheidbar sind, sind sie im Hinblick auf ihre physikalischen Eigenschaften ähnlich. HMG-Proteine sind über die Arten hoch konserviert, ubiquitär verteilt und in hohem Maße vorhanden und von Chromatin in 0,35 M NaCl extrahierbar und in 5%iger Perchlor- oder Trichloressigsäure löslich. Allgemein wird angenommen, dass HMG-Proteine DNA biegen und die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren an deren verwandte Sequenzen, die beispielsweise den Progesteronrezeptor, Östrogenrezeptor, HOX-Proteine und Oct1, Oct2 und Oct6 umfassen, erleichtern. Vor kurzem wurde offensichtlich, dass eine große, stark unterschiedliche Gruppe von Proteinen, die mehrere Transkriptionsfaktoren und andere mit DNA wechselwirkende Proteine umfassen, eine oder mehrere Regionen ähnlich HMG1 enthalten und dieses Merkmal wurde als HMG1-Box oder HMG1-Domäne bekannt. cDNAs mit Codierung für HMG1 wurden von humanen, Ratten-, Forellen-, Hamster-, Schweine- und Kälberzellen kloniert und es wird angenommen, dass HMG1 in allen Wirbeltierzellkernen in großem Maße vorhanden ist. Das Protein ist hoch konserviert mit Sequenzidentitäten zwischen den Arten im Bereich von 80%. In Chromatin bindet HMG1 an Linker-DNA zwischen Nucleosomen und an eine Vielzahl von Nicht- β -DNA-Strukturen, wie Palindrome, kreuzförmige Strukturen und Stamm-Schleife-Strukturen sowie Cisplatin-modifizierte DNA. Es wird allgemein angenommen, dass die DNA-Bindung

durch HMG1 sequenzunempfindlich ist. HMG1 wird sehr häufig aus gewaschenen Kernen oder Chromatin hergestellt, doch wurde das Protein auch in Cytoplasma detektiert. (Übersicht in Landsman und Bustin, *BioEssays*, 15: 539–546, 1993; Baxeavanis und Landsman, *Nucleic Acids Research*, 23: 514–523, 1995). Bisher wurde keine Verknüpfung zwischen den HMG-Proteinen und einem klinischen Zustand oder einer Erkrankung festgestellt.

[0005] HMG1 wurde alternativ als Heparin-Bindungsprotein, das in sich entwickelndem Hirn in großem Maße exprimiert wird, und zugerichtetes "Amphoterin" wegen dessen stark dipolarer Sequenz, die zwei innere Repeats einer positiv geladenen Domäne von etwa 80 Aminosäuren (die HMG1-Box) und einer sauren C-terminalen Domäne, die eine Strecke von etwa 30 fortlaufenden Glutamin- oder Asparaginsäureresten umfasst, identifiziert. Amphoterin/HMG1 ist an der äußeren Oberfläche der Plasmamembranen von Epithel- und insbesondere neuronalen Zellen lokalisiert, wo es speziell an den Filipodien von Nervenzellen lokalisiert ist. Hemmungsstudien legten nahe, dass Amphoterin/HMG1 zur Durchführung von (Neurit)verlängerung erforderlich ist und Amphoterin/HMG1 auch an Neuron-Glia-Interaktionen beteiligt sein kann (Merenmies et al., *J. Biol. Chem.* 266: 16722–16729, 1991; Merenmies et al., *J. Biol. Chem.* 266: 16722–16729, 1991; Milev et al., *J. Biol. Chem.* 273: 6998–7005, 1998; und Salmivirta et al. *Exp. Cell. Res.* 200: 444–451, 1992). Amphoterin/HMG1 kann aus murinen Erythroleukämiezellen nach Stimulation mit dem chemischen Induktor Hexamethylenbisacetamid freigesetzt werden (Melloni et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210: 82–89, 1995). Eine frühere Untersuchung legte nahe, dass das Genprodukt des HMG1-Gens als Differenzierungsverstärkungsfaktor durch Stimulierung von α -PKC fungiert (Melloni et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210: 82–89, 1995; und Melloni et al., *FEBS Lett.* 368: 466–470, 1995).

[0006] Es wurde gezeigt, dass das HMG1-Genprodukt mit Plasminogen und Gewebetyp-Plasminogenaktivator (t-PA) interagiert und wirksam die Plasminogenzeugung an der Zelloberfläche verstärkt, ein System, von dem bekannt ist, dass es eine Rolle bei der extrazellulären Proteolyse während der Zellinvasion und Gewebeneubildung spielt. Es wurde auch gezeigt, dass Amphoterin/HMG1 mit dem Rezeptor von Endprodukten fortgeschrittener Glykosylierung (RAGE) interagiert (Mohan et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182: 689–696, 1992; Yamawaki et al., *J. Neurosci. Res.* 44: 586–593, 1996; Salmivirta et al., *Exp. Cell Res.* 200: 444–451, 1992; und Vassalli et al., *J. Clin. Invest.* 88: 1067–1072, 1991), (Redlitz und Plow, *Baillieres Clin. Haematol.* 8: 313–327, 1995; und Parkkinen et al., *J. Bio. Chem.* 266–16730–16735, 1991).

[0007] *Biochem. J.*, 1996, Band 320, S. 253–256 offenbart einen Anti-HMG1-monoklonalen-Antikörper und dessen Fähigkeit zur Hemmung von Differenzierungsverfahren und dessen Verwendung zur Untersuchung muriner Erythroleukämiezellendifferenzierung. *Biophys. Res. Commun.*, 1992, Band 186, S. 129–134 offenbart die Coverkapselung von HMG1-Protein mit Plasmid-DNA in Liposomen und schlägt dies als verwendbares Mittel zur potentiellen Gentherapie von mehreren Erkrankungen vor.

[0008] Es besteht einschlägig ein lange bestehender Bedarf an der Entdeckung verbesserter Mittel, die die Cytokin-vermittelte Entzündungskaskade verhindern können und therapeutische Aktivität bei einer großen Vielzahl Cytokin-vermittelter entzündlicher Erkrankungen aufweisen. Die vorliegende Erfindung wurde im Laufe der untersuchenden Forschung zur Identifizierung von Mitteln, die Toxizität, Pathogenese und/oder Letalität bei Sepsis und anderen Störungen, die durch eine allgemeine Aktivierung der Entzündungscytokinkaskade in Verbindung stehen, vermitteln, gemacht.

[0009] Erkrankungen und Zustände, die durch die Entzündungscytokinkaskade vermittelt werden, sind zahlreich. Derartige Zustände umfassen die folgenden, die in Krankheitskategorien gruppiert sind:

Systemisches Entzündungsreaktionssyndrom, das umfasst:

Sepsissyndrom
grampositive Sepsis
gramnegative Sepsis
kulturnegative Sepsis
Pilzsepsis
neutropenisches Fieber
Urosepsis
Meningokokkämie
posttraumatische Hämorrhagie
Hums
ionisierende Strahlungseinwirkung
akute Pankreatitis

Schocklunge (ARDS)

[0010] Eine Reperusionsläsion, die umfasst:

Post-pump-Syndrom

Ischämie-Reperusionsläsion

[0011] Eine kardiovaskuläre Erkrankung, die umfasst:

Cardiac-Stun-Syndrom

Myokardinfarkt

dekompensierte Herzinsuffizienz

[0012] Eine Infektiöse Erkrankung die umfasst:

HIV-Infektion/HIV-Neuropathie

Meningitis

Heptatitis

septische Arthritis Peritonitis

Pneumonie

Epiglottitis

E. coli 0157:H7

Hämolytisch-urämisches Syndrom/thrombolytische thrombozytopenische Purpura

Malaria

Dengue-hämorrhagisches Fieber

Leishmaniose

Lepra

toxisches Schocksyndrom

Streptokokkenmyositis

Gangrän

Mykobakterientuberkulose

Mycobacterium avium intracellulare

Pneumocystis carinii-Pneumonie

entzündliche Beckenerkrankung

Orchitis/Epididymitis

Legionella

Lyme-Krankheit

Influenza A

Epstein-Barr-Virus

Viren-assoziiertes hemiaphagozytisches Syndrom

virale Encephalitis/aseptische Meningitis

[0013] Obstetrik/Gynäkologie, umfassend:

vorzeitige Wehen

Spontanabort

Infertilität

[0014] Entzündliche Erkrankung/Autoimmunität, die umfasst:

rheumatoide Arthritis/sereonegative Arthropathien

Osteoarthritis

entzündliche Darmerkrankung

systemischen Lupus erythematodes

Iridocyclitis/Uveitis/Optikusneuritis

Idiopathische Lungenfibrose

systemische Vaskulitis/Wegener-Granulomatose

Sarkoidose

Orchitis/Vasektomie-Aufhebungsverfahren

[0015] Allergische/atopische Erkrankungen, die umfassen:

Asthma

allergische Rhinitis

Ekzem

allergische Kontaktdermatitis
allergische Konjunktivitis
Hypersensitivitätspneumonitis

[0016] Maligne Erkrankungen, die umfassen:

ALL
AML
CML
CLL
Hodgkin-Krankheit, Nicht-Hodgkin-Lymphom
Kaposi-Sarkom
Kolorektales Karzinom
nasopharyngeales Karzinom
maligne Histiocytose
paraneoplastisches Syndrom/Hyperkalziämie einer bösartigen Erkrankung

[0017] Transplantate, umfassend:

Organtransplantatabstoßung
Transplantat-Wirt-Krankheit
Kachexie

[0018] Erbkrankheiten, die umfassen:

Mukoviszidose
familiäre hämatophagozytische Lymphohistiocytose
Sichelzellanämie

[0019] Hauterkrankungen, die umfassen:

Psoriasis
Alopezie

[0020] Neurologische Erkrankungen, die umfassen:

Multiple Sklerose
Migränekopfschmerz

[0021] Nierenerkrankungen, die umfassen:

nephrotisches Syndrom
Hämodialyse
Urämie

[0022] Toxizität, die umfasst:

OKT3-Therapie
Anti-CD3-Therapie
Cytokintherapie
Chemotherapie
Strahlentherapie
chronische Salicylatintoxikation

[0023] Metabolische/idiopathische Erkrankungen, die umfassen:

Wilson-Krankheit
Hämochromatose
Alpha-1-Antitrypsinmangel
Diabetes
Hashimoto-Thyroiditis
Osteoporose
Beurteilung der Hypothalamus/Hypophysen-Nebennierenachse primäre biliäre Zirrhose.

Zusammenfassung der Erfindung

[0024] Die Erfindung ist in den beigefügten Ansprüchen definiert.

[0025] Die Erfindung stellt eine pharmazeutische Zusammensetzung bereit, die einen Antikörper umfasst, der spezifisch an ein HMG1-Protein und ein Fragment desselben bindet und die HMG1-vermittelte Aktivierung der Entzündungscytokinkaskade hemmt. Die Erfindung ist auf die Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch an ein HMG1-Protein und Fragment desselben bindet und die HMG1-vermittelte Aktivierung der Entzündungscytokinkaskade hemmt, zur Verwendung als Arzneimittel, und insbesondere zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von Sepsis gerichtet.

[0026] In einer weiteren Ausführungsform umfasst das erfindungsgemäße Verfahren ferner die Verabreichung eines zweiten Mittels in Kombination mit dem HMG1-Antagonisten, wobei das zweite Mittel ein Antagonist eines frühen Sepsis-Vermittlers, wie TNF, IL-1 α IL-1 β , MIF oder IL-6, ist. Noch besser ist das zweite Mittel ein Antikörper gegenüber TNF oder ein IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra).

[0027] Die vorliegende Erfindung stellt ferner ein diagnostisches und prognostisches Verfahren zur Überwachung der Schwere und Vorhersage des wahrscheinlichen klinischen Verlaufs einer Sepsis und verwandter Zustände für einen Patienten, der schockähnliche Symptome zeigt oder mit dem Risiko behaftet ist, Symptome zu zeigen, die mit durch die Entzündungskaskade vermittelten Zuständen in Verbindung stehen, bereit. Das erfindungsgemäße diagnostische und prognostische Verfahren umfasst die Messung der Konzentration von HMG1 in einer Probe, vorzugsweise einer Serumprobe, und den Vergleich dieser Konzentration mit einem Standard für HMG1, der für einen normalen Konzentrationsbereich von HMG1 in einer ähnlichen Probe repräsentativ ist, wobei höhere Konzentrationen von HMG1 Anzeichen für eine schlechte Prognose oder die Wahrscheinlichkeit toxischer Reaktionen sind. Das diagnostische Verfahren kann auch für andere Gewebe- oder flüssigkeitskompartimente, wie cerebrospinale Flüssigkeit oder Urin, verwendet werden. Schließlich wird, wie hierin offenbart aber nicht explizit beansprucht ist, eine pharmazeutische Zusammensetzung und ein Verfahren zum Bewirken einer Gewichtsabnahme oder zur Behandlung von Fettsucht bereitgestellt, welches das Verabreichen einer wirksamen Menge von HMG1 oder eines therapeutisch aktiven Fragments desselben umfasst.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0028] Fig. 1 zeigt zwei Graphen, die die Induktion der HMG1-Freisetzung durch LPS in vitro (**Fig. 1A**) und in vivo (**Fig. 1B**) als Profil angeben. Insbesondere zeigt **Fig. 1A** die Ansammlung von HMG1 in Kulturüberständen von Makrophagen-RAW 264.7-Zellen nach Stimulation mit LPS (100 mg/ml). Der Einsatz ist ein Western-Blot (unter Verwendung von gegen rekombinantes HMG1 gebildeten Antikörpern), der die Induktion der HMG1-Freisetzung von RAW 264.7-Zellen nach Induktion mit TNF zeigt. **Fig. 1B** zeigt die Ansammlung von HMG1 im Serum von LPS-behandelten Mäusen. Serum von Balb/C-Mäusen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach LPS-Verabreichung gewonnen und auf HMG1 durch Western-Blotting unter Verwendung von gegen rekombinantes HMG1 gebildeten Antikörpern getestet.

[0029] Fig. 2 erläutert, dass HMG1 ein Vermittler der Pathogenese und Letalität bei Endotoxämie ist. **Fig. 2A** zeigt die Schutzwirkung von Anti-HMG1-Antikörpern vor LPS-Letalität, die an Mäusen getestet wurde. Die Verabreichung von Anti-HMG1-Antiserum in den angegebenen Mengen bei -0,5 (falls eine Dosis), -0,5 und 12 (falls zwei Dosen) oder -0,5, 12 und 36 (falls drei Dosen) Stunden in Bezug auf die LPS-Infektion (zum Zeitpunkt 0) war schützend vor LPS-induzierter Letalität und wiederholte Dosierungsprogramme ergaben besseren Schutz. **Fig. 2B** erläutert, dass rHMG1 dosisabhängige Letalität bei endotoxischen Mäusen verursachte. Männliche Balb/C-Mäuse (20–23 g) wurden willkürlich in Gruppen von 10 Mäusen aufgeteilt, die LPS (3,15 mg/kg, eine nichtletale Dosis) allein oder in Kombination mit gereinigtem rekombinantem HMG1-Protein erhielten. Die Verabreichung von HMG1 mit den angegebenen Dosen 2, 16, 28 und 40 h nach LPS-Infektion erhöhte die Letalität der zugrundeliegenden Endotoxämie signifikant. **Fig. 2C** erläutert die unabhängige letale Toxizität von HMG1 als Funktion der Dosis. Gereinigtes rHMG1 wurde männlichen Balb/C-Mäusen (fünf Mäuse pro Behandlungsgruppe) als einzelner i. p. Bolus mit der angegebenen Dosierung verabreicht. Die Mäuse wurden mindestens 48 h beobachtet und 60% der Mäuse, die mit rHMG1 mit einer Dosis von 500 μ g/Maus behandelt wurden, verstarben innerhalb von 24 h der rHMG1-Infektion, was einen Einzeldosis-LD50-Wert von weniger als 500 μ g/Maus anzeigt.

[0030] Fig. 3 zeigt, dass HMG1 die TNF-Freisetzung sowohl in vitro (**Fig. 3A**) als auch in vivo (**Fig. 3B**) induzierte. Insbesondere zeigt **Fig. 3A**, dass HMG1 die TNF-Freisetzung von huPPBMCs in dosisabhängiger Weise induziert. Frisch isolierte huPBMC-Kulturen wurden mit gereinigtem rekombinantem HMG1-Protein mit den angegebenen Dosen stimuliert und von den Kulturmedien wurden 4 h später Proben zum Test auf TNF nach bekannten immunologischen Verfahren (ELISA) genommen. **Fig. 3A** zeigt den Mittelwert \pm Standardabweichung der induzierten TNF-Antwort in zwei Experimenten (in dreifacher Ausführung). **Fig. 3B** zeigt, dass die Verabreichung von HMG1 die Ansammlung von TNF in Serum behandelter Mäuse induzierte. Balb/C-Mäuse

(20–23 g) wurden intraperitoneal mit gereinigtem rekombinantem HMG1 mit den angegebenen Dosen behandelt und Blutproben wurden 2 h später zum Test auf TNF durch einen L929-Bioassay genommen und die TNF-Konzentrationen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 3, ausgedrückt.

[0031] Fig. 4 zeigt, dass HMG1 eine Körpergewichtsabnahme bei Mäusen verursachte. Gereinigtes HMG1 wurde intraperitoneal Mäusen mit 100 μ g/Maus/Tag drei Tage verabreicht und das Körpergewicht wurde überwacht. Fig. 4 zeigt den Mittelwert \pm Standardabweichung der Nettokörpergewichtsänderung von drei Mäusen pro Gruppe.

[0032] Fig. 5 zeigt die Gewebeverteilung von HMG1-mRNA. Humane RNA-Masterblots, die Poly(A)⁺ RNA verschiedener Gewebe enthielten, (Clontech, Palo Alto, CA, USA) wurden mit einer Digoxigenin-11-dUTP-markierten HMG1-cDNA-Sonde von 0,6 kb, die durch PCR unter Verwendung eines rekombinanten Plasmids, das das HMG1-cDNA-Insert enthielt, synthetisiert wurde, alle gemäß einschlägig bekannten Verfahren hybridisiert. Kurz gesagt, wurde die Hybridisierung in einem Hybridisierungspuffer (5 \times SSC/2% Blockierungsreagens/0,1% SDS/50% Formamid, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) mit einer Sondenkonzentration von 10 ng/ml 16 h bei 65°C durchgeführt. Nach der Hybridisierung wurde das Filter zwei Waschküpfen mit 0,2 \times SSC/0,1% SDS 5 min und zwei Waschküpfen mit 0,2 \times SSC/0,1% SDS 10 min bei Raumtemperatur unterzogen. Ein Signal wurde unter Verwendung von mit Phosphatase konjugierten Anti-Digoxigenin-Antikörpern und den Detektionsreagenzien 4-Nitrobluetetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) (Boehringer-Mannheim) gemäß Standardverfahren detektiert. Die Blots wurden mit einem Silberbildscanner (SilverScanner II, Lacie Limited, Beaverton, OR) gescannt und die relative optische Dichte (in willkürlichen Einheiten, AU) wurde unter Verwendung von NIH 1.59-Bildsoftware quantitativ bestimmt. Es ist anzumerken, dass die höchsten Konzentrationen in makrophagenreichen Geweben beobachtet wurden.

[0033] Fig. 6 zeigt im Vergleich zu einer Gruppe normaler Kontrollsubjekte erhöhte HMG1-Spiegel von humanem Serum, die bei hospitalisierten humanen Subjekten mit Sepsis detektiert wurden, wobei die septischen Patienten desweiteren danach kategorisiert wurden, ob der Patient starb oder überlebte.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0034] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Entdeckung und Isolierung eines hoch induzierbaren 30-kDa-Proteins, das durch kultivierte murine makrophagenähnliche Zellen (RAW 264.7) nach einer Stimulation mit LPS, TNF oder IL-1 freigesetzt wird und sich in durch diese konditionierten Medien ansammelt. Eine partielle Aminosäuresequenz dieses isolierten Polypeptids war mit der Sequenz des HMG1-Proteins, das auch als Amphoterin bekannt ist, ein Protein, das zuvor nicht mit der Pathogenese einer Erkrankung verknüpft war, identisch. Diese Information wurde zur Klonierung einer cDNA mit Codierung für HMG1 verwendet, wobei diese Sequenz zur Bildung eines rekombinanten Proteins exprimiert wurde, wobei das Protein zur Erzeugung spezifischer Anti-HMG1-Antikörper verwendet wurde.

[0035] Die therapeutische und diagnostische Wirksamkeit wurde in einer Reihe zukunftsweisender In-vitro- und In-vivo-Experimente bestimmt. Die Experimente sind detailliert im Abschnitt Beispiele angegeben. Beispielsweise stiegen nach der Verabreichung von Endotoxin (LD₁₀₀) an Mäuse Serum-HMG1-Spiegel später (nach 16 h) als bekannte "frühe" Vermittler einer Sepsis (wie TNF und IL-1) und die Plateauspiegel von HMG1 wurden 16 bis 32 h gehalten. Patienten mit letaler Sepsis wiesen hohe Serum-HMG1-Spiegel auf, die bei normalen gesunden Freiwilligen nicht detektiert wurden. Darüber hinaus verursachte eine akute experimentelle Verabreichung von HMG1 an Testtiere – ob allein oder in Kombination mit subletalen Mengen von LPS – deutliche pathologische Reaktionen und sogar Tod. Stärker verteilte Dosierungsprogramme niedrigerer Mengen von rHMG1 führten zu signifikanter Gewichtsabnahme bei behandelten Tieren. Diese Ergebnisse ergeben Be-weiszeichen, dass HMG1 Vermittler von Endotoxämie und insbesondere ein später Vermittler im Gegensatz zu bekannten "frühen" Vermittlern, wie TNF und IL-1, ist. Diese Daten zeigen ferner die Bedeutung von Serum-HMG1 als Marker für die Schwere oder potentielle Letalität einer Sepsis und verwandter Zustände.

[0036] Zusätzlich ergab eine Behandlung mit Anti-HMG1-Antikörpern vollen Schutz vor LD₁₀₀-Dosen von LPS bei Mäusen. HMG1 ist durch TNF und IL-1 β induzierbar und stimuliert dosisabhängig die TNF-Freisetzung von huPBMCs. TNF ist ein Marker der Makrophagenaktivierung, weshalb es wahrscheinlich ist (ohne Beschränkung in Bezug auf beteiligte Mechanismen oder durch eine Theorie gebunden zu sein), dass HMG1 die strom-abwärtige Reaktivierung von Cytokinkaskaden fördert, was wiederum späte Pathogenese und Letalität bei Sepsis und verwandten Bedingungen, die die Aktivierung von proinflammatorischen Cytokinantworten umfassen, vermittelt. Daher besitzt HMG1 wahrscheinlich eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der Entzündungsreaktion auf eine Infektion und Verletzung und Antagonisten von HMG1 sind von therapeutischem Nutzen

bei Sepsis und verwandten Zuständen mit Entzündungskaskadenaktivierung. Das Auftreten von HMGI in der Entzündungscytokinkaskade ist geeignet, spätere Phasen der Wirtsantwort zu verbreiten und zu Toxizität und Letalität beizutragen. Die hier angegebenen zukunftsweisenden Daten stützen die therapeutische Wirksamkeit von HMGI-Antagonisten und liefern Beweisanzeichen zur Unterstützung der im Vorhergehenden genannten Theorie im Hinblick auf den Wirkmechanismus. Die In-vivo-Behandlungsdaten zeigten die Wirksamkeit von HMGI-Antagonisten im allgemeinen und insbesondere Anti-HMGI-Antikörpern zur Behandlung von Zuständen, die durch die Entzündungscytokinkaskade allgemein vermittelt werden, und insbesondere Sepsiszuständen, die beispielsweise septischen Schock, ein Sepsissyndrom oder andere "sepsisähnliche" Zustände, die durch Entzündungscytokine vermittelt werden, umfassen. Ferner zeigt die unabhängige Pathogenität und Toxizität/Letalität von HMGI, dass HMGI-Antagonisten besonders wirksam sind, wenn sie mit Antagonisten von "frühen" Entzündungsvermittlern, wie TNF, MIF, IL-1 und IL-6, verabreicht werden.

[0037] Zusammenfassend gesagt ist HMGI ein Cytokinvermittler von Entzündungsreaktionen, da

- 1) HMGI von Makrophagen und Pituicyten nach Stimulation mit Bakterientoxinen oder mit proinflammatorischen Cytokinen (TNF oder IL-1 β) freigesetzt wird,
- 2) HMGI sich im Serum von LPS ausgesetzten Tieren und bei Patienten mit Sepsis ansammelt, und
- 3) HMGI-spezifische Antikörper vor Mortalität in einem zukunftsweisenden letalen Endotoxämietiermodell klinischer Sepsis und verwandter Zustände schützen.

Pharmazeutische Zusammensetzung und Verabreichungsverfahren

[0038] Die erfindungsgemäß pharmazeutische Zusammensetzung oder erfindungsgemäße pharmazeutische Kombination kann einem Patienten entweder als solche (Komplex oder Kombination) oder in pharmazeutischen Zusammensetzungen, in denen sie mit geeigneten Trägern und Streckmitteln gemischt ist, verabreicht werden. Die erfindungsgemäß pharmazeutische Zusammensetzung oder erfindungsgemäße pharmazeutische Kombination kann parenteral, beispielsweise durch intravenöse Injektion oder Infusion, intraperitoneale Injektion, subkutane Injektion oder intramuskuläre Injektion verabreicht werden. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung oder erfindungsgemäße pharmazeutische Kombination kann oral oder rektal durch passende Formulierung mit Trägern und Streckmitteln unter Bildung von Tabletten, Pillen, Kapseln, Flüssigkeiten, Gelen, Sirupen, Aufschlämmungen, Suspensionen und dergleichen verabreicht werden. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung oder erfindungsgemäß pharmazeutische Kombination kann topisch, beispielsweise durch ein Hautpflaster, zum Erreichen konsistenter systemischer Konzentrationen des Wirkstoffs verabreicht werden. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung oder erfindungsgemäße pharmazeutische Kombination kann zu topischen Cremes, Haut- oder Schleimhautpflastern, Flüssigkeiten oder Gelen, die zur topischen Applikation an Haut oder Schleimhautoberflächen geeignet sind, formuliert werden. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung oder erfindungsgemäße pharmazeutische Kombination kann durch eine Inhalievorrichtung dem Atmungstrakt zur lokalen oder systemischen Behandlung verabreicht werden.

[0039] Die Dosierung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung oder erfindungsgemäßen pharmazeutischen Kombination der vorliegenden Erfindung kann durch den Fachmann aufgrund dieser Offenbarung bestimmt werden. Die pharmazeutische Zusammensetzung oder erfindungsgemäße pharmazeutische Kombination enthält eine wirksame Dosierung (in Abhängigkeit vom Verabreichungsweg und der Pharmakokinetik des Wirkstoffs) der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung oder erfindungsgemäßen pharmazeutischen Kombination und geeignete pharmazeutische Träger und Streckmitteln, die für den speziellen Verabreichungsweg der Formulierung (d. h. oral, parenteral, topisch oder durch Inhalation) geeignet sind, enthalten. Der Wirkstoff wird in die pharmazeutische Formulierung durch Misch-, Auflöse-, Granulier-, Drageeherstellungs-, Emulgier-, Verkapselungs-, Einfang- oder Lyophilisierverfahren gemischt. Die pharmazeutischen Formulierungen zur parenteralen Verabreichung umfassen wässrige Lösungen des Wirkstoffs oder eine Kombination in wasserlöslicher Form. Ferner können Suspensionen des Wirkstoffs als ölige Injektionssuspensionen hergestellt werden. Geeignete lipophile Lösemittel oder Vehikel umfassen Fettöle, wie Sesamöl, oder synthetische Fettsäureester, wie Ethyloleat oder Triglyceride, oder Liposome. Wässrige Injektionssuspensionen können Substanzen enthalten, die die Viskosität der Suspension erhöhen, wie Natriumcarboxymethylcellulose, Sorbit oder Dextran. Die Suspension kann optional Stabilisierungsmittel oder Mittel zum Erhöhen der Löslichkeit des Wirkstoffs oder eine Kombination zum Ermöglichen stärker konzentrierter Lösungen enthalten.

[0040] Pharmazeutische Formulierungen zur oralen Verabreichung können durch Kombination des Wirkstoffs mit festen Streckmitteln, wie Zuckern (beispielsweise Lactose, Saccharose, Mannit oder Sorbit), Cellulosezubereitungen (beispielsweise Stärke, Methylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose und Natriumcarboxyme-

thylcellulose), Gelatine, Gummis oder Polyvinylpyrrolidon, erhalten werden. Ferner kann ein Disintegrationsmittel und ein Stabilisierungsmittel zugegeben werden.

Antisenseoligomere

[0041] Die vorliegende Erfindung stellt Antisenseoligomere mit einer zur Hemmung der Blockierung der Expression des HMG1-Gens oder der mRNA-Sequenz wirksamen Sequenz bereit. Antisense-Technologie, die spezifische Oligonucleotide zur Hemmung der Expression von Zielgenprodukten verwendet, entwickelt sich als therapeutische Modalität für humane Erkrankungen. Mehrere Auswahlkriterien sind als Beitrag zur Optimierung von Antisense-Oligonucleotidantagonisten verfügbar. Beispielsweise ist es ratsam, Sequenzen mit einem GC-Gehalt von 50% oder mehr zu wählen. Bevorzugte Sequenzen überspannen den AUG-Initiationscodon des Zielproteins, doch können Stellen in der codierenden Region und 5'-UTR in gleicher Weise gut funktionieren. Derartige Sequenzen sind allgemein etwa 18–30 Nucleotide lang und derart gewählt, dass sie den ATG-Initiationscodon von der HMG1-cDNA-Sequenz zur Hemmung der Proteinexpression überlappen. Häufig wird ermittelt, dass längere Oligomere das Ziel in größerem Ausmaß hemmen, was anzeigt, dass eine bevorzugte Länge ein etwa 25-mer für die ersten Oligonucleotide, die als Antisense-Reagenzien gewählt werden, ist. Typischerweise werden drei Oligonucleotidsequenzen im Hinblick auf diese Kriterien gewählt und bezüglich Antagonistenaktivität verglichen, um Oligonucleotidsequenzen zu steuern, beispielsweise "reverse" Oligonucleotide oder solche, in denen etwa jede vierte Base der Antisensesequenz willkürlich gewählt ist. Daher ist eine bevorzugte Sequenz zur Herstellung von Antisenseoligomersequenzen für HMG1 eine 25-mer-Sequenz, die so gewählt ist, dass sie den (unterstrichenen) ATG-Initiationscodon von der HMG1-cDNA-Sequenz überlappt: GAGGAAAAATAACTAAACATGGGCAAAGGAGATCCTAAGAAG [SEQ ID NO. 5] und derartige bevorzugte Antisensesequenzen werden zur Konstruktion von Antisense-Oligonucleotidmitteln (und geeigneten Kontrollen) für einen In-vitro-Vergleich als Antagonisten von HMG1 verwendet. Diese In-vitro-Daten sind zukunftsweisend für die humane klinische Verwendbarkeit unter Verwendung von Antisense-Mitteln vergleichbarer Gestalt.

Gegen HMG1 gerichtete Antikörper

[0042] Die hier offenbarten Antikörper können polyklonal oder monoklonal sein, von einer beliebigen einer Zahl humaner, nichthumaner eukaryotischer, zellulärer, fungaler oder bakterieller Quellen stammen. Die Antikörper können durch Genom- oder von Vektoren stammende Codierungssequenzen codiert sein und gegen natives oder rekombinantes HMG1 oder Fragmente desselben mit oder ohne die Verwendung von Adjuvantien ausgelöst werden. Die Verfahren zur Herstellung von Antikörpern sind Verfahren und Verfahrensmaßnahmen, die auf dem Gebiet zur Erzeugung und Herstellung von Antikörpern bekannt sind. Allgemein sind neutralisierende Antikörper gegen HMG1 (d. h. solche, die biologische Aktivitäten von HMG1 insbesondere im Hinblick auf dessen proinflammatorische Cytokin-ähnliche Rolle hemmen) für therapeutische Anwendungen bevorzugt, während nicht-neutralisierende Antikörper für diagnostische Anwendungen ebenso geeignet sein können. Beispiele für derartige verwendbare Antikörper umfassen, ohne hierauf beschränkt zu sein, polyklonale, monoklonale, chimäre, einkettige und verschiedene humane oder humanisierte Arten von Antikörpern sowie verschiedene Fragmente derselben, wie Fab-Fragmente und von spezialisierten Expressionssystemen produzierte Fragmente.

Diagnostischer Test

[0043] Der hier bereitgestellte diagnostische Test verwendet Anti-HMG1-Antikörper, die entweder polyklonal oder monoklonal oder beides sein können. Das diagnostische Verfahren kann Standardtechniken auf Antikörperbasis zur Ermittlung von Konzentrationen des Genprodukts von HMG1-Genen in einer biologischen Flüssigkeit verwenden. Bevorzugte Standarddiagnoseverfahren sind ELISA-Assays und Western-Techniken.

Beispiel 1: Identifizierung von HMG1 als "später" Vermittler von Endotoxämie

[0044] Dieses Beispiel liefert die Ergebnisse eines Experiments zur Identifizierung und Isolierung von später freigesetzten, von Makrophagen stammenden Faktoren, die eine Rolle bei Sepsis und verwandten Zuständen, die durch Entzündungscytokinaktivität gekennzeichnet sind, eine Rolle spielen. Das in dem Beispiel berichtete Experiment untersuchte mit murinen Makrophagen-RAW 264.7-Zellen konditionierte Medien nach Stimulation der Kulturen mit TNF. Murine Makrophagen-RAW 264.7-Zellen wurden von American Type Culture Collections (ATCC, Rockville, MD, USA) erhalten und in Kultur unter DMEM, das mit 10% fetalem Rinderserum und 1% Glutamin ergänzt war, vermehrt. Wenn die Konfluenz 70–80% erreichte, wurden das Medium durch serumfreies OPTI-MEM I-Medium ersetzt und die Kulturen mit proinflammatorischen Cytokinen (beispielsweise TNF α oder IL-1) oder bakteriellem Endotoxin (LPS) stimuliert.

[0045] Die von den oben stimulierten Makrophagenkulturen freigesetzten Proteine wurden überwacht. Speziell wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen und zellkonditionierte Medien getrennt durch Zentrifugation (3000 rpm, 10 min) gewonnen. Proteine in dem konditionierten Medium wurden durch Ultrafiltration über Amicon-Membranen mit der Mr-Grenze 10 kDa (Amicon Inc., Beverly, MA, USA) konzentriert, anschließend durch SDS-PAGE fraktioniert und mit Coomassieblau (1,25% Coomassie Blue R250 in 30% Methanol/10% Essigsäure) angefärbt. Nach Entfärben mit 30% Methanol/7% Essigsäure wurden interessierendes Protein bzw. interessierende Proteine (d. h. diejenigen, die sich vorzugsweise im konditionierten Medium stimulierter Kulturen ansammelten) durch Ausschneiden aus dem SDS-PAGE-Gel isoliert und einer N-terminalen Sequenzierungsanalyse unterzogen (Commonwealth Biotechnologies, Inc., Richmond, VA, USA).

[0046] Ein Vergleich durch SDS-PAGE-Gelanalyse der Profile von Proteinen, die sich bei einer Kontrolle (ohne TNF α -Stimulierung) ansammelten, gegenüber denen, die sich bei TNF-stimulierten RAW 264.7-Zellen ansammelten, ergab ein stark induzierbares 30-kDa-Protein, dessen Konzentration in dem zellkonditionierten Medium nach Stimulation während 16 h signifikant erhöht war. Die Aminosäuresequenzanalyse dieses isolierten Proteins ergab dessen N-terminale Sequenz als Gly-Lys-Gly-Asp-Pro-Lys-Lys-Pro-Arg-Gly-Lys-Met-Ser-Ser [SEQ ID NO: 1]. Die Durchsicht relevanter Gendatenbanken ermittelte 100%ige Identität mit der N-terminalen Aminosäuresequenz von HMG1.

[0047] Diese Daten identifizierten HMG1 als "spät auftretendes" Produkt von LPS-stimulierten Makrophagenkulturen und daher als Kandidat eines proinflammatorischen Vermittlers. Diese Aktivität wurde durch die Verabreichung von rekombinant produziertem HMG1 und/oder Anti-HMG1-Antikörpern in zellulären und Tiermodellsystemen, die für humane chemische Zustände zukunftsweisend sind, bestätigt.

Beispiel 2: Zelluläre Quellen von HMG1

[0048] Dieses Beispiel zeigt, welche Zellquellen zur Freisetzung von HMG1 als Antwort auf TNF, IL-1 und/oder LPS fähig sind. Die untersuchten Zellen umfassen GH3-Pituicyten, murine Makrophagen-RAW 264.7-Zellen, humane primäre periphere mononukleäre Blutzellen (huPBMCs), humane primäre T-Zellen, Rattennebenieren-PC-12-Zellen und primäre Rattennierenzellen (Tabelle 1). Die Rattenhypophysen-GH3-Zelllinie wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) erhalten und in DME, das mit 10% fetalem Rinderserum und 1% Glutamin ergänzt war, kultiviert. Humane PBMCs und T-Zellen wurden aus Vollblut von gesunden Spendern frisch isoliert und in RPMI 1640, das mit 10% humanem Serum ergänzt war, gemäß einer früheren Beschreibung isoliert (Zhang et al., J. Exp. Med. 185: 1759–1768, 1997). Wenn die Konfluenz 70–80% erreichte, wurde das Medium durch serumfreies OPTI-MEM I-Medium ersetzt und die Kulturen mit proinflammatorischen Cytokinen (beispielsweise TNF α oder IL-1) oder bakteriellem Endotoxin (LPS) stimuliert.

[0049] Obwohl humane T-Zellen, Rattennebenieren(PC-12)-Zellen und primäre Rattennierenzellen zellassoziiertes HMG1 enthielten, was durch Western Blotting-Analyse von Vollzelllysaten unter Verwendung HMG1-spezifischer Antikörper aufgezeigt wurde (s. das folgende Beispiel 4), sammelte sich HMG1 im Medium dieser Kulturen nach Stimulation mit entweder TNF, IL-1 β oder LPS nicht signifikant an (Tabelle 1).

TABELLE 1. Induzierte Freisetzung von HMG1 von verschiedenen Zellarten

Zellart	Stimulus		
	TNF	IL-1 β	LPS
Murine RAW 264.7-Zellen	Ja	Ja	Ja
Humane PBMCs	Ja	Ja	Ja
Humane primäre T-Zellen	Nein	Nein	Nein
Rattennebenieren-PC-12-Zellen	Nein	Nein	Nein
Rattenhypophysen-GH ₃ -Zellen	Ja	Ja	Nein
Primäre Rattennierenzellen	Nein	Nein	Nein

Anmerkung: PBMCs, periphere mononukleäre Blutzellen

[0050] TNF, IL-1 β (minimale wirksame Konzentration = jeweils 5 ng/ml) und bakterielles Endotoxin (LPS, minimale wirksame Konzentration = 10 ng/ml) induzierten die Freisetzung von HMG1 aus humanen PBMCs in einer zeit- und dosisabhängigen Weise (Tabelle 1). IFN- γ allein (0–200 U/ml) induzierte die HMG1-Freisetzung

aus einer der obigen Zellen nicht, es verstärkte jedoch bei Zugabe in Kombination mit entweder TNF oder IL-1 β in von der IFN- γ -Dosis abhängiger Weise die HMG1-Freisetzung aus Makrophagen mit einer maximalen dreifachen Verstärkung durch IFN- γ bei einer Konzentration von 100 U/ml.

[0051] Die Freisetzung von HMG1 beruhte nicht auf Zelltod, da die Zelllebensfähigkeit durch TNF, IL-1 β oder LPS unbeeinflusst war, was durch Trypanblauausschluss beurteilt wurde (90–92 \pm 5% lebensfähig für die Kontrolle gegenüber 88–95 \pm 4% in Gegenwart von 100 ng/ml TNF, IL-1 β oder LPS). Die HMG1-Menge, die von Pituicyten und Makrophagen freigesetzt wurde, korrelierte invers mit der intrazellulären Konzentration von HMG1, was durch Western-Blotting-Analyse bestimmt wurde, was anzeigt, dass das freigesetzte Material teilweise von zuvor gebildetem zellassoziiertem HMG1-Protein stammte.

[0052] Potentielle Quellen von zirkulierendem HMG1 in vivo wurden durch Hybridisierung einer HMG1-spezifischen Sonde mit mRNA, die von verschiedenen normalen humanen Geweben hergestellt wurde (Blotsubstrat von Handelslieferanten erhältlich), getestet, wobei die Ergebnisse in **Fig. 5** zusammengefasst sind. Mehrere Makrophagen-reiche Gewebe (Lunge, Leber, Niere, Bauchspeicheldrüse und Milz) zeigten eine sehr große Menge von HMG1-mRNA-Expression; weniger wurde in Hypophyse, Knochenmark, Thymus, Lymphknoten und Nebenniere beobachtet. Zusätzlich zur Lieferung von Information bezüglich der relativen Gewebeverteilung der HMG1-Expression zeigt diese Untersuchung die Durchführbarkeit und die Verwendbarkeit der Tests für HMG1-spezifische Nucleinsäuresequenzen in Gewebeproben.

Beispiel 3: Rekombinante HMG1-Verabreichung in vitro und in vivo

[0053] Dieses Beispiel gibt detailliert Verfahren zur Produktion von HMG1 durch bekannte gentechnische Verfahren an. Das offene Leseraster von HMG1 wurde durch PCR amplifiziert und in einen Expressionsvektor (pCAL-n) subkloniert. Kurz gesagt, wurde das offene Leseraster von 648-bp von HMG1-cDNA ausgehend von 5 ng Rat Brain Quick-Clone cDNA (Katalog Nr. 7150-1, Clontech, Palo Alto, CA, USA) unter Verwendung von Primern, die die folgenden Sequenzen, 5'-CCC GCG GAT CCA TCG AGG GAA GGA TGG GCA AAG GAG ATC CTA-3' [SEQ ID NO: 2] und

5'-CCC GCA AGC TTA TTC ATC ATC ATC ATC TTC T-3' [SEQ ID NO: 3], enthielten, durch PCR amplifiziert (94°C, 1', 56°C 2, 72°C 45", 30 Zyklen). Das 680-bp-PCR-Produkt (4 μ g) wurde mit BamHI und Hind III verdaut und in die Bam HI/Hind III-Klonierungsstellen des pCAL-n-Vektors (Stratagene, La Jolla, CA, USA) kloniert. Das rekombinante Plasmid wurde in E. coli BL21(DE3)pLysS (Novagen, Madison, WI, USA) transformiert und positive Klone wurden gescreent und durch DNA-Sequenzierung an beiden Strängen unter Verwendung eines Tag DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit auf dem ABI 373A Automated Fluorescent Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) bestätigt.

[0054] Zur Expression von rekombinantem HMG1 wurden positive Klone bei 37°C unter kräftigem Schütteln (250 rpm) kultiviert, bis OD₆₀₀ 0,6 erreichte, und dann IPTG (1 mM) zugegeben. 12 h nach der IPTG-Induktion wurden Bakterienzellen durch Zentrifugation (6500 rpm, 15 min) geerntet und durch Gefrieren/Auftauen-Zyklen lysiert. Die wasserlösliche Fraktion wurde nach Zentrifugation (30 min, 12000 rpm) gewonnen und rekombinantes HMG1 wurde aus einer Calmodulin-Bindungsharzsäule nach der Anleitung durch den Hersteller (Stratagene) gereinigt. Bakteriellendesotoxin wurde von dem rekombinanten HMG1 unter Verwendung von Detoxi-Gel Endotoxin-Removing Gel (Pierce, Rockford, IL, USA, Katalog Nr. 20344) entfernt und verbliebener LPS-Gehalt wurde durch den Limulus Amebocyte Lysate Test (LAL-Test, Katalog Nr. 50-648U, QCL-1000 Chromogenic LAL, Bio-Whittaker, Inc., Walkersville, MD, USA) bestimmt. Gereinigtes rekombinantes HMG1 wurde zu Kulturen von humanen peripheren mononukleären Blutzellen (HuPBMCs) gegeben und Überstände wurden auf TNF durch ELISA 4 h nach Stimulation getestet. Das LPS-Neutralisierungsmittel Polymyxin B (10 μ g/ml) wurde gleichzeitig mit rekombinantem HMG1 zur Beseitigung der Wirkung von etwaigem kontaminierendem LPS auf die TNF-Freisetzung zugegeben. Zusätzlich wurde rekombinant abgeleitetes HMG1 an Testtiere mit der oder ohne die zusätzliche endotoxämische Stimulation von exogenem LPS verabreicht, um das pathogene Potential hoher Konzentrationen von HMG1 in vivo zu untersuchen (siehe **Fig. 2B** und **Fig. 2C**). Bei einigen Experimenten wurden Serumproben von HMG1-behandelten Tieren sichergestellt, um sie auf TNF zu testen, wie hier detailliert angegeben ist (siehe **Fig. 1B**).

[0055] Das obige Verfahren liefert rekombinantes HMG1 als Fusionspeptid, das eine 3,0-kDa-Calmodulin-Bindungsdomäne und eine Thrombinspaltungsstelle als aminoterminaler Verlängerung im Register mit der HMG1-Peptidsequenz umfasst. Bei einigen Experimenten wurde das Fusions-Tag von einem Aliquot des rekombinanten Proteins entfernt und die biologische Aktivität des vollen Fusionsproteins mit dem gespaltenen HMG1-Peptid verglichen; kein signifikanter Unterschied der biologischen Aktivität wurde festgestellt und zusätzliche

Experimente (insbesondere diejenigen, die die Verabreichung von rekombinant produziertem HMG1 an Tiere umfassen) wurden typischerweise mit dem (nicht gespaltenen) Fusionsprotein durchgeführt.

[0056] Wie in **Fig. 3A** und **Fig. 3B** aufgezeigt ist, induzierte die In-vitro- oder In-vivo-Verabreichung von rekombinant abgeleitetem HMG1 eine brüske TNF-Antwort, was die Identifizierung von HMG1 als spät auftretender LPS-induzierter, von Makrophagen abgeleiteter endogener Vermittler mit proinflammatorischer Aktivität bestätigt.

Beispiel 4: Anti-HMG1-Antikörper und Immundetektion

[0057] Dieses Beispiel gibt die Ergebnisse von Experimenten zur Erzeugung und Verwendung polyklonaler Antikörper gegen HMG1 an. Kurz gesagt, wurden polyklonale Antikörper gegen ein Oligopeptid, das der N-terminalen Aminosäuresequenz von HMG1 entspricht, oder gegen gereinigtes rekombinantes HMG1 in Kaninchen nach einschlägig bekannten Standardverfahren erzeugt. Kurz gesagt wurden 8 Kopien eines Oligopeptids mit der Sequenz GKGDPPKPRGKMSSC [SEQ ID NO: 4] an sich radial verzweigenden Lysindendriten (kleiner immunogen inerter Kern) verankert. Diese großen Makromoleküle wurden dreimal sowohl subkutan als auch intradermal (0,5–1,0 mg pro Injektion) in Kaninchen 1, 2 und 4 Wochen nach einer vorherigen Blutentnahme am Tag 0 injiziert. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurde den Kaninchen Blut entnommen und sie wurden intramuskulär mit 1,0 mg Antigen einer Auffrischimpfung unterzogen, worauf 2 Wochen später eine zweite Blutentnahme folgte. Alternativ wurden zur Produktion polyklonaler Antikörper gegen rekombinantes HMG1 Kaninchen mit rekombinantem HMG1-Fusionspeptid (100 µg pro Injektion) nach einem ähnlichen Protokoll immunisiert. Monoklonale Antikörper, die gegen HMG1 reaktiv sind (d. h. die binden und in einigen Fällen die biologische Aktivität von HMG1 neutralisieren oder antagonistisch auf diese wirken), werden günstigerweise nach einschlägig bekannten Verfahren unter Verwendung der hier beschriebenen HMG1-Antigene oder anderer HMG1-Peptidfragmente als Immunogene hergestellt. Derartige monoklonale Antikörper und/oder die Hybridome, die diese produzieren, sind zur Produktion verschiedener "humanisierter" Antikörper, die gegen HMG1 reaktiv sind (alles gemäß einschlägig bekannten Verfahren), verwendbar, wobei humanisierte Antikörper wie hier gelehrt verwendbar sind.

[0058] HMG1-spezifische Antikörper wurden verwendet, um durch Western-Blotting-Analyse die induzierbare Freisetzung von HMG1 aus RAW 264.7-Zellen nach Behandlung mit TNF oder LPS zu messen (**Fig. 1**). Kurz gesagt, wurden Proteine durch SDS-PAGE auf einem 4–20% Gradientengel fraktioniert, auf eine PVDF-Membran überführt und mit Kaninchenantiserum, das gegen entweder das N-terminale synthetische HMG1-Antigen oder gegen rekombinantes HMG1 gebildet wurde, geblottet. Das Signal wurde unter Verwendung eines ECL-Kits nach den Vorschriften des Herstellers (Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, IL, USA) detektiert und die Konzentrationen von HMG1 wurden durch Messen der optischen Dichte von Banden auf Western-Blots, die zur Analyse unter Verwendung von NIH 1.5-Bildsoftware digitalisiert wurden, unter Bezug auf eine Standardkurve von gereinigtem rekombinantem HMG1 bestimmt.

[0059] Kein HMG1-Protein wurde in mit RAW 264.7-Zellen konditioniertem Medium in Abwesenheit einer TNF- oder LPS-Behandlung detektiert, doch sammelte sich HMG1 in konditioniertem Medium auf hohe Konzentrationen nach einer derartigen Stimulierung an, wobei eine Plateau bei 8–28 h nach der Stimulierung erreicht wurde (**Fig. 1A**). Zusammenfassend gesagt, zeigen die in den Beispielen 1, 3 und in **Fig. 1A** gegebenen Daten, dass die Freisetzung von HMG1 aus Makrophagen stimulus-spezifisch und zeit- und dosisabhängig ist, wobei die maximale Ansammlung innerhalb von 8 h nach Stimulation mit TNF mit Konzentrationen von nur 5 ng/ml beobachtet wurde. Es ist klar, dass Sepsis, septischer Schock und verwandte Zustände bei Menschen als Antwort auf Reize, die qualitativ oder quantitativ von dem einzelnen großen letalen LPS-Bolus, der in diesem zukunftsweisenden Modell verwendet wird, verschieden sind, auftreten können. Dennoch ist eine experimentelle Endotoxämie ein wertvolles und zukunftsweisendes Modellsystem, durch das kritische Komponenten der Entzündungscytokinkaskade identifiziert werden können und durch das spezifische Antagonisten mit vorhergesagter klinischer Verwendbarkeit identifiziert werden können. Im Hinblick darauf sind HMG1-Antagonisten vielleicht therapeutisch attraktiver als TNF-Antagonisten im Hinblick auf das späte Auftreten von HMG1 gegenüber TNF bei der Reaktion auf Endotoxin.

Beispiel 5: Detektion von HMG1 bei In-vivo-Tiermodellen

[0060] Dieses Beispiel erläutert ein In-vivo-Experiment bei Nagetieren, wobei Serum-HMG1-Spiegel nach Verabreichung einer subletalen Dosis von LPS (LD₅₀) gemessen werden. Mäuse oder Ratten wurden mit LPS behandelt und Seren wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und auf die Konzentrationen von HMG1 durch Western-Blotting-Analyse getestet. Die Serumkonzentrationen von HMG1 wurden durch Messung der

optischen Bandintensität in Bezug auf eine Standardkurve von gereinigtem HMG1 festgestellt. Die Serumkonzentrationen nahmen während 16 h nach LPS signifikant zu und blieben mindestens 32 h hoch (**Fig. 1B**) und waren in vehikelbehandelten Kontrolltieren nicht detektierbar. Diese Daten zeigen, dass HMG1 ein besonders attraktives Ziel für die Diagnose von und pharmazeutische Intervention gegen Sepsis und verwandte Störungen von Cytokintoxizität darstellt, da HMG1 ein spät auftretender Vermittler in der Entzündungscytokinkaskade ist.

Beispiel 6: Vorteile eines Schutzes vor HMG1

[0061] Dieses Beispiel gibt die Ergebnisse eines zukunftsweisenden In-vivo-Tests zur Messung der therapeutischen Aktivität von Antagonisten von HMG1 in Bezug auf die Behandlung von Sepsis und verwandten Zuständen cytokinvermittelter Toxizität an. Bei diesem Beispiel war der HMG1-Antagonist eine Anti-HMG1-Antikörperzubereitung. Kontrollen, die mit Präimmunserum behandelt wurden, entwickelten Letargie, Piloerektion, Diarrhoe und erlitten innerhalb von 48 h Tod. Diese klinischen Zeichen einer Endotoxämie wurden durch die Verabreichung von Anti-HMG1-Antikörpern signifikant verhindert. Männliche Bulb/C-Mäuse (6–7 Wochen, 20–23 g) wurden willkürlich gruppiert (10 Tiere pro Gruppe) und entweder mit Kontroll(Präimmun)- oder Anti-HMG1-Serum (das in Beispiel 4 hergestellt wurde) 30 min vor der (intraperitonealen) Verabreichung einer letalen Dosis von LPS (50 mg/kg in 1 × PBS) vorbehandelt. Andere Versuchsgruppen erhielten zusätzliche Dosen von Anti-HMG1-Serum bei +12 oder +12 und +36 h nach LPS-Verabreichung. Die Tiere wurden bezüglich Aussehen und Überleben mindestens zwei Wochen beobachtet.

[0062] Polyklonale Antikörper gegen rekombinantes HMG1 wurde in Kaninchen erzeugt und Antiserum wurde auf Spezifität und Titer durch ELISA und Western-Blotting-Verfahren getestet. Das polyklonale Antiserum erkannte (band an) rekombinantes HMG1 bei beispielsweise Western-Blot-Analyse immunspezifisch und unterschied rHMG1 von anderen Proteinen in sowohl rohen Bakterienlysaten als auch einem gereinigten Protein, das in Mausserum verdünnt worden war. Unter Verwendung von Chemilumineszenz-amplifizierten Detektionsverfahren bei Western-Blotting-Analyse war polyklonales Anti-HMG1-Antiserum mit Verdünnungen von bis zu 1:1000 zur Detektion von nur 50 pg rHMG1-Protein verwendbar. Die Verabreichung von Anti-HMG1-Antiserum in den angegebenen (**Fig. 2A**) Mengen bei –0,5 (falls eine Dosis), –0,5 und 12 (falls zwei Dosen) oder –0,5, 12 und 36 (falls drei Dosen) Stunden in Bezug auf die LPS-Stimulation (zum Zeitpunkt 0) war schützend vor LPS-induzierter Letalität und wiederholte Dosierungsprogramme ergaben besseren Schutz.

[0063] **Fig. 2B** erläutert, dass rHMG1 dosisabhängige Letalität bei endotoxischen Mäusen verursacht. Männliche Bulb/C-Mäuse (20–23 g) wurden willkürlich in Gruppen von 10 zur Aufnahme von LPS (3,15 mg/kg, eine nicht-letale Dosis) allein oder in Kombination mit gereinigtem rekombinantem HMG1-Protein aufgeteilt. Die Verabreichung von HMG1 mit den angegebenen Dosen 2, 16, 28 und 40 h nach LPS-Stimulation erhöhte signifikant die Letalität der darunterliegenden Endotoxämie.

[0064] **Fig. 2C** erläutert die unabhängige Letaltoxizität von HMG1 als Funktion der Dosis. Gereinigtes rHMG1 wurde männlichen Balb/C-Mäusen (5 Mäuse pro Behandlungsgruppe) als einziger i. p. Bolus mit der angegebenen Dosierung verabreicht. Die Mäuse wurden mindestens 48 h beobachtet und 60% der Mäuse, die mit rHMG1 mit einer Dosis von 500 µg/Maus behandelt wurden, starben innerhalb von 24 h nach der rHMG1-Stimulation, was einen Einzeldosis-LD₅₀-Wert von weniger als 500 µg/Maus anzeigt.

[0065] Der durch Anti-HMG1-Antikörper verliehene Schutz war spezifisch, da die Verabreichung von Präimmunserum, das keine immunspezifische Reaktivität gegenüber HMG1 auf Western-Blots zeigte, Subjekte nicht vor LPS-vermittelter Mortalität schützte (**Fig. 2A**). Darüber hinaus ergaben HMG1-spezifische Antikörper keine Kreuzreaktion mit anderen, von Makrophagen abgeleiteten Cytokinen (beispielsweise IL-1 und TNF), was die Möglichkeit beseitigt, dass Antikörper Schutz durch Bindung und dadurch Neutralisation dieser Vermittler verliehen. Schutz gegen Sepsis, mit Sepsis in Verbindung stehende Pathogenese und Sepsis-bedingte Erkrankungen, die die Aktivierung proinflammatorischer Cytokinkaskaden umfassen, können durch eine Kombinationstherapie, die gegen mehr als eine Komponente der Cytokinkaskade zielgerichtet ist, verbessert werden. Antagonisten von HMG1 können im Hinblick darauf mit spezifischen Antagonisten von TNF, IL-1, MIF und anderen Entzündungsvermittlern oder mit breit aktiven Antagonisten von Entzündungsreaktionen, die mehrere Komponenten der Entzündungskaskade hemmen (beispielsweise Aspirin, NSAIDs, entzündungshemmende Steroide und dergleichen) kombiniert werden, um noch wirksamere therapeutische Modalitäten zu erhalten. Der Schutz gegen LPS-Toxizität war antikörperdosisabhängig und eine häufigere Dosierung mit höheren Mengen Antikörpern verringerte die Mortalität um bis zu 70% (**Fig. 2A**). Mäuse wurden mindestens 2 Wochen in allen Experimenten beobachtet und es trat keine späte Mortalität auf, was anzeigt, dass eine Anti-HMG1-Antikörperbehandlung lang andauernden Schutz gegen LPS-Letalität verleiht und nicht nur den Todeszeitpunkt verzögert.

Beispiel 7: HMG1 bei humaner Erkrankung

[0066] Dieses Beispiel gibt Daten an, die einen Zusammenhang zwischen HMG1 und humaner Sepsis belegen und dadurch eine Indikation zur Verwendung von HMG1-Antagonisten allgemein und Anti-HMG1-Antikörpern insbesondere bei humaner Sepsis und verwandten Zuständen von Cytokintoxizität stützen. Serum-HMG1-Spiegel bei normalen gesunden Individuen und kritisch kranken Patienten wurden unter Verwendung der wie in Beispiel 4 erzeugten polyklonalen Antikörper in einem Western-Blotformat unter Bezug auf eine Standardkurve von rHMG1 gemessen. Das HMG1 war in normalen Kontrollen nicht detektierbar, jedoch zu hohen Konzentrationen bei kritisch kranken Patienten mit Sepsis angesammelt (Tabelle 2).

TABELLE 2. Serumauftreten von HMG1 bei Sepsispatienten

Patient (Nr.)	Alter (Jahr)	HMG1 (ng/ml)	Diagnose	Folgezustand
1	27	< d. l.	normal	gesund
2	34	< d. l.	normal	gesund
3	35	< d. l.	normal	gesund
4	36	< d. l.	normal	gesund
5	61	< d. l.	normal	gesund
6	31	< d. l.	normal	gesund
7	55	10	Sepsis, Anastomoseinsuffizienz	erholt
8	70	7–20	Sepsis, Kolonperforation	erholt
9	44	10–60	Sepsis, MOF, spinale Rekonstruktion	gestorben
10	60	> 120	Sepsis, MOF, perforierter Magenulkus	gestorben
11	47	> 120	Sepsis, MOF, Pneumonie	gestorben

Anmerkung: < d. l. – unter Nachweisgrenze;
MOF – Multiples Organversagen

[0067] Diese Daten zeigen, dass erhöhte Serum-HMG1-Spiegel bei Patienten mit Sepsis beobachtet werden und die höchsten Spiegel von Serum-HMG1 in letalen Fällen beobachtet werden (Tabelle 2). Diese Daten zeigen ferner die therapeutische Bedeutung von HMG1-Antagonisten bei Sepsis und sie liefern auch Beweisanzeichen für die diagnostische Verwendbarkeit eines Tests auf Sepsis und Schwere (d. h. potentielle Letalität) von Sepsis durch Ermittlung von Serumkonzentrationen von HMG1. Dieser diagnostische Test ist auch zur Diagnose der Schwere verwandter Zustände, die die Aktivierung der Entzündungscytokinkaskade umfassen, verwendbar.

[0068] Zusätzliche Subjekte wurden auf Serum-HMG1-Spiegel in Verbindung mit letaler gegenüber nichtletaler Sepsis gecreent, wobei die Ergebnisse (kumulativ mit Tabelle 2) wie in **Fig. 6** beschrieben sind. Die in **Fig. 6** zusammengefassten Daten repräsentieren Serumproben, die von 8 gesunden Objekten und 25 septischen Patienten, die mit grampositiven [*Bacillus fragilis* (1 Patient), *Enterococcus faecalis* (1 Patient), *Streptococcus pneumonia* (4 Patienten), *Listeria monocytogenes* (1 Patient) oder *Staphylococcus aureus* (2 Patienten)], gramnegativen [*Escherichia coli* (7 Patienten), *Klebsiella pneumonia* (1 Patient), *Acinetobacter calcoaceticus* (1 Patient), *Pseudomonas aeruginosa* (1 Patient), *Fusobacterium nucleatum* (1 Patient), *Citrobacter freundii* (1 Patient)] oder nichtidentifizierten Pathogenen (5 Patienten) infiziert waren, erhalten wurden. Serum wurde durch SDS-PAGE-Gelelektrophorese fraktioniert und HMG1-Spiegel wurden durch Western-Blotting-Analyse unter Bezug auf Standardkurven von gereinigtem HMG1, das in normalem humanem Serum verdünnt war, bestimmt. Die Nachweisgrenze durch Western-Blotting-Analyse beträgt 50 pg. Es ist anzumerken, dass HMG1

bei normalen Kontrollen nicht detektierbar ist, jedoch bei septischen Patienten signifikant erhöht ist. Die durchschnittliche Konzentration von HMG1 in Serum von nicht überlebenden septischen Patienten (N = 13 Patienten, mittlere HMG1-Konzentration = $83,7 \pm 22,3$ ng/ml) ist signifikant höher als bei Überlebenden (N = 12, mittlere HMG1-Konzentration = $25,2 \pm 15,1$ ng/ml, $P < 0,05$). Diese Daten ergeben einen direkten Nachweis für die Verwendbarkeit des Screenings von Gewebe (einschließlich, ohne Beschränkung Blut oder Serum) Proben auf HMG1-Sequenzen (Protein oder Nucleinsäure) als diagnostischer und prognostischer Indikator des Vorhandenseins von Sepsis und verwandten Störungen von Cytokinaktivierung und der Schwere und des wahrscheinlichen klinischen Verlaufs derartiger Erkrankungen und Zustände.

Beispiel 8: HMG1-induzierte proinflammatorische Vermittler und Gewichtsabnahme

[0069] Die vorliegenden Ergebnisse liefern den Nachweis, dass HMG1 ein spät freigesetztes Vermittlerelement der Entzündungscytokinkaskade ist. Die Zugabe von rekombinantem HMG1 zu primären humanen peripheren mononukleären Blutzellen führte zu dosisabhängiger Induktion von TNF innerhalb von 4 h nach Stimulation (**Fig. 3A**). Diese Stimulation der TNF-Freisetzung durch HuPBMCs durch rekombinantes HMG1 beruhte nicht auf einer LPS-Kontamination, da (i) gereinigtes rekombinantes HMG1 nicht durch LPS kontaminiert war, was durch einen LAL-Endotoxintest beurteilt wurde; (ii) die Zugabe des LPS-Neutralisationsmittels Polymyxin B die HMG1-induzierte TNF-Freisetzung nicht beeinflusste, und (iii) die proteolytische Spaltung von rekombinanten HMG1-Zubereitungen mit Trypsin die TNF-Freisetzungaktivität für die PBMC-Kulturen vollständig aufhob. Eine HMG1-Stimulation induzierte auch die Freisetzung von Stickoxid (NO) durch Makrophagen.

[0070] Zur Bestätigung, dass HMG1 die Serum-TNF-Freisetzung in vivo induzierte, wurde gereinigtes rekombinantes HMG1 intraperitoneal an Balb/C-Mäuse verabreicht und Blutproben zum Test auf TNF durch den L929-Assay gewonnen. Wie in **Fig. 3B** gezeigt ist, war TNF im Serum von Kontrolltieren nicht detektierbar, jedoch 2 h nach Verabreichung des rekombinanten HMG1-Proteins signifikant erhöht.

[0071] Die wiederholte Verabreichung des rekombinanten Genprodukts des HMG1-Gens (100 µg/Maus/Tag) verursachte eine signifikante Körpergewichtsabnahme (**Fig. 4**) bei Mäusen. Ohne Beschränkung im Hinblick auf den Mechanismus und ohne an eine Theorie gebunden zu sein, sind diese Daten mit der Hypothese konsistent, dass HMG1 als Vorwärtsstimulator der proinflammatorischen Kaskade unter sowohl In-vitro- als auch In-vivo-Bedingungen fungiert. Diese In-vivo-Daten in einem zukunftssträchtigen Modell der Gewichtsabnahme ergibt auch den zukunftsweisenden Nachweis, dass eine pharmazeutische Formulierung, die HMG1 oder ein therapeutisch aktives Fragment desselben umfasst, eine wirksame Gewichtsabnahmetherapie ist.

Beispiel 9: In-vivo-Quellen von HMG1

[0072] Serum-HMG1-Spiegel bei Ratten mit entfernter Hypophyse gegenüber Kontrollratten wurden ebenfalls durch quantitative Bestimmung der Western-Blot-Intensitäten gemäß der obigen Beschreibung gemessen. Es bestanden signifikant höhere HMG1-Spiegel innerhalb von 12 h nach endotoxischer Stimulation (LPS mit 1, 0 mg/kg) bei Ratten mit entfernter Hypophyse (etwa 75 ng/ml) beim Vergleich zu Kontrollen (etwa 25 ng/ml). Diese Ergebnisse zeigen, dass Pituicyten nicht die Hauptquelle der Serum-HMG1-Spiegel sind und dass Makrophagen eine quantitativ wichtigere Rolle spielen können.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER: THE PICOWER INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Antagonisten von HMG1 zur Behandlung von Entzündungszuständen
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
 - (A) ADRESSAT: DAVIS WRIGHT TREMAINE
 - (B) STRASSE: 5001 Fourth Avenue 2600 Century Square
 - (C) STADT: Seattle
 - (D) STAAT: Washington
 - (E) LAND: U.S.A.
 - (F) ZIP: 98101
- (v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:
 - (A) ART DES MEDIUMS: Diskette
 - (B) COMPUTER: PC-Kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: Windows95
 - (D) SOFTWARE: Word
- (vi) DATEN DER JETZIGEN ANMLDUNG:
 - (A) ANMELDENUMMER: PCT/US00/03583
 - (B) ANMELDETAG: 14. Februar 2000
 - (C) KLASSIFIKATION:
- (viii) ANGABEN ZU ANWALT/VERTRETER:
 - (A) NAME: Jeffrey B. Oster
 - (B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 32585
 - (C) REFERENZ/AKTENNUMMER: 1201WO
- (ix) TELEKOMMUNIKATIONSANGABEN:
 - (A) TELEFON: 206 628 7711
 - (B) TELEFAX: 206 628 7699

(2) ANGABEN FÜR SEQ ID NO. 1:

- ```
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 14
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: HMG1 N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 1
```

Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser 14  
5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 42
  - (B) ART: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: unbekannt
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: PCR Primer
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 2:

CCCGCGGATC CATCGAGGGA AGGATGGGCA AAGGAGATCC TA 42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 31
  - (B) ART: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: PCR Primer

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 3:

CCCGCAAGCT TATTCATCAT CATCATCTTC T

31

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 15

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: HMG1 N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO.4:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| Gly | Lys | Gly | Asp | Pro | Lys | Lys | Pro | Arg | Gly | Lys | Met | Ser | Ser | Cys | 15 |
|     |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |    |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 42

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: HMG1 cDNA-Region, die die Initiatorsequenz überspannt

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 5:

GAGGAAAAAT AACTAAACAT GGGCAAAGGA GATCCTAAGA AG

42

### Patentansprüche

1. Antagonist von HMG1, welcher eine HMG1-vermittelte Aktivierung der Entzündungscytokinkaskade hemmt, zur Verwendung als Arzneimittel, wobei der Antagonist aus der Gruppe bestehend aus einem Antikörper, der spezifisch an ein HMG1-Protein oder ein Fragment hiervon bindet, und einer HMG1-Gen-Antisense-sequenz ausgewählt ist.

2. Antagonist nach Anspruch 1, bei welchem es sich um einen Antikörper handelt, der spezifisch an ein HMG1-Protein oder ein Fragment hiervon bindet.

3. Antikörper nach Anspruch 2, welcher polyklonal oder monoklonal ist.
4. Antagonist nach Anspruch 1, bei welchem es sich um eine HMG1-Gen-Antisensesequenz handelt.
5. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend:  
(a) einen Antagonisten von HMG1, welcher eine HMG1-vermittelte Aktivierung der Entzündungscytokinkaskade hemmt, wobei der Antagonist aus der Gruppe bestehend aus einem Antikörper, der spezifisch an ein HMG1-Protein oder ein Fragment hiervon bindet, und einer HMG1-Gen-Antisensesequenz ausgewählt ist; und  
(b) einen Antagonisten von TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIF oder IL-6.
6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5, wobei es sich bei der Komponente (a) um einen Antikörper handelt, der spezifisch an ein HMG1-Protein oder ein Fragment hiervon bindet.
7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei der Antikörper polyklonal oder monoklonal ist.
8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5, wobei es sich bei der Komponente (a) um eine HMG1-Gen-Antisensesequenz handelt.
9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 5 bis 8, wobei es sich bei der Komponente (b) der Zusammensetzung um einen Antikörper für TNF oder einen IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra) handelt.
10. Verwendung eines Antagonisten von HMG1, welcher eine HMG1-vermittelte Aktivierung der Entzündungscytokinkaskade hemmt, wobei der Antagonist aus der Gruppe bestehend aus einem Antikörper, der spezifisch an ein HMG1-Protein oder ein Fragment hiervon bindet, und einer HMG1-Gen-Antisensesequenz ausgewählt ist, zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung eines Zustands, der durch eine Aktivierung der Entzündungscytokinkaskade gekennzeichnet ist, wobei es sich bei dem Zustand um Sepsis handelt.
11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei es sich bei dem Antagonisten um einen Antikörper handelt, der spezifisch an ein HMG1-Protein oder ein Fragment hiervon bindet.
12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei der Antikörper polyklonal oder monoklonal ist.
13. Verwendung nach Anspruch 10, wobei es sich bei dem Antagonisten um eine HMG1-Gen-Antisensesequenz handelt.
14. Antikörper nach Anspruch 2 oder Anspruch 3, oder pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 6 oder Anspruch 7, wobei der die HMG1-vermittelte Aktivierung der Entzündungscytokinkaskade hemmende Antikörper aus der Gruppe bestehend aus einem chimären Antikörper, einem einkettigen Antikörper, einem humanen Antikörper und einem humanisierten Antikörper ausgewählt ist.
15. Antikörper nach Anspruch 2 oder 3, oder pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 6 oder Anspruch 7, wobei der die HMG1-vermittelte Aktivierung der Entzündungscytokinkaskade hemmende Antikörper an ein aus der Aminosäuresequenz GKGDPPKKPRGKMSSC (SEQ. ID NO: 4) bestehendes Peptid binden kann.
16. Antikörper nach einem der Ansprüche 2, 3, 14 und 15, oder pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 6, 7, 14 und 15, wobei es sich bei dem Antikörper um ein Antikörperfragment handelt.
17. Antikörper oder pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 16, wobei das Antikörperfragment ein Fab-Fragment ist.
18. Verwendung nach Anspruch 11 oder Anspruch 12, wobei der Antikörper aus der Gruppe bestehend aus einem chimären Antikörper, einem einkettigen Antikörper, einem humanen Antikörper und einem humanisierten Antikörper ausgewählt ist.
19. Verwendung nach Anspruch 11 oder Anspruch 12, wobei der Antikörper an ein aus der Aminosäuresequenz GKGDPPKKPRGKMSSC (SEQ ID NO: 4) bestehendes Peptid binden kann.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 11, 12, 18 und 19, wobei es sich bei dem Antikörper um ein Antikörperfragment handelt.

21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei das Antikörperfragment ein Fab-Fragment ist.

Es folgen 10 Seiten Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

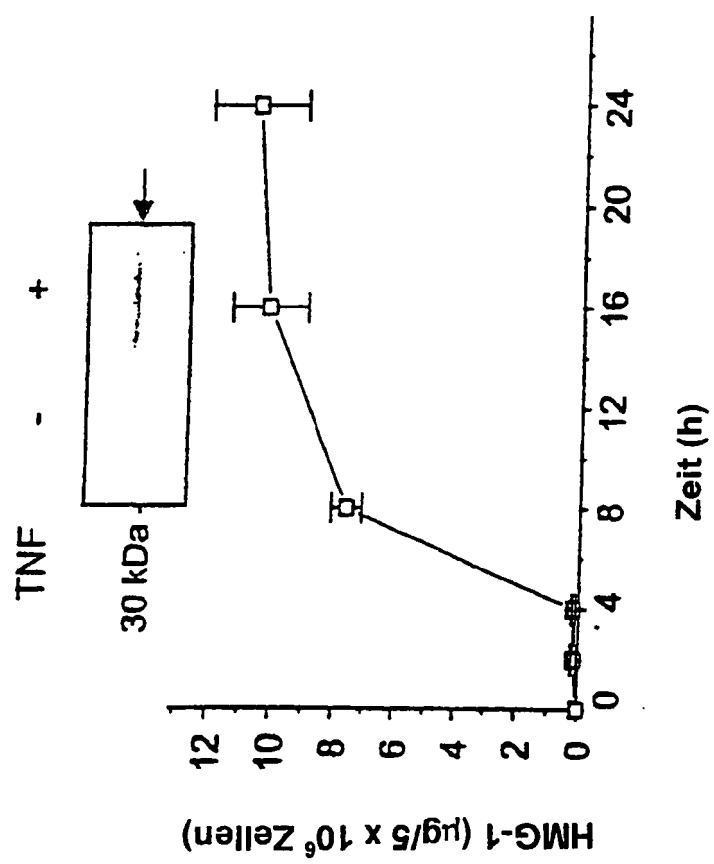


Fig. 1a

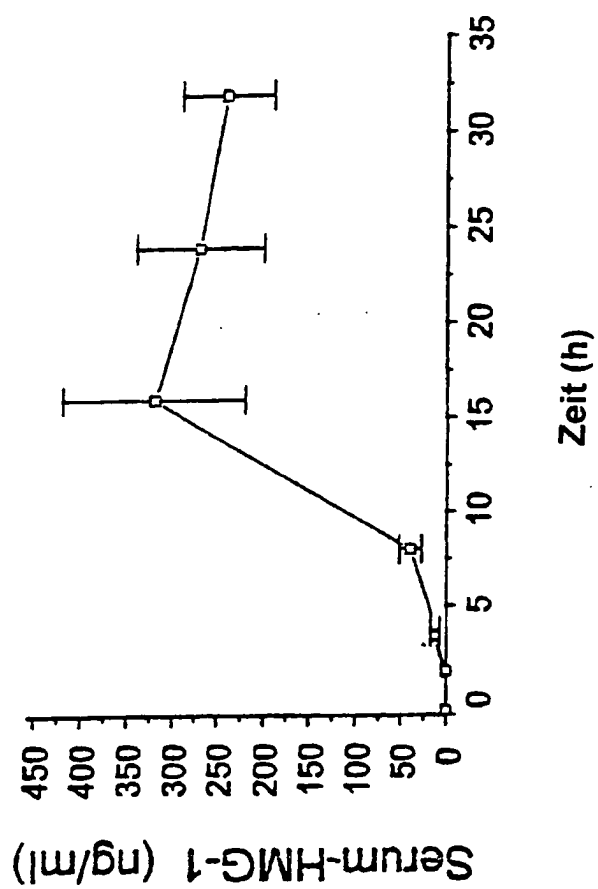


Fig. 1b

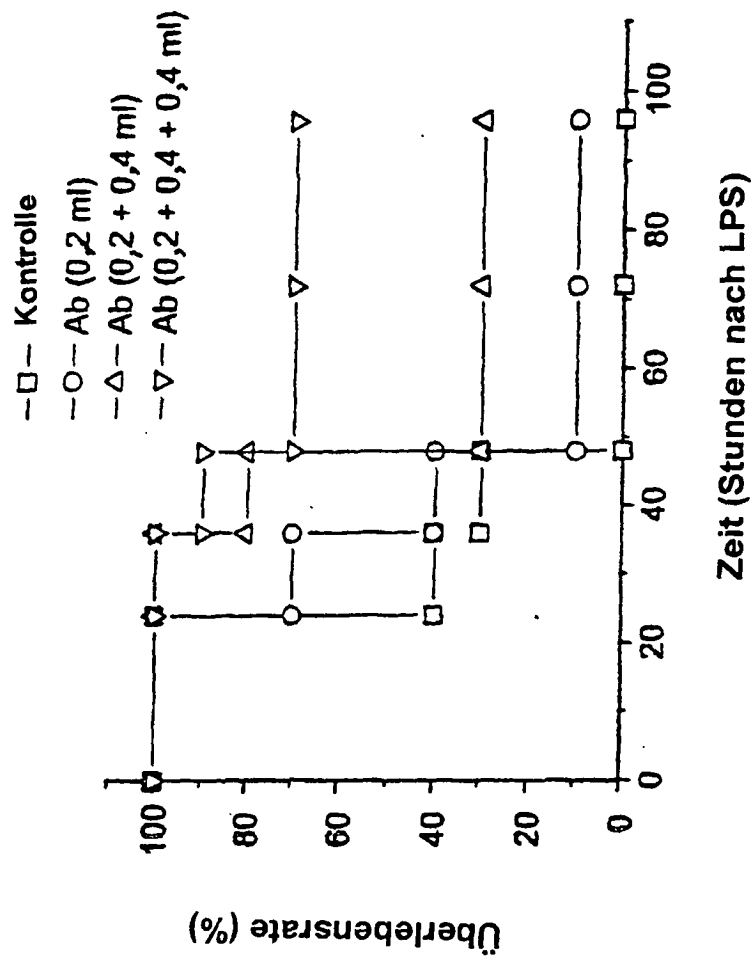


Fig. 2a

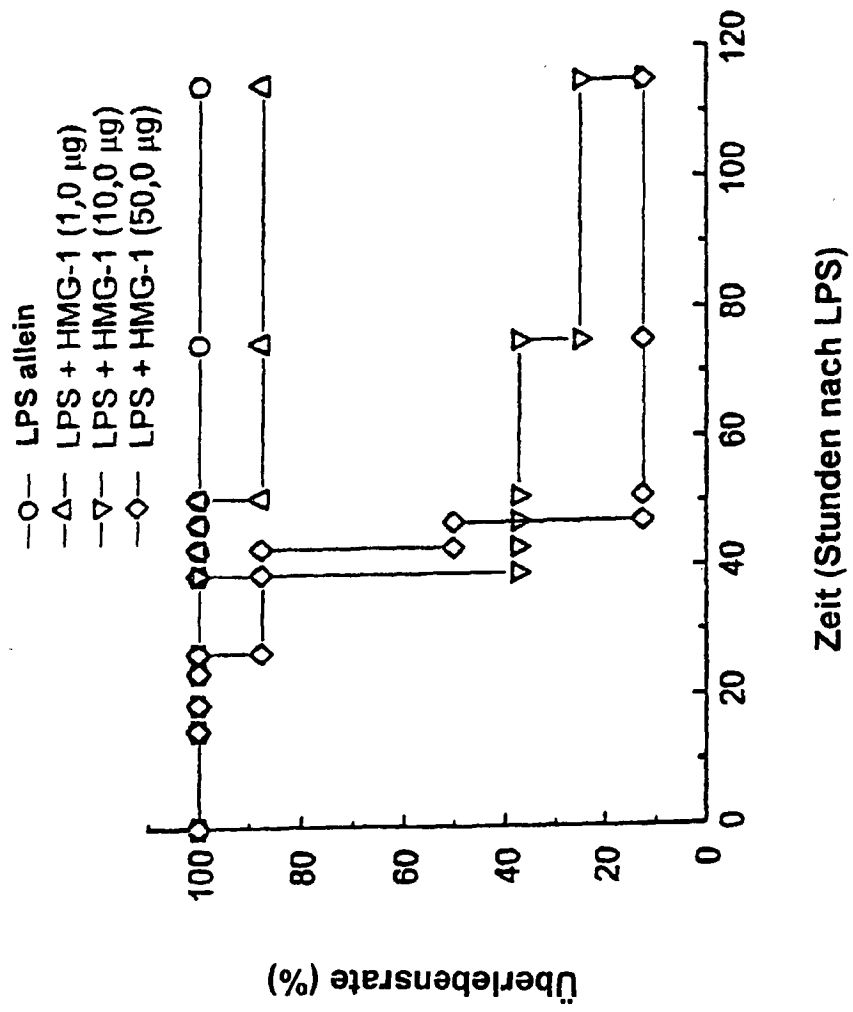


Fig. 2b



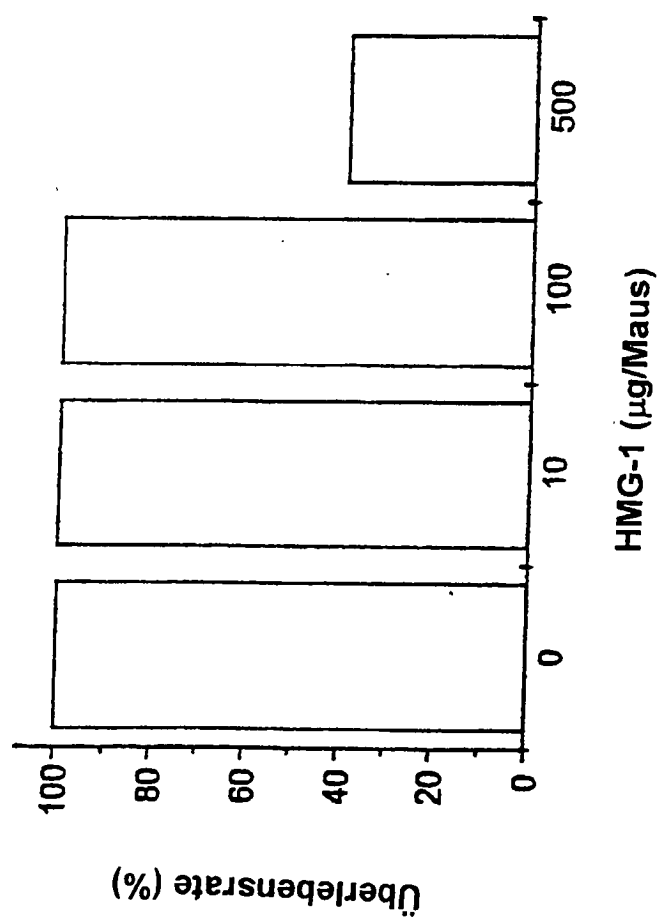


Fig. 2c

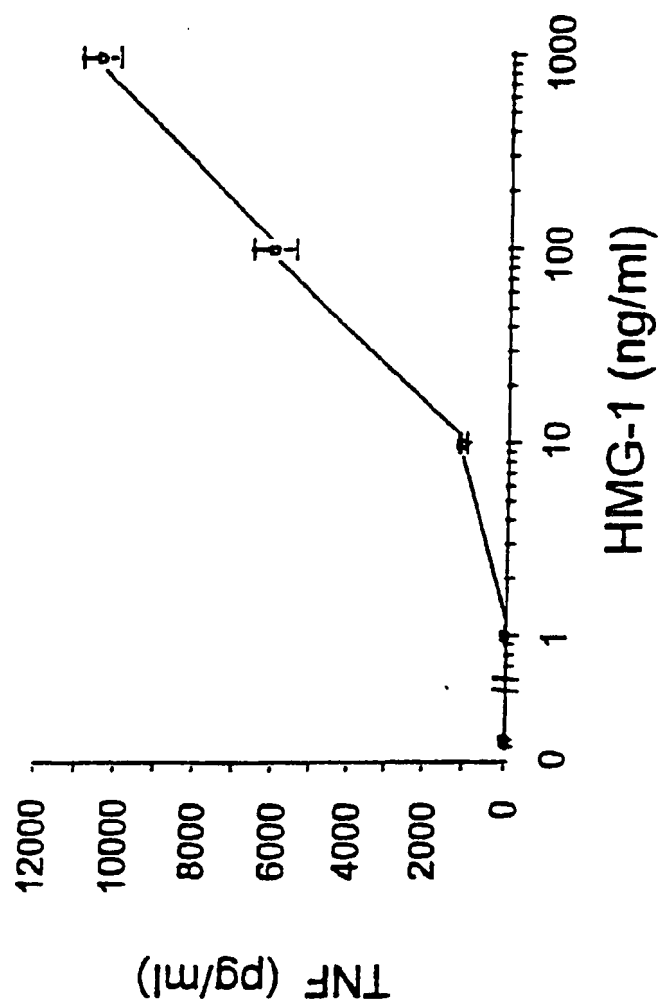


Fig. 3a

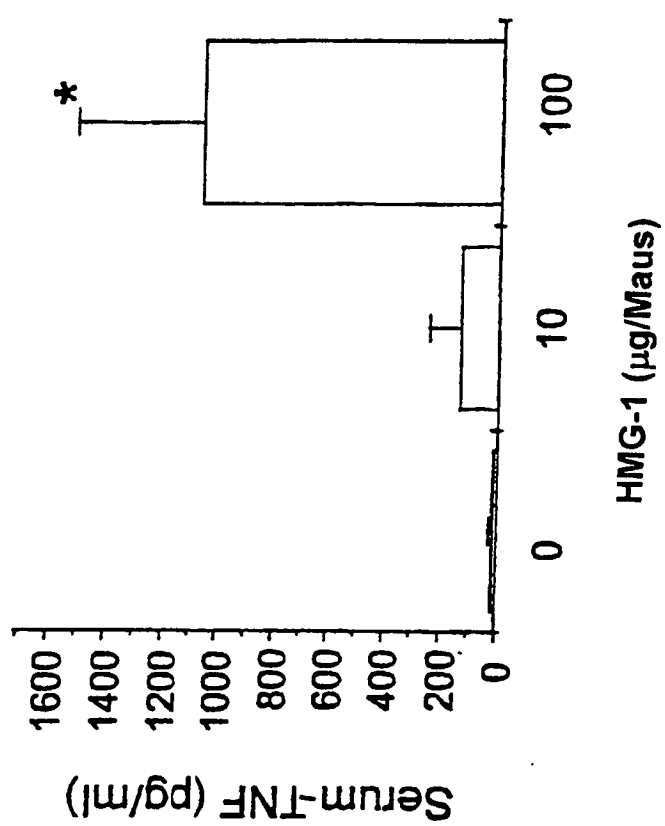


Fig. 3b

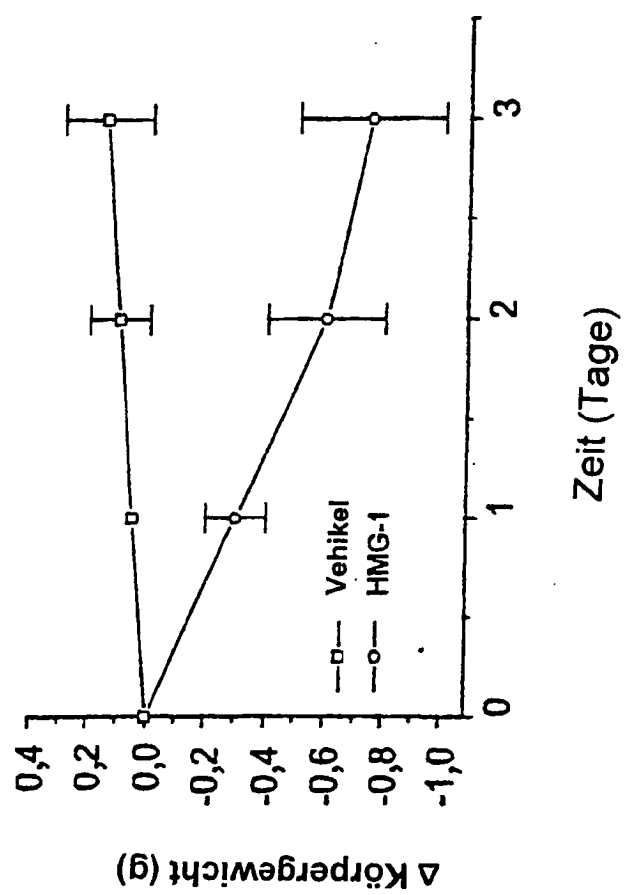
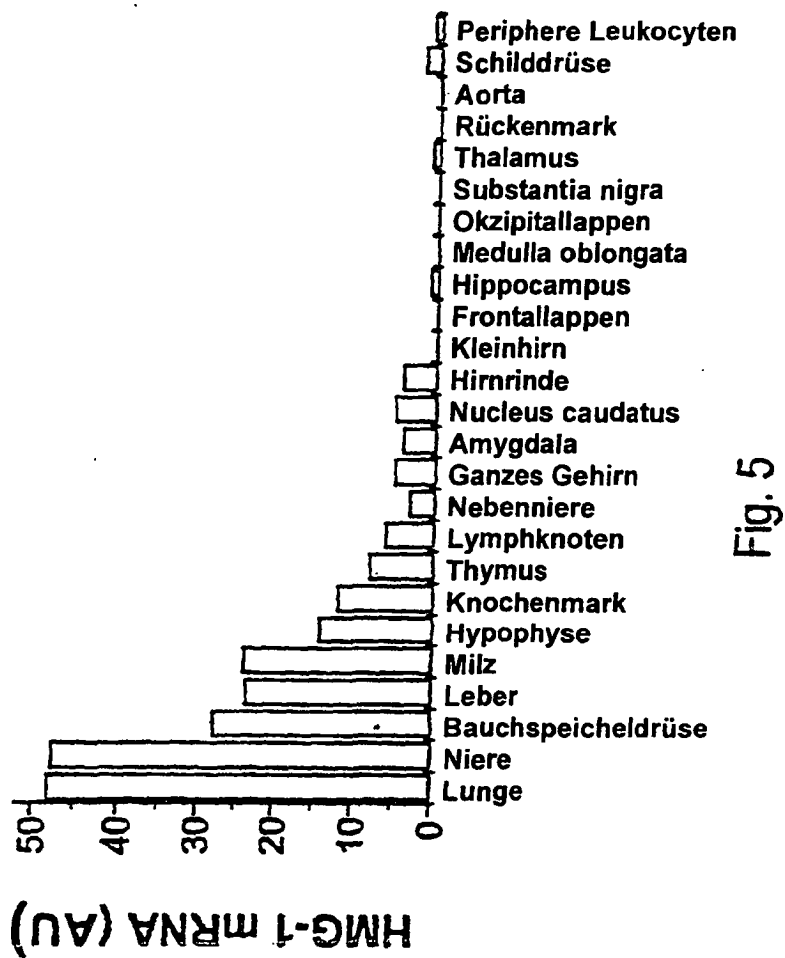


Fig. 4



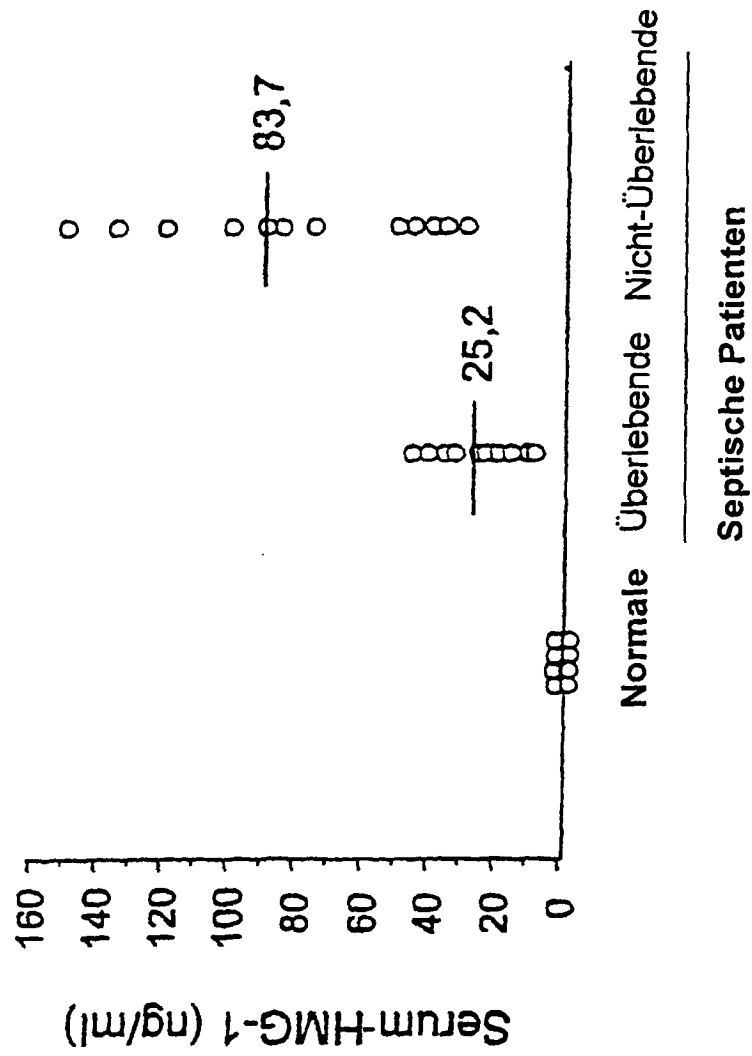


Fig. 6