

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 629**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2008 E 08869976 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2231707**

54 Título: **Anticuerpos anti-MIF**

30 Prioridad:

04.01.2008 US 18988 P

05.09.2008 US 94685 P

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

18.03.2015

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (33.3%)

**One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015, US;**

**BAXTER HEALTHCARE S.A. (33.3%) y
DYAX CORPORATION (33.3%)**

72 Inventor/es:

KERSCHBAUMER, RANDOLF;

SCHEIFLINGER, FRIEDRICH;

RIEGER, MANFRED;

THIELE, MICHAEL;

MUDDE, C. GEERT;

MUELLBERG, JUERGEN y

HOET, RENE

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones :

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

ES 2 531 629 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

Anticuerpos anti-MIF

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales y a partes de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la región C-terminal o central del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF). Estos anticuerpos anti-MIF y partes de unión a antígeno de los mismos inhiben además la función biológica de MIF humano. La invención también se refiere a líneas celulares aisladas que producen anticuerpos anti-MIF y a moléculas de ácido nucleico que codifican para tales inmunoglobulinas. La presente invención también se refiere a un método de identificación de anticuerpos anti-MIF, a composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos y a un método de uso de estos anticuerpos y composiciones para el tratamiento de estados relacionados con MIF.

15 **Antecedentes**

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citocina aislada inicialmente basándose en su capacidad para inhibir la migración de macrófagos aleatoria *in vitro* (Bloom *et al.* Science 1966, 153, 80-2; David *et al.* PNAS 1966, 56, 72-7). Aunque se ha conocido MIF desde 1966, no se conoce su función exacta en la mayoría de células, pero parece que MIF es un regulador posterior crítico de la respuesta inmunitaria innata y adquirida.

El ADNc de MIF humano se clonó en 1989 (Weiser *et al.*, PNAS 1989, 86, 7522-6), y su ubicación genómica se mapeó en el cromosoma 22. El producto del gen de MIF es una proteína de aminoácidos con una masa molecular de 12,5 kDa. La proteína está altamente conservada con una homología de secuencia entre MIF humano, de ratón, de rata y bovino de entre el 90 - 96%. Sin embargo, MIF no tiene ninguna homología de secuencia significativa con ninguna otra proteína. La estructura tridimensional de MIF es distinta de cualquier otra citocina u hormona hipofisaria. La proteína cristaliza como un trímero de subunidades idénticas. Cada monómero contiene dos hélices alfa antiparalelas que se empaquetan frente a una lámina beta de cuatro hebras. El monómero tiene dos hebras beta adicionales que interactúan con las láminas beta de subunidades adyacentes para formar la superficie de contacto entre monómeros. Las tres láminas beta se disponen para formar un barril que contiene un canal accesible por disolvente que discurre a través del centro de la proteína a lo largo de un eje triple molecular (Sun *et al.* PNAS 1996, 93, 5191-5196).

Se notificó que se indujo la secreción de MIF a partir de macrófagos a concentraciones muy bajas de glucocorticoide (Calandra *et al.* Nature 1995, 377, 68-71). Sin embargo, como citocina proinflamatoria, MIF también contrarregula los efectos de glucocorticoides y estimula la secreción de otras citocinas tales como el factor de necrosis tumoral TNF- α e interleucina IL-1 β (Baugh *et al.* Crit Care Med 2002, 30, S27-35) asumiendo por tanto un papel en la patogenia de enfermedades inflamatorias e inmunitarias. MIF también se asocia directamente con el crecimiento de linfoma, melanoma y cáncer de colon (Nishihira *et al.* J Interferon Cytokine Res. 2000, 20: 751-62).

MIF es un mediador de muchos estados patológicos y por tanto se asocia con una variedad de enfermedades incluyendo enfermedad inflamatoria del intestino (EII), artritis reumatoide (AR), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), asma, glomerulonefritis, nefropatía por IgA, cáncer, infarto de miocardio (IM) y septicemia.

Se han desarrollado anticuerpos anti-MIF monoclonales y policlonales frente a MIF humano recombinante (Shimizu *et al.*, FEBS Lett. 1996; 381, 199-202; Kawaguchi *et al.*, J. Leukoc. Biol. 1986, 39, 223-232 y Weiser *et al.*, Cell. Immunol. 1985, 90, 167-78).

Se han sugerido anticuerpos anti-MIF para su uso terapéutico para inhibir la liberación de TNF- α . Se notifica que Calandra *et al.*, (J. Inflamm. 1995, 47, 39-51) usaron anticuerpos anti-MIF para proteger animales frente a choque séptico inducido experimentalmente por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Se sugirieron anticuerpos anti-MIF como medios de terapia para modular la producción de citocinas en choque séptico y otros estados patológicos inflamatorios.

El documento US 6.645.493 da a conocer anticuerpos anti-MIF monoclonales derivados a partir de células de hibridoma, que neutralizan la actividad biológica de MIF. Pudo mostrarse en un modelo animal que estos anticuerpos anti-MIF derivados de ratón tenían un efecto beneficioso en el tratamiento de choque inducido por endotoxinas. Algunos de los anticuerpos anti-MIF descritos (III.D.9, XIV.14.3 y XIV.15.5) se usaron en la presente invención para experimentos comparativos.

El documento US 2003/0235584 da a conocer métodos de preparación de anticuerpos de alta afinidad frente a MIF en animales en los que se ha desactivado de manera homocigótica el gen de MIF.

El factor inhibidor de la glicosilación (GIF) es una proteína descrita por Galat *et al.* (Eur. J. Biochem. 1994, 224, 417-21). Se reconoce ahora que MIF y GIF son idénticos. Watarai *et al.* (PNAS 2000, 97, 13251-6) describieron

anticuerpos policlonales que se unen a diferentes epítomos de GIF para identificar la naturaleza bioquímica de la modificación postraducciona de GIF en células T. Watarai *et al* (PNAS 2000, 97, 13251-6) notificaron que GIF se produce en diferentes isoformas conformacionales *in vitro*. Un tipo de isómero se produce mediante modificación química de un único residuo de cisteína. La modificación química conduce a cambios conformacionales dentro de la proteína GIF y cambia su función biológica.

Se conocen en general anticuerpos anti-MIF. Se hace referencia, a modo de ejemplo, al documento US 2003/0099653 que da a conocer, por ejemplo, el anticuerpo III.D.9.

Este anticuerpo también se conoce a partir de varios documentos adicionales. Véanse, por ejemplo, el documento US 2004/0156848 y el documento WO 98/17314 así como el documento USA 6.030.615. Los documentos también se refieren, por ejemplo, al anticuerpo XIV.14.3. Estos anticuerpos no se unen al mismo epítomo que los anticuerpos de la invención actualmente reivindicados. También se hace referencia a Zang *et al.*, International Immunol. Pharmacology 2011, DOI: 0.1016/J.INTIMP.2011.04.017 que dan a conocer 8 anticuerpos frente a la molécula de MIF, todos los cuales se unen a la parte N-terminal de la molécula de MIF.

Incluso basándose en esta documentación, existe la necesidad de anticuerpos anti-MIF adicionalmente mejorados.

Dada la complejidad de la participación de MIF en diversas enfermedades, se desea sumamente una aclaración de la función de anticuerpos anti-MIF específicos de epítomo y de su uso para enfoques terapéuticos. Por tanto, existe la necesidad de anticuerpos anti-MIF específicos de epítomo, que inhiban la función biológica de MIF humano para el tratamiento de enfermedades y estados mediados por MIF.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos y a partes de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la región C-terminal o central del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), tal como se define en las reivindicaciones.

La invención se refiere además a moléculas de ácido nucleico que codifican para estos anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos, así como a vectores que comprenden un ácido nucleico de este tipo y a células huésped que comprenden un vector de este tipo, así como a métodos para la producción recombinante de polipéptidos codificados por moléculas de ácido nucleico.

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-MIF o una parte de unión a antígeno del mismo. La composición farmacéutica también puede contener un portador farmacéuticamente aceptable u otros agentes terapéuticos.

La invención también se refiere al uso de un anticuerpo anti-MIF o una parte de unión a antígeno del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inmunológicas tales como enfermedades inflamatorias y trastornos hiperproliferativos.

La invención se refiere además a un anticuerpo anti-MIF o una parte de unión a antígeno del mismo, para su uso en el tratamiento de enfermedades inmunológicas tales como enfermedades inflamatorias y trastornos hiperproliferativos.

La invención se refiere además a un procedimiento para la identificación de un anticuerpo anti-MIF que puede inhibir MIF activo e inducir un efecto beneficioso en un modelo animal.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-MIF humano de la invención.

Figura 2: muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-MIF humano de la invención.

Figura 3: muestra la secuencia de ADN y su traducción de la región variable de la cadena ligera de anticuerpos anti-MIF humano de la invención.

Figura 4: muestra la secuencia de ADN y su traducción de la región variable de la cadena pesada de anticuerpos anti-MIF humano de la invención.

Figura 5: Experimento de competencia de III.D.9 murino frente a un anticuerpo control (C3) y anticuerpo anti-MIF Bax94. Puede observarse una clara competencia mediante cantidades crecientes de anticuerpo Bax94.

Figura 6: El anticuerpo Bax94 (línea de puntos) y el anticuerpo Bax152 (línea de rayas) mostraron supervivencia aumentada y tiempo a la muerte retardado en el modelo animal de peritonitis en comparación con un anticuerpo control (C3).

5 Figura 7: Unión diferencial del anticuerpo Bax94 a MIF activo y MIF no activo. El anticuerpo Bax94 se une a MIF activo en un formato de ELISA directo, mientras que no se une a MIF no activo.

Figura 8: Tabla que resume las propiedades *in vitro* de anticuerpos anti-MIF humano.

10 Figura 9: Efectos proapoptóticos de anticuerpos anti-MIF en un ensayo basado en células. Se muestran las actividades de caspasa-3 celular (caspasa efectora) tras el tratamiento de células PC-3 con anticuerpos. Se realizan los ensayos por triplicado y se presentan los datos como media \pm DE.

15 Figura 10: Efectos antiinvasivos de anticuerpos anti-MIF. Se examina la invasión de células de cáncer de próstata PC-3 a través de poros de insertos Transwell™ recubiertos con Matrigel. Se cuenta el número de células invadidas por campo visual (microscopio con un aumento de 400 veces). Se presentan los datos como media \pm DE de recuentos de 3-10 campos visuales y se muestran las diferencias significativas.

20 Descripción detallada de la invención

Definiciones y técnicas generales

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos habituales en la técnica. En general, las nomenclaturas usadas en relación con, y técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos descritas en el presente documento son las que se conocen bien y se usan comúnmente en la técnica. Los métodos y las técnicas de la presente invención se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se comentan a lo largo de la totalidad de la presente memoria descriptiva a menos que se indique lo contrario. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow y Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), que se incorporan al presente documento como referencia.

35 “MIF” o “factor inhibidor de la migración de macrófagos” se refiere a la proteína que se conoce como mediador crítico en la respuesta inmunitaria e inflamatoria, especialmente como contrarregulador de glucocorticoides. MIF incluye MIF de mamífero, específicamente MIF humano (número de registro primario de Swiss-Prot: P14174), en el que la forma monomérica se codifica como proteína de 115 aminoácidos pero se produce como proteína de 40 114 aminoácidos debido a escisión de la metionina inicial. “MIF” también incluye “GIF” (factor inhibidor de la glicosilación) y otras formas de MIF tales como proteínas de fusión de MIF. La numeración de los aminoácidos de MIF comienza con la metionina N-terminal (aminoácido 1) y termina con la alanina C-terminal (aminoácido 115).

45 El término “MIF activo” se refiere a isoformas conformacionales de MIF que se producen de manera natural, que son relevantes para su función biológica. MIF activo incluye isoformas que pueden observarse en la superficie de células (tales como THP1 o similar). MIF activo también incluye isoformas de MIF que se producen en suero de mamíferos tras la exposición con bacterias.

50 Un “anticuerpo” se refiere a un anticuerpo intacto o una parte de unión a antígeno que compete con el anticuerpo intacto para la unión específica. Véase en general, *Fundamental Immunology*, Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (incorporado como referencia). El término anticuerpo incluye formas modificadas por ingeniería genética tales como anticuerpos quiméricos o humanizados.

55 El término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, MIF). Pueden producirse partes de unión a antígeno mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Las partes de unión a antígeno incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y de región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos y polipéptidos que contienen al menos una parte de un anticuerpo que es suficiente para conferir unión a antígeno específico al polipéptido. Desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, los dominios variables de cadena tanto ligera como pesada madura comprenden las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es según las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), Chothia *et al.* *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987) o Chothia *et al.*, *Nature* 342: 878-883 (1989). Un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo puede derivatizarse o unirse a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo puede unirse de manera funcional a una o más de otras entidades

moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una molécula de unión.

El término "anticuerpo humano" se refiere a cualquier anticuerpo en el que las secuencias de dominio variable y constante son secuencias humanas. El término abarca anticuerpos con secuencias derivadas a partir de genes humanos, pero que se han cambiado, por ejemplo, para disminuir una posible inmunogenicidad, aumentar la afinidad, eliminar cisteínas que pueden provocar plegamiento indeseable, etc. El término abarca tales anticuerpos producidos de manera recombinante en células no humanas, que pueden conferir glicosilación no típica de células humanas.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como fragmentos Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, u otras partes de unión a antígeno de anticuerpos), que contienen secuencias derivadas a partir de una inmunoglobulina no humana.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende regiones de dos o más especies diferentes.

El término "anticuerpo aislado" o "parte de unión a antígeno aislada del mismo" se refiere a un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo que se ha identificado y seleccionado a partir de una fuente de anticuerpos tal como una biblioteca de presentación en fagos o un repertorio de células B.

El término "K_D" se refiere a la constante de disociación en equilibrio de una parte Fab de un anticuerpo particular con el antígeno respectivo.

Los términos "región central" y "región C-terminal" de MIF se refieren a la región de MIF humano que comprende los aminoácidos 35-68 y 86-115, respectivamente.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante de proteína que puede unirse específicamente a un fragmento de inmunoglobulina o anticuerpo. Los determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activa tales como aminoácidos expuestos, aminoazúcares, u otras cadenas laterales de hidratos de carbono y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específica.

El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. En algunas realizaciones, el vector es un plásmido, es decir, un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales.

El término "célula huésped" se refiere a una línea celular que puede producir una proteína recombinante tras introducir un vector de expresión. El término "línea celular recombinante", se refiere a una línea celular en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que "línea celular recombinante" significa no sólo la línea celular objeto particular sino también la progenie de una línea celular de este tipo. Dado que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones subsiguientes debidas o bien a mutación o bien a influencias del entorno, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula madre, pero todavía se incluyen dentro del alcance del término "línea celular recombinante" tal como se usa en el presente documento.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles.

50 Anticuerpos anti-MIF

En una realización, la invención se refiere a anticuerpos monoclonales aislados o partes de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a la región C-terminal o central de MIF humano e inhiben además la función biológica de MIF humano tal como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales son anticuerpos monoclonales humanos. En otras realizaciones, los anticuerpos monoclonales son anticuerpos monoclonales humanizados.

En algunas realizaciones, la cadena ligera del anticuerpo anti-MIF comprende la secuencia de aminoácidos que es igual a la secuencia de aminoácidos de la V_L del anticuerpo Bax69 (SEQ ID NO: 2), el anticuerpo Bax94 (SEQ ID NO: 4), el anticuerpo Bax152 (SEQ ID NO: 5), el anticuerpo BaxA10 (SEQ ID NO: 6), o una secuencia de aminoácidos que tiene el 85%, preferiblemente el 90% de homología de secuencia con respecto a dichas secuencias de aminoácidos. En algunas realizaciones, la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos desde el principio de la CDR1 hasta el final de la CDR3 de uno cualquiera de dichos anticuerpos. En algunas realizaciones, la cadena ligera del anticuerpo anti-MIF comprende al menos la CDR1, la CDR2 o la CDR3 de cadena ligera de las secuencias de aminoácidos mostradas en la figura 1. Secuencias de V_L de referencia son del anticuerpo Bax8 (SEQ ID NO: 1) y del anticuerpo Bax74 (SEQ ID NO: 3).

En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable (V_H) del anticuerpo Bax69 (SEQ ID NO: 8), el anticuerpo Bax94 (SEQ ID NO: 10), el anticuerpo Bax152 (SEQ ID NO: 12), el anticuerpo BaxA10 (SEQ ID NO: 12), o una secuencia de aminoácidos que tiene el 85%, preferiblemente el 90% de homología de secuencia con respecto a dichas secuencias de aminoácidos. Secuencias de V_H de referencia son del anticuerpo Bax8 (SEQ ID NO: 7) y del anticuerpo Bax74 (SEQ ID NO: 9). En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos desde el principio de la CDR1 hasta el final de la CDR3 de uno cualquiera de dichos anticuerpos. En algunas realizaciones, la cadena pesada del anticuerpo anti-MIF comprende al menos la CDR1, la CDR2 o la CDR3 de cadena pesada de las secuencias de aminoácidos mostradas en la figura 2.

Clase y subclase de anticuerpos anti-MIF

El anticuerpo anti-MIF de la invención es un anticuerpo monoclonal aislado. El anticuerpo anti-MIF puede ser una molécula de IgG, IgM, IgE, IgA o IgD. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-MIF es una IgG y es de una subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En otras realizaciones, el anticuerpo es de subclase o bien IgG1 o bien IgG4. En otras realizaciones, el anticuerpo es de subclase IgG4. En algunas realizaciones, el anticuerpo IgG4 tiene una única mutación que cambia la serina (serina228, según el esquema de numeración de Kabat) por prolina. Por consiguiente, la subsecuencia CPSC en la región Fc de IgG4 se vuelve CPPC, que es una subsecuencia en IgG1 (Angal *et al.* Mol Immunol. 1993, 30, 105-108).

Epítomos de MIF reconocidos por anticuerpos anti-MIF

La invención se refiere a anticuerpos anti-MIF o partes de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a las regiones que abarcan desde los aminoácidos 50 hasta 68, o de 86 a 102, respectivamente, e inhiben la función biológica de MIF humano.

En otras realizaciones, la invención se refiere a anticuerpos anti-MIF, que se unen específicamente a MIF activo e inhiben además la función biológica de MIF humano. En algunas realizaciones, MIF activo está unido a membrana.

Se encontró sorprendentemente que los anticuerpos anti-MIF de la invención tenían la propiedad sorprendente de competir con el anticuerpo anti-MIF III.D.9 en estudios de unión con MIF humano. Puede determinarse la competencia de III.D.9 tal como se describe en el ejemplo 5.

Afinidad de unión de anticuerpos anti-MIF frente a MIF humano

La invención se refiere a anticuerpos anti-MIF o partes de unión a antígeno de los mismos, que se unen a MIF humano con una K_D de 5×10^{-7} M o menos. En otras realizaciones, los anticuerpos se unen a MIF humano con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, 5×10^{-9} M o menos o 5×10^{-10} M o menos.

La afinidad de unión de anticuerpos anti-MIF o partes de unión a antígeno de los mismos frente a MIF humano puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica. La afinidad de unión puede medirse, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón superficial (BIACORE). El ejemplo 10 muestra a modo de ejemplo un método para determinar constantes de afinidad de anticuerpos anti-MIF mediante tecnología BIACORE.

En algunas realizaciones, la invención se refiere además a anticuerpos anti-MIF o a partes de unión a antígeno de los mismos, que se unen a MIF activo con una K_D de menos de 500 nM e inhiben además la función biológica de MIF humano. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-MIF o partes de unión a antígeno de los mismos se unen a MIF activo con una K_D de menos de 50 nM.

Producción de anticuerpos anti-MIF

Pueden prepararse anticuerpos anti-MIF o partes de unión a antígeno de los mismos según la presente invención mediante muchos métodos conocidos por el experto en la técnica, tales como examen de bibliotecas de presentación en fagos de fragmentos de anticuerpo. Pueden usarse diferentes formatos de bibliotecas de presentación en fagos, por ejemplo, bibliotecas de fragmentos scFv o Fab, o similares. Se examina una biblioteca de presentación en fagos para detectar fragmentos de anticuerpo con afinidades deseadas para determinados epítomos de MIF y se recupera el material genético del clon apropiado. En rondas consecutivas de generación y examen de bibliotecas, puede aislarse un fragmento de anticuerpo con una afinidad aumentada en comparación con la afinidad del fragmento de anticuerpo original aislado. La afinidad de un fragmento de anti-MIF identificado puede potenciarse adicionalmente mediante maduración de afinidad.

Ácidos nucleicos, vectores, células huésped y métodos recombinantes de preparación de anticuerpos anti-MIF

La invención se refiere además a moléculas de ácido nucleico que codifican para anticuerpos anti-MIF o partes de unión a antígeno de los mismos según la presente invención, así como a vectores que comprenden un ácido nucleico de este tipo y a células huésped que comprenden un vector de este tipo, así como a métodos de

producción de manera recombinante de un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, la secuencia de ADN que codifica para la región V_L del anticuerpo anti-MIF comprende la secuencia de nucleótidos que es igual a la secuencia de la V_L del anticuerpo Bax69 (SEQ ID NO: 14), el anticuerpo Bax94 (SEQ ID NO: 16), el anticuerpo Bax152 (SEQ ID NO: 17), el anticuerpo BaxA10 (SEQ ID NO: 18) tal como se muestra en la figura 3, o una secuencia que tiene el 85%, preferiblemente el 90% de homología de secuencia con respecto a cualquiera de dichas secuencias de nucleótidos.

En algunas realizaciones, la secuencia de ADN que codifica para la región V_H del anticuerpo anti-MIF comprende la secuencia de nucleótidos que es igual a la secuencia de la V_H del anticuerpo Bax69 (SEQ ID NO: 20), el anticuerpo Bax94 (SEQ ID NO: 22), el anticuerpo Bax152 (SEQ ID NO: 23), el anticuerpo BaxA10 (SEQ ID NO: 24) tal como se muestra en la figura 4, o una secuencia que tiene el 85%, preferiblemente el 90% de homología de secuencia con respecto a cualquiera de dichas secuencias de nucleótidos.

La producción de los anticuerpos anti-MIF según la presente invención incluye cualquier método para la generación de ADN recombinante mediante ingeniería genética, por ejemplo, mediante transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN y clonación en vectores de expresión. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. En algunas realizaciones, el vector puede replicarse de manera autónoma en una célula huésped en la que se introduce (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). En otras realizaciones, el vector (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) puede integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y replicarse de ese modo junto con el genoma huésped. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos. Tales vectores se denominan "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión") en el presente documento.

Pueden producirse anticuerpos anti-MIF por medio de vectores de expresión convencionales, tales como vectores bacterianos (por ejemplo, pBR322 y sus derivados) o vectores eucariotas. Aquellas secuencias que codifican para el anticuerpo pueden dotarse de secuencias reguladoras que regulan la replicación, la expresión y/o la secreción a partir de la célula huésped. Estas secuencias reguladoras comprenden, por ejemplo, promotores (por ejemplo, CMV o SV40) y secuencias señal. Los vectores de expresión también pueden comprender marcadores de selección y amplificación, tales como el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR), higromicina-B-fosfotransferasa y timidina-cinasa. Los componentes de los vectores usados, tales como marcadores de selección, replicones, potenciadores, pueden o bien obtenerse comercialmente o bien prepararse por medio de métodos convencionales. Los vectores pueden construirse para la expresión en diversos cultivos celulares, por ejemplo, en células de mamífero tales como CHO, COS, HEK293, NSO, fibroblastos, células de insecto, levadura o bacterias tales como *E. coli*. En algunos casos, se usan células que permiten la glicosilación óptima de la proteína expresada.

El gen de cadena ligera del anticuerpo anti-MIF y el gen de cadena pesada del anticuerpo anti-MIF pueden insertarse en vectores separados o se insertan ambos genes en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante métodos convencionales, por ejemplo, ligamiento de sitios de restricción complementarios en el fragmento de gen de anticuerpo y vector, o ligamiento de extremos romos si no están presentes sitios de restricción.

La producción de anticuerpos anti-MIF o partes de unión a antígeno de los mismos puede incluir cualquier método conocido en la técnica para la introducción de ADN recombinante en células eucariotas mediante transfección, por ejemplo, mediante electroporación o microinyección. Por ejemplo, la expresión recombinante del anticuerpo anti-MIF puede conseguirse mediante la introducción de un plásmido de expresión que contiene la secuencia de ADN que codifica para el anticuerpo anti-MIF bajo el control de una o más secuencias reguladoras tales como un promotor fuerte, en una línea celular huésped adecuada mediante un método de transfección apropiado que da como resultado células que tienen las secuencias introducidas integradas de manera estable en el genoma. El método de lipofección es un ejemplo de un método de transfección que puede usarse según la presente invención.

La producción de anticuerpos anti-MIF también puede incluir cualquier método conocido en la técnica para el cultivo de dichas células transformadas, por ejemplo, de una manera continua o discontinua, y la expresión del anticuerpo anti-MIF, por ejemplo, constitutiva o tras la inducción.

El tipo de célula huésped según la presente invención puede ser cualquier célula eucariota. En una realización, la célula es una célula de mamífero con la capacidad para realizar modificaciones postraduccionales de anticuerpos anti-MIF. Por ejemplo, dicha célula de mamífero se deriva a partir de una línea celular de mamífero, tal como, por ejemplo, una línea celular seleccionada del grupo que consiste en células SkHep, CHO, HEK293 y BHK. En una realización, el anticuerpo anti-MIF se expresa en una línea celular CHO con déficit de DHFR, por ejemplo, DXB11, y la adición de G418 como marcador de selección. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican para genes de anticuerpo en células huésped de mamífero, se producen los anticuerpos cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se hacen crecer las células huésped. Pueden recuperarse anticuerpos anti-MIF a partir del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas

convencionales.

Adicionalmente, la producción de anticuerpos anti-MIF puede incluir cualquier método conocido en la técnica para la purificación de un anticuerpo, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de afinidad. En una realización, el anticuerpo anti-MIF puede purificarse a partir de sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de exclusión molecular.

Propiedades de anticuerpos anti-MIF

La invención se refiere a anticuerpos anti-MIF o a parte de unión a antígeno de los mismos, que presentan al menos una de las siguientes propiedades:

- a) se unen a la región C-terminal o central de MIF humano,
- b) inhiben la actividad de anulación de glucocorticoides (GCO),
- c) inhiben la proliferación de líneas celulares tales como fibroblastos o células cancerosas (por ejemplo, NIH/3T3 o PC-3),
- d) se unen a MIF activo,
- e) no se unen a MIF no activo,
- f) compiten con el anticuerpo anti-MIF III.D.9 de ratón.

En algunas realizaciones, MIF activo es una isoforma de MIF activo que se produce mediante el tratamiento de MIF humano con reactivos oxidantes leves, tales como cistina o mediante la inmovilización de MIF humano sobre un soporte tal como una placa de ELISA o perlas. En otras realizaciones, MIF activo es una isoforma de MIF activo que se produce *in vivo* tras la exposición de animales con bacterias. En otras realizaciones, MIF activo es una isoforma de MIF activo que se produce *in vivo* sobre la superficie de células (por ejemplo, THP1, CFB).

En algunas realizaciones, MIF no activo es MIF reducido (por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 7) o MIF almacenado intracelular.

En otras realizaciones, los anticuerpos anti-MIF o parte de unión a antígeno de los mismos se unen a MIF activo con una K_D de menos de 500 nM.

Composiciones farmacéuticas de anticuerpos anti-MIF y métodos de tratamiento

La invención también se refiere a composiciones que comprenden un anticuerpo anti-MIF o una parte de unión a antígeno del mismo, para el tratamiento de un sujeto que necesita tratamiento para estados relacionados con MIF, específicamente enfermedades inmunológicas tales como enfermedades inflamatorias y trastornos hiperproliferativos.

En algunas realizaciones, el sujeto que necesita tratamiento es un ser humano. Los trastornos hiperproliferativos, tales como enfermedades cancerosas, que pueden tratarse mediante los anticuerpos anti-MIF de la invención pueden implicar cualquier tejido u órgano e incluyen, pero no se limitan a, cánceres de cerebro, de pulmón, de células escamosas, de vejiga, gástrico, de páncreas, de mama, de cabeza, de cuello, de hígado, renal, de ovario, de próstata, colorrectal, de esófago, ginecológico, de nasofaringe o de tiroides, melanomas, linfomas, leucemias o mielomas múltiples. En particular, los anticuerpos anti-MIF de la invención son útiles para tratar carcinomas de mama, de próstata, de colon y de pulmón.

La invención también abarca métodos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias tales como vasculitis, artritis, septicemia, choque séptico, choque endotóxico, síndrome del choque tóxico, síndrome de dificultad respiratoria adquirida, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, peritonitis, nefritis, dermatitis atópica, asma, conjuntivitis, fiebre, paludismo o psoriasis en un sujeto, incluyendo un ser humano, que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-MIF o una parte de unión a antígeno del mismo.

En otras realizaciones, la composición que comprende dicho anticuerpo anti-MIF de la invención se usa para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria seleccionada del grupo que consiste en glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria del intestino, nefritis y peritonitis.

El tratamiento también puede implicar la administración de uno o más anticuerpos anti-MIF de la invención, o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, solos o con un portador farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables son agua, solución salina, solución salina tamponada con

fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil de almacenamiento o eficacia del anticuerpo.

El anticuerpo anti-MIF de la invención y las composiciones farmacéuticas que lo comprenden pueden administrarse en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos, de diagnóstico o profilácticos. Los agentes terapéuticos adicionales incluyen otros agentes antineoplásicos, antitumorales, antiangiogénicos, quimioterápicos o esteroides, dependiendo de la enfermedad que va a tratarse.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden estar en una variedad de formas, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como disoluciones líquidas (por ejemplo, disoluciones inyectables y para infusión), dispersiones o suspensiones, comprimidos, pastillas, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende de la aplicación terapéutica y el modo de administración previstos. Composiciones preferidas típicas están en forma de disoluciones inyectables o para infusión, tales como composiciones similares a las usadas para la inmunización pasiva de seres humanos. El modo de administración preferido es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, el anticuerpo se administra mediante infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea. Tal como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados.

El anticuerpo anti-MIF puede administrarse una vez, pero más preferiblemente se administra múltiples veces. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse desde tres veces al día hasta una vez cada seis meses o más. La administración puede realizarse en un programa tal como de tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses y una vez cada seis meses.

La invención también abarca el uso de un anticuerpo anti-MIF o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inmunológicas tales como enfermedades inflamatorias y trastornos hiperproliferativos.

La invención abarca además un anticuerpo anti-MIF o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para su uso en el tratamiento de enfermedades inmunológicas tales como enfermedades inflamatorias y trastornos hiperproliferativos.

La invención también abarca un anticuerpo anti-MIF o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para su uso en métodos de diagnóstico. En una realización, el anticuerpo anti-MIF o parte de unión a antígeno del mismo puede usarse para detectar MIF humano en una muestra biológica.

Los anticuerpos anti-MIF o las partes de unión a antígeno de los mismos también pueden usarse para determinar el nivel de MIF en superficie celular en un tejido o en células derivadas a partir del tejido. En algunas realizaciones, el tejido es tejido enfermo. Entonces puede usarse el tejido en un inmunoensayo para determinar, por ejemplo, niveles de MIF total, niveles de MIF en superficie celular o ubicación de MIF.

La invención se refiere además a kits que comprenden un anticuerpo anti-MIF o una parte de unión a antígeno de la invención o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o una parte de este tipo. Un kit puede incluir, además del anticuerpo o la composición farmacéutica, agentes de diagnóstico o terapéuticos. Un kit también puede incluir instrucciones para su uso en un método de diagnóstico o terapéutico.

La invención se refiere además a un procedimiento para la identificación de anticuerpos anti-MIF que pueden inhibir la función biológica de MIF humano e inducir un efecto beneficioso en un modelo animal llevando a cabo las siguientes etapas:

- a) seleccionar un anticuerpo que se une a MIF activo y no se une a MIF no activo,
- b) someter a prueba dicho anticuerpo en ensayos *in vitro*, tales como ensayo de anulación de glucocorticoides (GCO) o ensayos de proliferación celular,
- c) seleccionar un anticuerpo que inhibe GCO y/o la proliferación celular.

Los resultados han mostrado que un anticuerpo anti-MIF que sólo se une a MIF activo y no se une a MIF no activo e inhibe además GCO y/o la proliferación celular induce un efecto beneficioso en un modelo animal (por ejemplo, el ejemplo 6).

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, sin ninguna limitación a los

mismos.

Parte experimental

5 Ejemplo 1: Selección de anticuerpo

Se usa tecnología de presentación en fagos para generar fragmentos de anticuerpo anti-MIF humano. A partir de una biblioteca de presentación en fagos, se realizan diferentes campañas de examen, tres de ellas usando MIF de longitud completa (MIF humano recubierto/MIF humano en disolución/MIF humano-murino alternante). Las otras usando seis péptidos derivados de MIF alternantes con MIF de longitud completa. Estos seis péptidos se diseñan dividiendo la proteína MIF en seis péptidos de aproximadamente 30 aminoácidos con tramos solapantes de aproximadamente 15 aminoácidos. Tras varias rondas de selección, se identifican agentes de unión únicos, se expresan todos los agentes de unión únicos y se purifican como anticuerpos frente a IgG4 humana. Se someten a prueba estos anticuerpos en varios ensayos para demostrar la inhibición *in vitro* de MIF. Se lleva a cabo un mapeo de epitopos para determinar la región de unión dentro de la proteína MIF. Se someten a prueba 193 anticuerpos y se clasifican según su actividad *in vitro* de inhibición de MIF. A continuación se describen ensayos *in vitro*. Se usan tres anticuerpos anti-MIF murino como control (III.D.9, XIV.14.3 y XIV.15.5).

20 Ejemplo 2: Inhibición de actividad de anulación de glucocorticoides de MIF (GCO).

Este método se basa en la inhibición de MIF endógeno, es decir, MIF que se produce por la línea celular usada. Este método se aplica para la selección de anticuerpo y para la determinación de curvas de dosis-respuesta.

25 Ensayo de GCO para selección de anticuerpos:

Se centrifuga un cultivo en suspensión de THP1 y se resuspenden las células en medio completo nuevo a una densidad celular de 10^6 células por ml. Se transfiere este cultivo a pocillos de una microplaca de 96 pocillos (90 μ l/pocillo) y se añade anticuerpo anti-MIF para dar una concentración final de 75 μ g/ml. Se somete a prueba cada anticuerpo por triplicado. Tras incubación durante la noche a 37°C se añade dexametasona para dar una concentración de 2 nM y tras una incubación de una hora a 37°C se añade LPS (concentración final de 3 ng/ml). Tras una incubación de seis horas adicionales a 37°C se recoge el sobrenadante y se determinan las concentraciones de IL-6 en un ELISA (kit Cytoset, disponible comercialmente). Se calcula el promedio de los resultados de las pruebas por triplicado y se determina el porcentaje de secreción de IL-6 en comparación con los anticuerpos control. Se evalúan como positivos los anticuerpos que dan como resultado una secreción de IL-6 de menos del 75%.

40 Ensayo para la determinación de valores de CI_{50}

Se lleva a cabo el procedimiento experimental tal como se describe para el ensayo de selección con la excepción de que se usan cantidades crecientes de anticuerpo (normalmente desde 1-125 nM). Se expresa la curva de dosis-respuesta resultante como el % de inhibición en comparación con un anticuerpo control negativo. Se usa esta curva para el cálculo del efecto inhibitor máximo del anticuerpo (% de inhib. máx.) y la concentración de anticuerpo que muestra el 50% del efecto inhibitor máximo (CI_{50}).

45 En la figura 8, columna 3 (CI_{50}) y columna 4 (inhibición máxima), se resumen los resultados. Para comparación, el anticuerpo murino XIV.14.3 sólo muestra el 36% de inhibición de GCO (datos no mostrados).

Ejemplo 3: Inhibición de la proliferación celular

50 El suero estimula la secreción de MIF en células NIH/3T3 quiescentes y MIF a su vez estimula la proliferación celular. Por tanto, anticuerpos que inhiben este MIF endógeno disminuyen la proliferación de células NIH/3T3 quiescentes. Se determina la reducción de la proliferación mediante la incorporación de 3H -timidina.

55 Se incuban 1000 células NIH/3T3 por pocillo en una placa de 96 pocillos a lo largo del fin de semana a 37°C en medio que contiene el 10% de suero. Entonces se privan las células de nutrientes durante la noche a 37°C mediante incubación en medio que contiene el 0,5% de suero. Se retira el medio al 0,5% y se reemplaza por medio nuevo que contiene el 10% de suero, anticuerpo 75 μ g/ml y 5 μ Ci/ml de 3H -timidina. Tras 16 horas incubación en un incubador de CO_2 a 37°C se lavan las células dos veces con 150 μ l de PBS fría por pocillo. Usando una pipeta de múltiples canales se añaden 150 μ l de una disolución de TCA al 5% (p/v) por pocillo y se incuban durante 30 minutos a 4°C. Se lavan las placas con 150 μ l de PBS. A cada pocillo se le añaden 75 μ l de una disolución de NaOH 0,5 M con SDS al 0,5%, se mezclan y se almacenan a temperatura ambiente. Se miden las muestras en un contador β mezclando 5 ml de Ultima Gold (Packard) y 75 μ l de disolución de muestra. Se realiza cada determinación por triplicado y se comparan los valores con los valores del anticuerpo control mediante una prueba de la t. Se evalúan como positivos los anticuerpos que reducen significativamente la proliferación ($P < 0,05$). En la figura 8, columna 5, se resumen los resultados.

65

Ejemplo 4: Estudios de unión: Determinación de epítomos de anticuerpos anti-MIF

Se diluye cada péptido en tampón de acoplamiento para dar una concentración de péptido de normalmente 5 µg/ml, se añade a microplacas (NUNC Immobilizer™ Amino Plate F96 Clear) y se incuban durante la noche a 4°C (100 µl/pocillo). Se usan MIF de longitud completa recombinante y PBS como controles. Se lava la placa 3 veces con 200 µl de PBST y se añaden anticuerpos (4 µg/ml en PBS) (100 µl/pocillo) y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Se lava la placa 3 veces con 200 µl de PBST y se añade anticuerpo de detección (por ejemplo, anti-IgG humana específico de Fc/marcado con HRP, Sigma) (100 µl/pocillo). Tras una incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave, se lava la placa 3 veces con 200 µl de PBST. Se incuban cada pocillo con 100 µl de disolución de TMB (T-0440, Sigma) durante 30 minutos en la oscuridad. Se detiene la reacción de tinción añadiendo 100 µl de disolución de H₂SO₄ 1,8 M por pocillo. Se miden las muestras a 450 nm.

Ejemplo 5: Competencia de anticuerpos anti-MIF humano con anticuerpo anti-MIF murino III.D.9

Se usa el anticuerpo Bax94 para la competencia con anticuerpos anti-MIF de ratón III.D.9. Se recubren placas de 96 pocillos (NUNC Maxisorp) con MIF humano recombinante. Se diluyen el anticuerpo anti-MIF murino II.D.9 y los anticuerpos anti-MIF humano en TBST/BSA al 2% y se mezclan, mientras que se mantiene la concentración final de III.D.9 a 2 µg/ml y se aumenta la concentración de anticuerpos anti-MIF humano desde 0 µg/ml hasta normalmente 32 µg/ml. Tras el lavado de la microplaca, se aplican los anticuerpos y se incuban a temperatura ambiente durante normalmente 2 horas. Tras el lavado, se incuban la placa con conjugado de anticuerpo anti-IgG de ratón (espec. de Fc) con peroxidasa y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el lavado, se incuban la placa con disolución de TMB y se detiene la reacción de tinción añadiendo disolución de H₂SO₄. El ajuste de la curva de competencia resultante permite el cálculo de la inhibición máxima de la unión a III.D.9. En la figura 8, columna 6, se resumen los resultados.

Ejemplo 6: Supervivencia aumentada de anticuerpos anti-MIF en el modelo en animal vivo de peritonitis por *E. coli*

Se llevan a cabo los experimentos según Calandra *et al.* (Nature Immunology, 2000) usando ratones NMRI hembra (25-30 g, 6-10 semanas de edad) a los que se les inyecta por vía intraperitoneal 6000 UFC de una suspensión de *E. coli* 0111:B4 en mucina al 15% y hemoglobina al 4%. Se inoculan dos o tres colonias (*E. coli* 0111:B04) a partir de un cultivo en placa de agar de nutrientes en 10 ml de TSB y se incuban durante la noche a 36°C con agitación. Se diluye el cultivo en solución salina fisiológica hasta la(s) concentración/concentraciones requerida(s), durante la noche el cultivo alcanza normalmente 2*10⁹ UFC/ml, y se mezcla con mucina y hemoglobina (1 volumen de inóculo diluido, 2 volúmenes de mucina al 15%, 2 volúmenes de hemoglobina al 4%). Puesto que la mezcla de inóculo tiende a sedimentarse, se mezcla entre inyecciones. Se usa una aguja grande (por ejemplo, de calibre 23) para las inyecciones para evitar el bloqueo de la aguja por material particulado en la mezcla de inyección. Se administran por vía intraperitoneal anticuerpo Bax94 (IgG4) y un anticuerpo control de isotipo correspondiente 2 horas antes de la exposición bacteriana. La dosificación de anticuerpo es normalmente de 800 µg/ratón y se usan 20 ratones para cada grupo. Pudo mostrarse un efecto estadísticamente significativo sobre la supervivencia/tiempo hasta la muerte para los isotipos IgG1 e IgG4 de anticuerpos anti-MIF humano. La figura 6 muestra los resultados obtenidos para el anticuerpo Bax94 y el anticuerpo Bax152 (IgG4). Se usan datos estadísticos de Kaplan-Meier para la evaluación de las curvas de supervivencia.

Ejemplo 7: Especificidad de unión para MIF activo

Los anticuerpos anti-MIF descritos en esta invención pueden distinguir entre MIF activo y no activo, que se generan mediante oxidación o reducción leve, respectivamente. Se valora la distinción entre estos conformeros mediante ELISA o resonancia de plasmón superficial.

ELISA para la valoración de la unión diferencial de los anticuerpos:

- Transformación de MIF en su conformación activa mediante oxidación leve.

Se incuban MIF humano recombinante (0,5 mg/ml en PBS) durante 3 h a 37°C con un exceso de 3 veces (volumen) de una disolución saturada de L-cistina en PBS (L-cistina ~ 0,4-0,5 mM). Entonces se dializa el MIF dos veces frente a PBS en un casete de diálisis Slide-A-Lyzer® con un punto de corte de peso molecular de 7 kDa (Pierce).

- Transformación de MIF en su conformación no activa.

Se reduce MIF a una concentración de 0,5 mg/ml mediante incubación durante la noche con ditiotreitol 8-16 mM (concentración final) a 4°C.

- Protocolo de ELISA.

Se recubren los anticuerpos anti-MIF en microplacas de 96 pocillos (NUNC Maxisorp™) a una concentración de 5 µg/ml (dilución en tampón de recubrimiento). Tras el lavado de la placa con TBST (solución salina tamponada con Tris con Tween-20 al 0,1% (v/v)) y el bloqueo con TBST/BSA al 2% (TBST y albúmina sérica bovina al 2% (p/v)), se añaden series de diluciones de MIF o bien activo o bien no activo y se incuban a temperatura ambiente durante 1-2 h. Se detecta MIF unido usando un anticuerpo anti-MIF de conejo policlonal y un anticuerpo de cabra anti-conejo marcado con peroxidasa del rábano (Biorad). Se usa TBST/BSA al 2% para diluir MIF, el anticuerpo anti-MIF de conejo y el conjugado de peroxidasa para reducir la unión no específica. La figura 7 muestra los resultados de ELISA obtenidos con el anticuerpo Bax94.

Valoración de la unión diferencial de los anticuerpos por Biacore.

Se examina la cinética de unión de MIF activo y no activo al anticuerpo Bax94 mediante análisis de resonancia de plasmón superficial usando un sistema Biacore 3000. Por tanto, se inmovilizan 10000 unidades de respuesta de Bax94 en un chip sensor con una matriz de CM5 (= dextrano carboximetilado) y se incuban con MIF activo o no activo, MIFhu en tampones redox de glutatión prorreductores y prooxidantes, que oscilan entre GSH 4,8 mM/GSSG 0,2 mM (GSSG = glutatión oxidado) y GSSG 5 mM en tampón HBS-EP (GE Healthcare). Como control, se usa MIF para el análisis de unión en una segunda célula de flujo que contiene un anticuerpo control de isotipo inmovilizado. Se extraen las unidades de respuesta de unión de anticuerpo control y anticuerpo Bax94 para la evaluación.

Ejemplo 8: Detección de MIF activo en la superficie de células THP-1

Se incuban células con el anticuerpo anti-MIF Bax94. Se lavan las células con PBS helada y se resuspenden en tampón de lisis celular frío (Cell Signaling Technology®). Se bloquean perlas magnéticas de proteína G Dynabeads® (Invitrogen) con TBST + leche en polvo desnatada al 5% (p/v), se lavan y se añaden a las células lisadas. Se lleva a cabo inmunoprecipitación a 4°C durante la noche. Entonces se lavan las perlas con tampón de lisis celular y TBST y se someten a ebullición en tampón de muestra de SDS-PAGE (sin agentes reductores). Se someten las muestras a SDS-PAGE no reductora para el análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

Ejemplo 9: Unión de anticuerpos anti-MIF a MIF unido a membrana

Se lavan células THP-1 con PBS helada y se resuspenden en tampón de tinción celular frío (Biolegend) complementado con IgG de ratón 200 µg/ml. Se añaden anticuerpos anti-MIF marcados con FITC o TRITC para dar una concentración final de normalmente 200-500 nM y se realiza la incubación a 4°C. Se lavan posteriormente las células con tampón de tinción celular helado y se resuspenden en tampón de tinción celular complementado con la disolución de viabilidad celular Via-Probe™ (BD Biosciences). Se miden las células en un sistema de citometría de flujo FACS Canto™ II (BD Biosciences) y se compara la mediana del desplazamiento de FITC/TRITC de las poblaciones celulares viables con el anticuerpo control de isotipo marcado con colorante.

Ejemplo 10: Determinación de la afinidad de fragmentos Fab de anticuerpos anti-MIF mediante Biacore

Normalmente, se inmovilizan 40 unidades UR de MIF recombinante humano en un chip sensor con una matriz de CM5 (= dextrano carboximetilado) (Biacore). Se inyectan fragmentos Fab a un intervalo de concentración de normalmente 6-100 nM diluidos en HBS-EP. Tras cada ciclo, se regenera el chip con NaOH 50 mM + NaCl 1 M. Se calculan las afinidades según el modelo de Langmuir 1:1. En la figura 8, columna 7, se resumen los resultados.

Ejemplo 11: Efecto beneficioso de anticuerpos anti-MIF en un modelo animal de glomerulonefritis semilunar

Se someten a prueba los anticuerpos anti-MIF en un modelo de rata de glomerulonefritis semilunar descrito por Frederick W. K. Tam *et al.* (Nephrol Dial Transplant, 1999, 1658-1666). Se induce nefritis nefrotóxica en ratas Wistar Kyoto macho mediante una inyección intravenosa individual de suero de membrana basal glomerular anti-rata. En la configuración preventiva del experimento, se comienza el tratamiento con anticuerpos anti-MIF y un anticuerpo control de isotipo correspondiente en el momento de la inducción de nefritis (día 0) mediante inyección intraperitoneal del anticuerpo. Normalmente se repite el tratamiento cada dos días y se sacrifican los animales en el día 7 para análisis histológicos. Se recoge orina antes del experimento (nivel inicial) y antes de la terminación del experimento (día 7). En una configuración terapéutica, se comienza el tratamiento con anticuerpo anti-MIF 4 días tras la inducción de la enfermedad y se repite cada dos días. Normalmente se sacrifican las ratas en el día 8. Se recoge orina antes del experimento (nivel inicial), antes del comienzo del tratamiento (día 4) y antes del sacrificio de los animales (día 8). La dosificación de anticuerpo es normalmente de 1-20 mg/kg por inyección y se usan de 6 a 8 ratas para cada grupo. Se determina la gravedad de la enfermedad midiendo proteinuria, infiltración de macrófagos en el glomérulo y daño histológico (formación semilunar). En un experimento preventivo, el tratamiento con anticuerpo anti-MIF Bax69 (10 mg/kg por dosis) durante 7 días da como resultado una reducción de proteinuria del 47% en comparación con animales tratados con anticuerpo control. El tratamiento de una enfermedad establecida (experimento terapéutico) da como resultado una reducción de proteinuria dependiente de la dosis del 16%

(10 mg/kg de Bax69 por dosis) y del 34% (20 mg/kg de Bax69 por dosis) en comparación con animales tratados con anticuerpo control.

5 Ejemplo 12: Efecto beneficioso de anticuerpos anti-MIF en un modelo animal para colitis ulcerosa (transferencia adoptiva de células T vírgenes en ratones Rag-/-)

10 Se sacrificaron ratones C57BL/6 y se aíslan células CD45RBhi (células T vírgenes) mediante clasificación FACS de la población de células de bazo. Se inyectan i.p. células CD45RBhi (5×10^5) en ratones C57BL/6 Rag-/- (de 7-9 semanas de edad), que desarrollan colitis ulcerosa tras aproximadamente 2 semanas (de Jong *et al.*, Nature immunology, 2001, 1061-1066). Se inyectan por vía intraperitoneal anticuerpos anti-MIF y el anticuerpo control de isotipo dos veces a la semana (1 mg/ratón/dosis). En una configuración preventiva, se comienza el tratamiento en el momento de la inyección de células T. En una configuración terapéutica, se comienza el tratamiento 4 semanas tras la inducción de la enfermedad. Se monitorizan los ratones semanalmente para determinar el peso y el desarrollo de la enfermedad. Normalmente ocho semanas tras la transferencia de células CD45RBhi a receptores C57BL/6 Rag-/-, se calcula el índice de actividad de enfermedad (DAI) y se recogen secciones del colon para determinar la puntuación del índice de histología (HI). Se determinan el índice de actividad de la enfermedad (DAI) y el índice de histología (HI) al final del modelo animal (DAI se basa en cuatro parámetros: encorvamiento y debilitamiento (puntuado con 0 ó 1), engrosamiento del colon (0-3) y consistencia de las deposiciones (0-3)). En un experimento terapéutico, se usan anticuerpos anti-MIF Bax69 y BaxA10 para el tratamiento de una enfermedad establecida y se reduce significativamente el DAI medio en aproximadamente el 60% (Bax69) y aproximadamente el 40% (BaxA10) en comparación con ratones tratados con control de isotipo. Además, se reduce la puntuación de HI medio en aproximadamente el 33% tras el tratamiento con Bax69.

25 Ejemplo 13: Efecto beneficioso de anticuerpos anti-MIF en un modelo animal para colitis ulcerosa (modelo anti-CD40 agonista)

Este modelo se basa en la activación de macrófagos y células dendríticas mediante un anticuerpo anti-CD40 agonista, que induce una patología intestinal que se parece a EII en ratones Rag1-/-.

30 Se adquieren ratones Rag1-/- de edad/sexo coincidentes (de 4-5 semanas) de Jackson Laboratories y se mantienen durante dos semanas antes del experimento en la instalación para animales. Se disuelven el anticuerpo monoclonal frente a CD40 agonista (FGK45, IgG2a) o IgG2a de rata control de isotipo en PBS a 1 mg/ml. A cinco grupos (cada grupo de 10 ratones) se les inyectan i.p. 200 μ g de anticuerpo monoclonal anti-CD40 agonista y de esos grupos se tratan cuatro con anticuerpos anti-MIF en el día 0 y el día 1 (2 x 1 mg/ratón). Al sexto grupo (10 ratones) sólo se le inyecta control de isotipo (IgG2a de rata, control sano). Se pesan los ratones durante los siguientes 7 días. En el día 7, se calculó el índice de actividad de enfermedad (DAI) y se recogieron secciones del colon para determinar la puntuación del índice de histología (HI). La puntuación de DAI se basa en: encorvamiento (0-1); debilitamiento (0-1), consistencia de las deposiciones (0-3) y engrosamiento del colon (0-3). La puntuación de histología se basó en grosor (0-3), elongación de criptas, inflamación (0-3) y absceso (0-1). El tratamiento con anticuerpos anti-MIF Bax94, BaxA10 y Bax69 reduce significativamente la puntuación de DAI (BaxA10: reducción del ~48%; Bax94: reducción del ~62%; Bax69: reducción del ~73%) en comparación con ratones tratados con control de isotipo. Además, también se reducen las puntuaciones de HI medio mediante estos anticuerpos.

45 Ejemplo 14: Inhibición de crecimiento tumoral en ratones desnudos Mf1 por anticuerpos anti-MIF

50 Se recogen células de adenocarcinoma de próstata humanas (PC-3) a partir de cultivos en crecimiento exponencial y se mezclan con Matrigel con factor de crecimiento agotado. Se inoculan por vía subcutánea 2×10^6 células en 0,25 ml de Matrigel en el costado derecho de ratones desnudos Mf1. Se comienza el tratamiento con anticuerpo anti-MIF Bax94 y el control de isotipo C3 un día tras la inoculación (0,6 mg de anticuerpo/ratón/día) y se repite cada dos días. Normalmente se comienza la medición de los tamaños de los tumores dos semanas tras la inyección de células y se realiza cada dos días. Se calculan los volúmenes usando la fórmula $V = 0,5 \cdot a \cdot b^2$ (en la que "a" es el diámetro más largo y "b" es el diámetro más corto). Se reduce significativamente el crecimiento tumoral de ratones tratados con Bax94 y el volumen medio de los tumores analizados 28 días tras la inducción tumoral es 4,3 veces superior dentro del grupo tratado con control de isotipo en comparación con el grupo tratado con Bax94.

55 En una configuración terapéutica del experimento se comenzó el tratamiento con anticuerpos una semana tras el injerto tumoral. Se inyectan por vía intraperitoneal 50 mg/kg por dosis del anticuerpo control de isotipo C3 y el anticuerpo anti-MIF Bax69 cada dos días. Tras 22 días de tratamiento, se determinó que la mediana del volumen tumoral era 2,7 veces superior dentro del grupo tratado con C3 en comparación con el grupo tratado con Bax69.

60 Ejemplo 15: Efectos proapoptóticos de anticuerpos anti-MIF

65 Se muestran efectos proapoptóticos del anticuerpo anti-MIF Bax94 en un ensayo de caspasa-3 basado en células usando la línea celular de cáncer de próstata humana PC-3. Se siembran células PC-3 en placas de cultivo de 10 cm ($\sim 10^6$ células/placa) en presencia de FCS al 10%. Tras 24 h se añade medio nuevo que contiene anticuerpo Bax94 100 nM o anticuerpo control C3 100 nM. Tras otro periodo de incubación de 48 h, se preparan lisados

celulares y se mide la actividad de caspasa-3 añadiendo un sustrato de caspasa marcado fluorescente. (Figura 9).

Ejemplo 16: Inhibición de la invasión de células tumorales

- 5 Se someten a prueba anticuerpos anti-MIF Bax94 y Bax69 en ensayos de invasión Transwell™, usando la línea celular de cáncer de próstata humana PC-3.

10 Se siembran 5×10^4 células PC-3 por pocillo en placas Transwell™ de 24 pocillos (tamaño de poro de $8 \mu\text{m}$), que se recubren con poli-D-lisina en la cara del fondo de la membrana de policarbonato y con Matrigel con factor de crecimiento agotado en la superficie del inserto Transwell™. Se permite que las células se unan durante 4 h en presencia de FCS al 10%. Después, se cambió el medio a medio libre de suero y se privan las células de nutrientes durante la noche (es decir, durante 16 h). Posteriormente, se añaden compuestos (MIF 10 nM, anticuerpos 500 nM) a la cámara inferior. Se permite que las células migren a través de la membrana porosa durante 24 h. Tras este periodo de incubación, se tiñen con disolución Giemsa células migradas unidas de la cara inferior de la membrana.

15 Se cuenta el número de células que se adhieren a la cara inferior de la membrana en campos visuales independientes a un aumento de 400 veces (figura 10).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la región que se abarca los aa 50-68 o la región que abarca los aa 86-102 de MIF humano, e inhibe la función biológica de MIF humano.
- 10 2. Anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno presenta al menos una de las siguientes propiedades:
- 15 a) inhibe la actividad de anulación de glucocorticoides (GCO),
 b) inhibe la proliferación de células cancerosas o fibroblastos,
 c) se une a MIF activo,
 d) no se une a MIF no activo.
- 20 3. Anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o dicha parte de unión a antígeno se une a MIF activo.
- 25 4. Anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo Bax69, en el que se define que el anticuerpo Bax69 tiene una secuencia de ácido nucleico en V_L de SEQ ID NO: 14 y una secuencia de ácido nucleico en V_H de SEQ ID NO: 20, anticuerpo Bax94, en el que se define que el anticuerpo Bax94 tiene una secuencia de ácido nucleico en V_L de SEQ ID NO: 16 y una secuencia de ácido nucleico en V_H de SEQ ID NO: 22, anticuerpo Bax152, en el que se define que el anticuerpo Bax152 tiene una secuencia de ácido nucleico en V_L de SEQ ID NO: 17 y una secuencia de ácido nucleico en V_H de SEQ ID NO: 23, y anticuerpo BaxA10, en el que se define que el anticuerpo BaxA10 tiene una secuencia de ácido nucleico en V_L de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de ácido nucleico en V_H de SEQ ID NO: 24.
- 30 5. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG4, y en el que dicha IgG4 tiene una única mutación, mediante lo cual la subsecuencia CPSC en la región Fc de IgG4 se vuelve CPPC.
- 35 6. Anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno comprende:
- 40 a) una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de cadena pesada seleccionadas independientemente de la cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpo Bax69, anticuerpo Bax94, anticuerpo Bax152 y anticuerpo BaxA10, todos tal como se definieron anteriormente,
- 45 b) una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de cadena ligera seleccionadas independientemente de la cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpo Bax69, anticuerpo Bax94, anticuerpo Bax152 y anticuerpo BaxA10, todos tal como se definieron anteriormente, o en el que el anticuerpo comprende:
- 50 c) una secuencia de V_H que es idéntica en al menos el 90% a la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo Bax69, el anticuerpo Bax94, el anticuerpo Bax152 y el anticuerpo BaxA10, todos tal como se definieron anteriormente,
- 55 d) una secuencia de V_L que es idéntica en al menos el 90% a la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del anticuerpo Bax69, el anticuerpo Bax94, el anticuerpo Bax152 y el anticuerpo BaxA10 todos tal como se definieron anteriormente.
- 60 7. Anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inmunológica, en el que dicha enfermedad inmunológica es una enfermedad inflamatoria, o un trastorno hiperproliferativo.
- 65 8. Anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno según la reivindicación 7, en el que dicha enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en vasculitis, artritis, septicemia, choque séptico, choque endotóxico, síndrome del choque tóxico, síndrome de dificultad respiratoria adquirida, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, peritonitis, nefritis y psoriasis.
9. Composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo monoclonal o la parte de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un portador farmacéuticamente aceptable.

10. Línea celular aislada que produce el anticuerpo monoclonal o la parte de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 5 11. Molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el anticuerpo monoclonal o la parte de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
12. Vector que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 11, en el que el vector comprende una secuencia de control de la expresión unida operativamente a dicha molécula de ácido nucleico.
- 10 13. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 12, o la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 11.
- 15 14. Método de producción de un anticuerpo monoclonal o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 13 o la línea celular según la reivindicación 10 en condiciones adecuadas y recuperar dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo.
- 20 15. Procedimiento para la identificación de anticuerpos anti-MIF que pueden inhibir la función biológica de MIF humano e inducir un efecto beneficioso en un modelo animal llevando a cabo las siguientes etapas:
- 25 a) seleccionar un anticuerpo que se une a MIF activo y no se une a MIF no activo,
- b) someter a prueba dicho anticuerpo en ensayos *in vitro*,
- c) seleccionar un anticuerpo que inhibe GCO y/o la proliferación celular.

Figura 1

Nombre / SEQ ID No.	V _L -FR1	V _L -CDR1	V _L -FR2	V _L -CDR2	V _L -FR3	V _L -CDR3	V _L -FR4
Bax8 / SEQ ID No. 1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	RASQSISSYLN	WYQQRPGKAPKLLIY	AASLQSQ	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQSYSTPWT	FGGTKVEIK
Bax69 / SEQ ID No. 2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	RSSQRIMTYLN	WYQQRPGKAPKLLIF	VASHSQS	GVPSRFRGSGSETDFTLTISGLQPEDSATYYC	QQSFTWPLT	FGGTKVEIK
Bax74 / SEQ ID No. 3	DIQMTQSPSSLPASVGDRTITC	RASQSIQTYLS	WYQHRPGNAEKLLIY	ANSRLQS	GVPSRFSGGGSTRFTLAISSLQPDDFATYFC	QQTYSTPLT	FGGTKVDIK
Bax94 / SEQ ID No. 4	DIQMTQSPGTLSPGERATLSC	RASQGVSSSLA	WYQQRPGQAPRLLIY	GNSSRAT	GIPDRFSGSASCTDFTLTISRLQPEDFAVYYC	QQYGRSLT	FGGTKVEIK
Bax152 / SEQ ID No. 5	DIQMTQSPVTLSPGERATLSC	RASQSVRSYLA	WYQQRPGQTPRLLIY	GNSNRAT	GIPDRFSGSGGTDFTLTISRLPEDEFAVYYC	QQYGNLSLT	FGGTKVEIK
BaxA10 / SEQ ID No. 6	DIQMTQSPGTLSPGERATLSC	RASQGVSSSLA	WYQQRPGQAPRLLIY	GNSSRAT	GIPDRFSGSASCTDFTLTISRLQPEDFAVYYC	QQYGRSLT	FGGTKVEIK

Figura 2

Nombre / SEQ ID No.	V _H -FR1	V _H -CDR1	V _H -FR2	V _H -CDR2	V _H -FR3	V _H -CDR3	V _H -FR4
Bax8 / SEQ ID No. 7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	IYTHD WVRQAPGKGLEWVS	IYSPGGNTSIADSVKVG	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAS	RQYVLRIFDMSADAFDI	WGQGT	MTVTVSS
Bax69 / SEQ ID No. 8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	IYSIN WVRQAPGKGLEWVS	SISSGGFTTYADSVKVG	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAG	SQWLXGMDY	WGQGT	MTVTVSS
Bax74 / SEQ ID No. 9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	KYYMI WVRQAPGKGLEWVS	WIGPSGGFTFYADSVKVG	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	GTPDYGGNSLDH	WGQGT	MTVTVSS
Bax94 / SEQ ID No. 10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	IYAMD WVRQAPGKGLEWVS	GIVPSGGFTKYADSVKVG	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	VNVIAVAGTGYYYGMDV	WGQGT	MTVTVSS
Bax152 / SEQ ID No. 11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	IYAMD WVRQAPGKGLEWVS	GIVPSGGFTKYADSVKVG	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	VNVIAVAGTGYYYGMDV	WGQGT	MTVTVSS
BaxA10 / SEQ ID No. 12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	WYAMD WVRQAPGKGLEWVS	GIVPSGGRTKYADSVKVG	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	VNVIAVAGTGYTYGMDV	WGQGT	MTVTVSS

Figura 3

Bax8: SEQ ID No. 13

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
 1 GAC ATC CAG ATG ACC ACC CAG TCT TCC TCC TCC TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC
 I T C R A S Q S I S Y L N W Y Q Q K P
 61 ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA
 G K A P K L L I Y A A S L Q S G V P S
 121 GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA
 R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
 181 AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT
 E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P W T F G Q
 241 GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGT CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCT TGG ACG TTC GGC CAA
 G T K V E I K
 301 GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

Bax69: SEQ ID No. 14

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
 1 GAC ATC CAG ATG ACC ACC CAG TCT CCA TCC TCC TCC TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC
 I T C R S S Q S I M T Y L N W Y Q Q K P
 61 ATC ACT TGC CGG TCA AGT CAG AGA ATT ATG ACT TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAA AAA CCG
 G K A P K L L I F V A S H S Q S G V P S
 121 GGG AAA GCC CCT AAA CTC CTG ATC TTT GTT GCA TCC CAT TCA CAA AGT GGG GTC CCA TCC
 R F R G S G S E T D F T L T I S G L Q P
 181 AGG TTC AGA GGC AGT GGC TCT GAG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC GGT CTG CAA CCT
 E D S A T Y Y C Q Q S F W T P L T F G G
 241 GAA GAT TCT GCA ACT TAC TAC TGT CAA CAA AGT TTT TGG ACC CCC CTC ACT TTC GGC GGA
 G T K V E I K
 301 GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

Bax74: SEQ ID No. 15

1 GAC ATC CAG ATG ACC ATG ACC TCT CCA TCC TCC CTG CCT GCA TCT GTC GGA GAC AGA GTC ACC
 I T C R A S Q S I G T Y L S W Y Q H K P
 61 ATC ACT TGT CGG GCA AGT CAG AGC ATT GGT ACT TAT TTG AGT TGG TAT CAA CAC AAA CCG
 G N A P K L L I Y A T S R L Q S G V P S
 121 GGA AAT GCC CCC AAA CTC CTG ATC TAT GCT ACA TCT CGT TTG CAA AGT GGC GTC CCA TCG
 R F S G G S G T R F T L A I S L Q P
 181 AGG TTC AGT GGC GGT GGA TCT GGG ACA CGA TTC ACT CTC GCC ATC AGC AGT CTG CAA CCC
 D D F A T Y F C Q Q T Y S T P L T F G G
 241 GAC GAT TTT GCA ACT TAC TTC TGT CAG CAG ACT TAC AGT ACC CCG CTC ACT TTC GGC GGA
 G T K V D I K
 301 GGG ACC AAG GTG GAC ATC AAA

Bax94: SEQ ID No. 16

1 GAC ATC CAG ATG ACC ATG ACC TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC
 L S C R A S Q S Q G V S S S L A W Y Q K
 61 CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG GGT GTT AGC AGC AGC TCC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA
 P G Q A P R L L I Y G T S S R A T G I P
 121 CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC ATC TAT GGT ACA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA
 D R F S G S A S G T T G G G A C G A C T T L T I S R L Q
 181 GAC AGG TTC AGT GGC AGT GCG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG CAG
 P E D F A V Y Y C Q Q Y G R S L T F G G
 241 CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGG TCA CTC ACT TTC GGC GGA
 G T K V E I K
 301 GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

Bax152: SEQ ID No. 17

1 D I Q M T Q S P V T L S L S L S P G E R A T
 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GTC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC
 L S C R A S Q S V R S S Y L A W Y Q Q K
 61 CTC TCT TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT CGG AGT TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA
 P G Q T P R L L I Y G A S N R A T G I P
 121 CCC GGC CAG ACT CCC AGG CTC ATC TAT GGT GCC TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA
 D R F S G S G T D F T L T I S R L E
 181 GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGC ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG
 P E D F A V Y C Q Q Y G N S L T F G G
 241 CCT GAA GAT TTT GCA GTC TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AAC TCA CTC ACT TTC GGC GGA
 G T K V E I K
 301 GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

BaxA10: SEQ ID No. 18

1 D I Q M T Q S P G T L S L S L S P G E R A T
 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC
 L S C R A S Q S V S S S L A W Y Q Q K
 61 CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG GGT GTT AGC AGC TCC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA
 P G Q A P R L L I Y G T S S R A T G I P
 121 CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC ATC TAT GGT ACA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA
 D R F S G S A S G T D F T L T I S R L Q
 181 GAC AGG TTC AGT GGC AGT GCG TCT GGC ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG CAG
 P E D F A V Y Y C Q Q Y G R S L T F G G
 241 CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGG TCA CTC ACT TTC GGC GGA
 G T K V E I K
 301 GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

Figura 4

Bax8: SEQ ID No. 19
 E V Q L L L E S G G L V Q P G G S L R L
 1 GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT GGT TCT TTA CGT CTT
 S C A A S G F T F S I Y T M D W V R Q A
 61 TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT ATT TAC ACT ATG GAT TGG GTT CGC CAA GCT
 P G K G L E W V S Y I S P S G G N T S Y
 121 CCT GGT AAA GGT TTG GAG TGG GTT TCT TAT ATC TCT CCT TCT GGT GGC AAT ACT TCT TAT
 A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
 181 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT AAG AAT ACT CTC TAC
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A S R Q
 241 TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGT AGA CAA
 Y V L R Y F D W S A D A F D I W G Q G T
 301 TAC GTA TTA CGA TAT TTT GAC TGG TCG GCA GAT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA
 M V T V S S
 361 ATG GTC ACC GTC TCA AGC

Bax69: SEQ ID No. 20
 E V Q L L L E S G G L V Q P G G S L R L
 1 GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT GGT TCT TTA CGT CTT
 S C A A S G F T F S I Y S M N W V R Q A
 61 TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT ATT TAC TCT ATG AAT TGG GTT CGC CAA GCT
 P G K G L E W V S S I G S S G G T T Y Y
 121 CCT GGT AAA GGT TTG GAG TGG GTT TCT TCT ATC GGT GGT GGC ACT ACT TAT TAT
 A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
 181 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT AAG AAT ACT CTC TAC
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A G S Q
 241 TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG GGC TCA CAG
 W L Y G M D V W G Q G T T V T V S S
 301 TGG CTG TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGC ACC GTC TCA AGC

Bax74: SEQ ID No. 21

E V Q L L E L L E S G G G L V Q P G G S L R L
 1 GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT GGT TCT TTA CGT CTT
 S C A A S G F T F S K Y Y M I W V R Q A
 61 TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT AAG TAC TAT ATG ATT TGG GTT CGC CAA GCT
 P G K G L E W V S W I G P S G G F T F Y
 121 CCT GGT AAA GGT TTG GAG TGG GTT TCT TGG ATC GGT CCT TCT GGT GGC TTT ACT TTT TAT
 A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
 181 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT AAG AAT ACT CTC TAC
 L Q M N S L R A E D T A V Y C A R G T
 241 TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG ACG
 P D Y G G N S L D H W G Q G T L V T V S
 301 CCC GAC TAC GGT GGT AAC TCC CTT GAC CAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCA
 S
 361 AGC

Bax94: SEQ ID No. 22

E V Q L L E L L E S G G G L V Q P G G S L R L
 1 GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT GGT TCT TTA CGT CTT
 S C A A S G F T F S I Y A M D W V R Q A
 61 TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT ATT TAC GCT ATG GAT TGG GTT CGC CAA GCT
 P G K G L E W V S G I V P S G G F T K Y
 121 CCT GGT AAA GGT TTG GAG TGG GTT TCT GGT ATC GTT CCT TCT GGT GGC TTT ACT AAG TAT
 A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
 181 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT AAG AAT ACT CTC TAC
 L Q M N S L R A E D T A V Y C A R V N
 241 TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GTG AAC
 V I A V A G T G Y Y Y G M D V W G Q G
 301 GTT ATA GCA GTG GCT GGT ACT GGA TAC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG
 T T V T V S S
 361 ACC ACG GTC ACC GTC TCA AGC

Bax152: SEQ ID No. 23

E V Q L L E S G G L V Q P G G S L R L
 1 GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT GGT TCT TTA CGT CTT
 S C A A S G F T F S I Y A M D W V R Q A
 61 TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT ATT TAC GCT ATG GAT TGG GTT CGC CAA GCT
 P G K G L E W V S G I V P S G G F T K Y
 121 CCT GGT AAA GGT TTG GAG TGG GTT TCT GGT ATC GTT CCT TCT GGT GGC TTT ACT AAG TAT
 A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
 181 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT AAG AAT ACT CTC TAC
 L Q M N S L R A E D T A V Y C A R V N
 241 TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GTG AAC
 V I A V A G T G Y Y Y G M D V W G Q G
 301 GTT ATA GCA GTG GCT GGT ACT GGA TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG
 T T V T V S S
 361 ACC ACG GTC ACC GTC TCA AGC

BaxA10: SEQ ID No. 24

E V Q L L E S G G L V Q P G G S L R L
 1 GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT GGT TCT TTA CGT CTT
 S C A A S G F T F S W Y A M D W V R Q A
 61 TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT TGG TAC GCT ATG GAT TGG GTT CGC CAA GCT
 P G K G L E W V S G I Y P S G G R T K Y
 121 CCT GGT AAA GGT TTG GAG TGG GTT TCT GGT ATC TAT CCT TCT GGT GGC CGT ACT AAG TAT
 A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
 181 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT AAG AAT ACT CTC TAC
 L Q M N S L R A E D T A V Y C A R V N
 241 TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GTG AAC
 V I A V A G T G Y Y Y G M D V W G Q G
 301 GTT ATA GCA GTG GCT GGT ACT GGA TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG
 T T V T V S S
 361 ACC ACG GTC ACC GTC TCA AGC

Figura 5

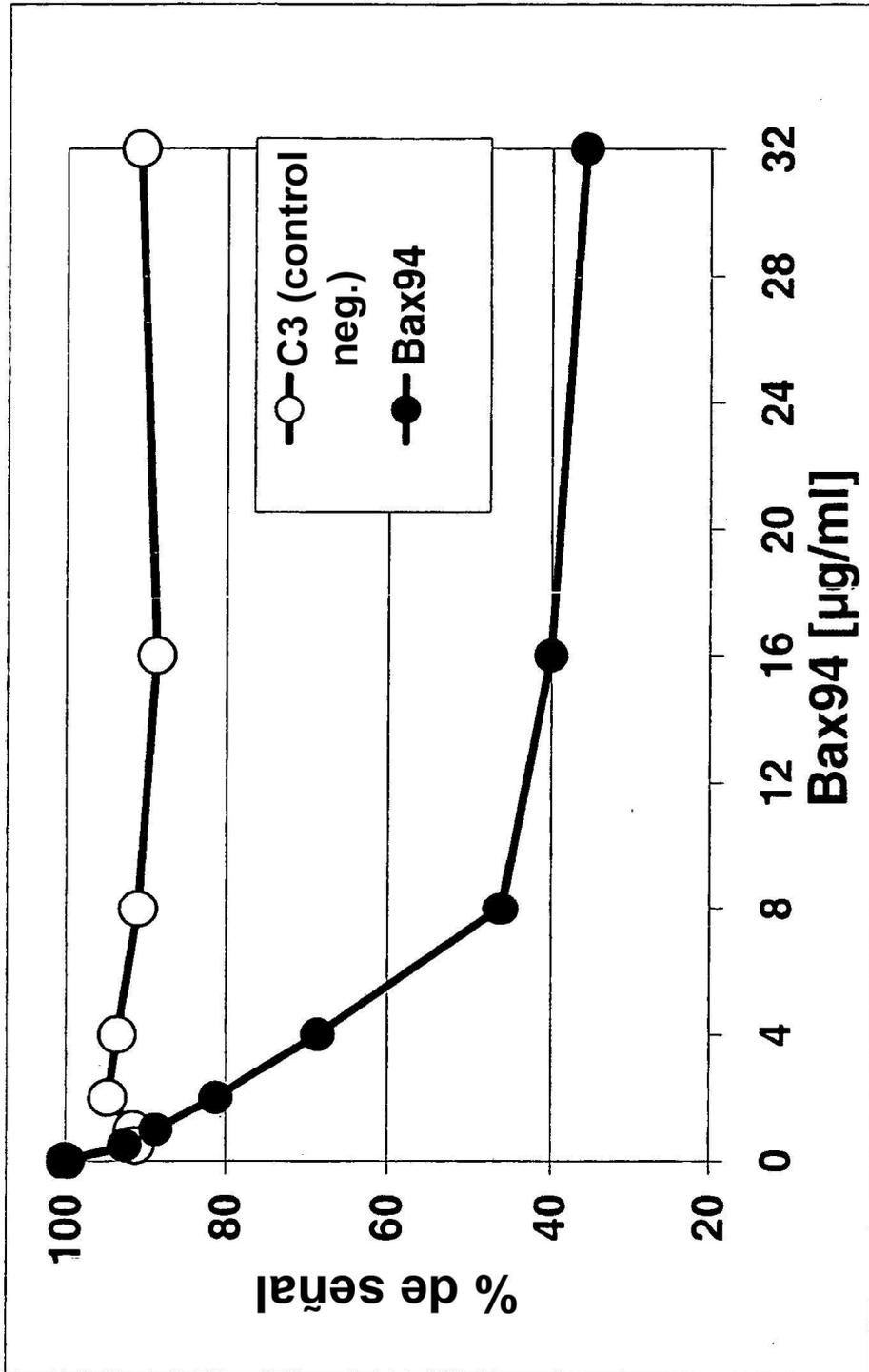


Figura 6

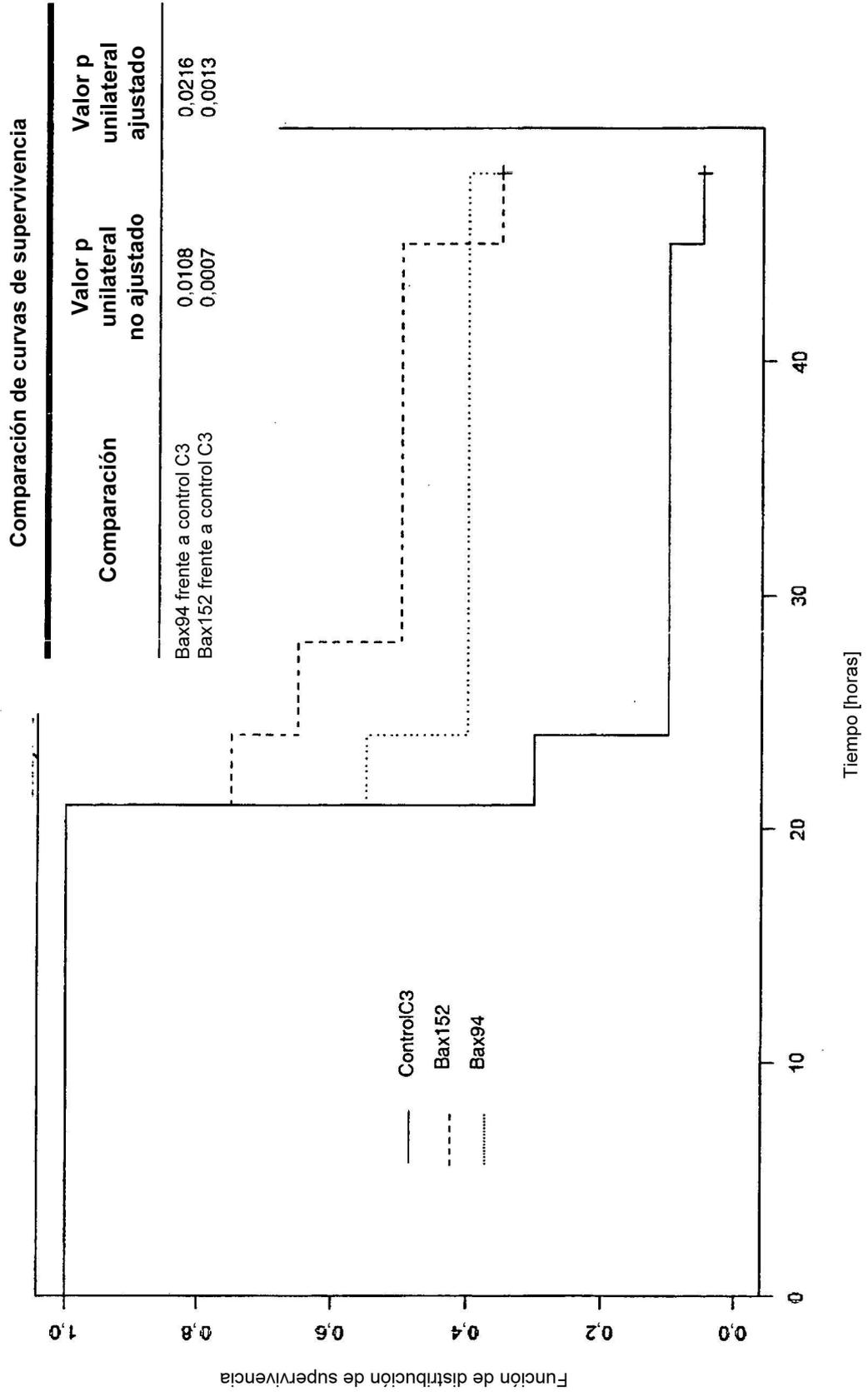


Figura 7

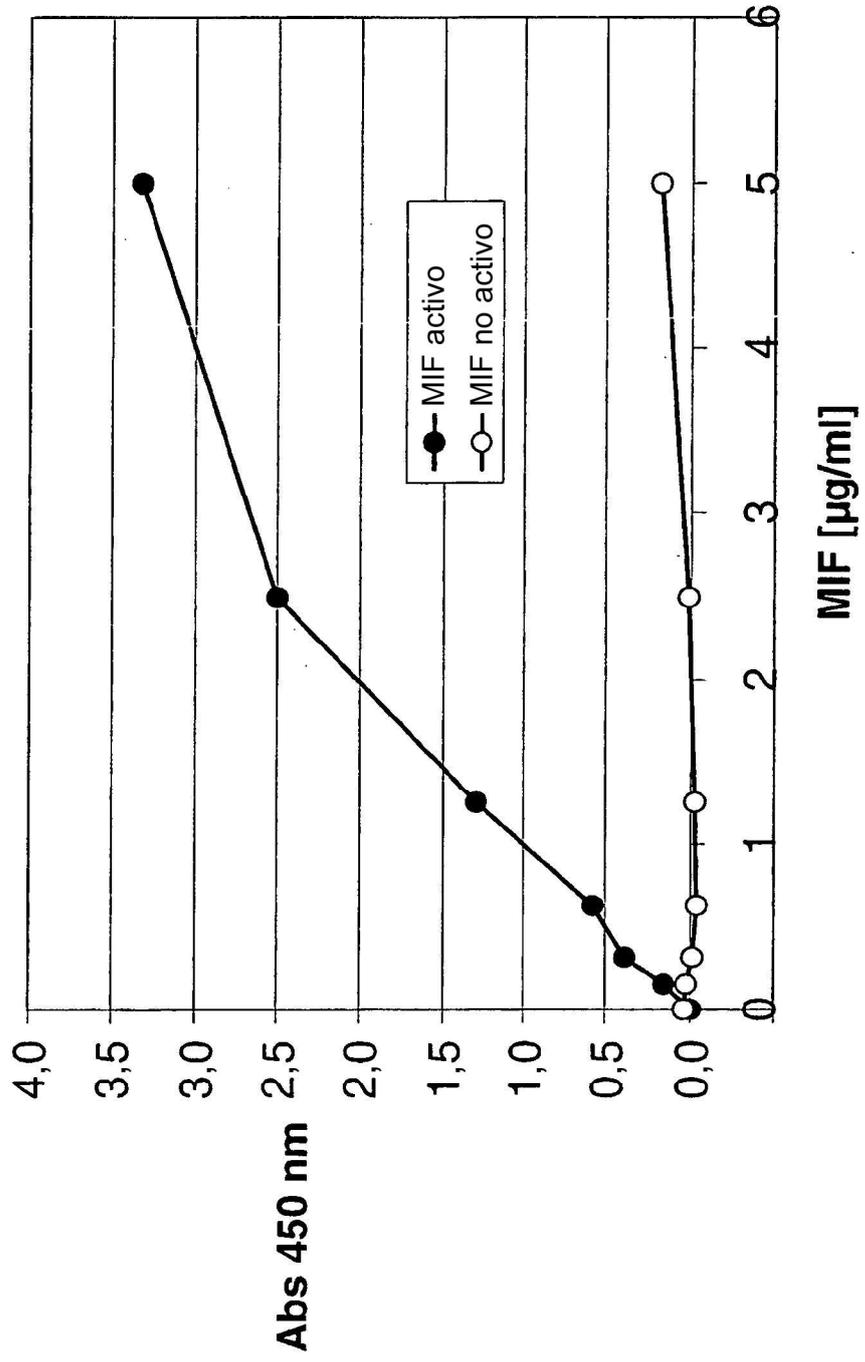


Figura 8

1	2	3	4	5	6	7
Anticuerpo	Epítipo	Cl ₅₀ (nM) de GCO	Inhib. máx. de GCO (%)	Ensayo de proliferación (% de P)	Competencia máx. con III.D.9	Afinidad (nM)
Bax8	Centro	5	93	0,037	12%	nd
Bax69	Centro	7	98	0,035	53%	55
Bax74	Extremo C-terminal	2	29	0,021	81%	93
Bax94	Extremo C-terminal	1	63	0,017	82%	4
Bax152	Extremo C-terminal	5	56	0,003	81%	16
BaxA10	Extremo C-terminal	nd	nd	nd	nd	0,4

Figura 9

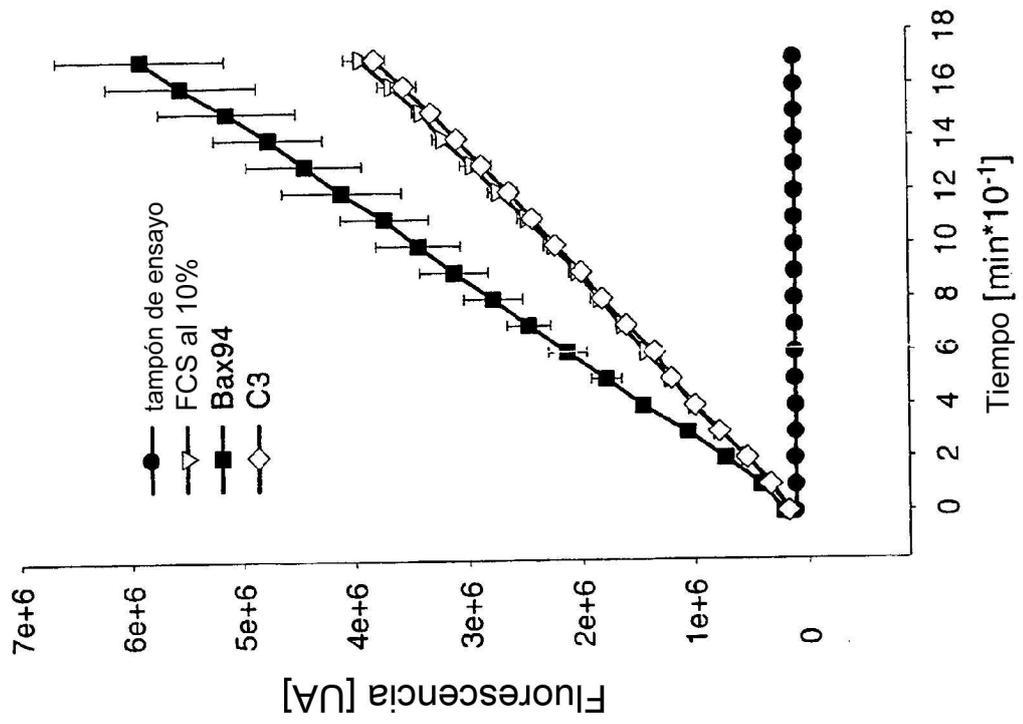


Figura 10

