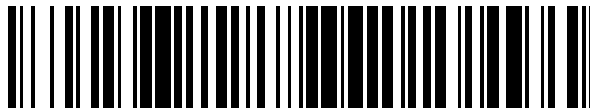


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 999**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2012 PCT/EP2012/063832**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13010955**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2012 E 12733779 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2731970**

54 Título: **Anticuerpos que tienen reactividad cruzada con el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y la D-dopacromo tautomerasa (D-DT)**

30 Prioridad:

15.07.2011 EP 11174199

15.07.2011 US 201161508091 P

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

08.05.2019

73 Titular/es:

MORPHOSYS AG (100.0%)

Semmelweisstrasse 7

82152 Planegg, DE

72 Inventor/es:

ZIEROW, SWEN y

KLATTIG, JÜRGEN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 711 999 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 que tienen reactividad cruzada con el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y la D-dopacromo tautomerasa (D-DT)

Campo de la invención

5 Esta descripción se refiere en general a anticuerpos o a fragmentos de los mismos que reaccionan de forma cruzada con el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y la D-dopacromo tautomerasa (D-DT). En particular, se refiere a anticuerpos o a fragmentos de los mismos que reaccionan de forma cruzada con MIF y D-DT e interfieren en la transducción de señales mediada por MIF y/o mediada por D-DT. La descripción se refiere además a una terapéutica que comprende anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con MIF y D-DT y a métodos de tratamiento
10 que emplean compuestos que comparten la capacidad de interactuar con MIF y D-DT.

Antecedentes de la invención

El factor inhibidor de la migración de macrófagos humano (MIF, también conocido como GIF, GLIF, factor inhibidor de la glicosilación, L-dopacromo isomerasa o L-dopacromo tautomerasa) se describe en David, J. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 56: 72-77 y Bloom, B. R & Bennett, B. (1966) Science 153, 80-82 y fue identificado como un regulador central de las respuestas de inmunidad innata e inflamatorias (Calandra, T. (2003) Nature Reviews Immunology Vol. 03; 791-800).
15

El gen *MIF* se localiza en el cromosoma 22 del genoma humano y codifica una proteína no glicosilada de 115 aminoácidos de longitud de 12,5 kDa que forma un homotrímero (Sun, H.W., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 5191-5196).

20 MIF se expresa constitutivamente en prácticamente todos los tipos de células. Durante una inflamación, los macrófagos, los linfocitos T y la glándula pituitaria son las fuentes predominantes de MIF (Bernhagen, J. (1993) Nature 365:756-759; Calandra, T. (1994) J. Exp. Med. 179:1895-1902). El MIF secretado interactúa con sus receptores CD74, CXCR2 y CXCR4 que se expresan por ejemplo, sobre los macrófagos y los linfocitos T e induce la liberación de citocinas proinflamatorias (por ejemplo, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN γ , IL-2), la invasión celular y la migración celular (Leng L. (2003) J. Exp. Med. 197:1467-1476; Bernhagen, J. (2007) Nature Medicine 13: 587-596).
25

Se identificó que MIF como mediador proinflamatorio, participa y se sobreexpresa en varias enfermedades inflamatorias y también se observaron polimorfismos de MIF que se correlacionan con la gravedad de enfermedades autoinflamatorias (Hoi, A. J. (2007) Inflammation & Allergy - Drug Targets, 6: 183-190; Baugh, J.A. (2002) Genes Immun. 3: 170-176).

30 Además, otros estudios describen que MIF regula negativamente la apoptosis mediada por p53 y la detención del ciclo celular y con ello se proporciona un vínculo entre MIF, el crecimiento celular y la tumorigénesis (Calandra, T. (2003) Nature Reviews Immunology 03; 791-800; Hudson, J.D. (1999) J. Exp. Med. 190:1375-1382).

Tras la identificación de MIF como una pieza clave, no solo en la patogénesis de una variedad de enfermedades inflamatorias mediadas de forma inmune, sino también en el cáncer y otras indicaciones, MIF se convirtió en una diana terapéutica prometedora para ser antagonizada con compuestos como por ejemplo, moléculas pequeñas o anticuerpos monoclonales.
35

Los anticuerpos específicos de MIF se describen, por ejemplo, en los documentos WO1994/026307 (The Picower Institute For Medical Research), documento de EE.UU. nº de serie 08/471,705; WO1998/017314 (The Picower Institute For Medical Research), WO2001/038566 (Fraunhofer-Gesellschaft Zur Förderung Der Angewandten Forschung E.V.), documento de EE.UU. nº de serie 12/234.407; WO2002/036774 (Fraunhofer-Gesellschaft Zur Förderung Der Angewandten Forschung E.V.), WO2009/086920 (Baxter International Inc., Baxter Healthcare S.A., Dyax Corporation), documento de EE.UU. nº de serie 12/346.309 y 12/767.635; WO2009/117710 (Carolus Therapeutics Inc.), WO2009/117706 (Carolus Therapeutics Inc.), documento de EE.UU. nº de serie 12/918.968; WO2005/020919 (Cytokine Pharmasciences, Inc.), WO2005/094329 (Cytokine Pharmasciences, Inc.), documento de EE.UU. nº de serie 10/927.494; WO2005/094338A2 (North Shore-Long Island Jewish Research Institute), documento de EE.UU. nº de serie 10/594.641, todos ellos se incorporan como referencia en su totalidad.
40
45

En particular, basándose en el descubrimiento de que MIF es enzimáticamente activo como una tautomerasa y convierte D-dopacromo en ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico, se identificó un homólogo de MIF que comparte la actividad tautomerasa que produce un producto similar pero no idéntico, 5,6-dihidroxiindol. El homólogo de MIF, que se denomina D-dopacromo tautomerasa (D-DT), muestra una baja homología de secuencia del 47% con MIF (FIGURA 1). En 2008 se mostró que D-DT y MIF comparten funcionalidades específicas y promueven tanto la expresión como la secreción de factores de crecimiento angiogénicos, por ejemplo, CXCL8 y VEGF, a partir de células de adenocarcinoma de pulmón (Coleman, A. M. (2008) J. of Immunology 118(4):2330-2337).
50

Por consiguiente, se requieren terapias que interfieran con la señalización mediada por MIF y D-DT.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o a un fragmento de anticuerpo del mismo, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo se une con reacción cruzada a MIF, en donde MIF es un polipéptido codificado por el aminoácido de SEQ ID NO.: 49, y a D-DT, en donde D-DT es un polipéptido codificado por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.: 50.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o a un fragmento de anticuerpo del mismo, que comprende

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1; una CDR2 de SEQ ID NO: 2; una CDR3 de SEQ ID NO: 3; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4; una CDR2 de SEQ ID NO: 5; y una CDR3 de SEQ ID NO: 6;

(b) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 17; una CDR2 de SEQ ID NO: 18; una CDR3 de SEQ ID NO: 19; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 20; una CDR2 de SEQ ID NO: 21; y una CDR3 de SEQ ID NO: 22; o

(c) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 33; una CDR2 de SEQ ID NO: 34; una CDR3 de SEQ ID NO: 35; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 36; una CDR2 de SEQ ID NO: 37; y una CDR3 de SEQ ID NO: 38.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o a un fragmento de anticuerpo que comprende

(a) una VH que comprende SEQ ID NO: 14 y una VL que comprende SEQ ID NO: 13;

(b) una VH que comprende SEQ ID NO: 30 y una VL que comprende SEQ ID NO: 29; o

(c) una VH que comprende SEQ ID NO: 46 y una VL que comprende SEQ ID NO: 45.

El solicitante describe por primera vez restos que se unen a antígeno que se unen específicamente a MIF y D-DT. Tales compuestos que interfieren con ambos, MIF y D-DT, son superiores en cuanto a eficacia y proporcionan un enfoque terapéutico prometedor. En comparación con una terapia de combinación, el empleo de un compuesto específico de MIF y un segundo compuesto específico de D-DT en restos que se unen a antígeno que reaccionan de forma cruzada paralela que se unen específicamente a MIF y a D-DT, posee varias ventajas. La administración de un solo agente terapéutico que interacciona con ambos, MIF y D-DT, permite una investigación mucho más sencilla y un control de propiedades farmacológicas, tales como la farmacocinética y la farmacodinámica, en comparación con la administración de dos compuestos juntos. Adicionalmente, los mecanismos de escape a través de una señalización mediada por MIF o D-DT que conducen a una reducción de la eficacia, se pueden disminuir de una manera significativa dirigiendo ambas moléculas en paralelo. Por tanto, los restos que se unen a antígeno dirigidos a MIF y D-DT proporcionan compuestos superiores para el desarrollo clínico acompañado de una alta necesidad médica.

Sorprendentemente y a pesar de la baja homología de secuencia entre ambos, MIF y D-DT, se identificaron anticuerpos con reacción cruzada y se caracterizaron con éxito. Además, la descripción proporciona restos que se unen a antígeno que tienen una reacción cruzada con MIF y D-DT y neutralizan o mejoran las vías de señalización mediadas por MIF y D-DT.

Los anticuerpos se identificaron con estrategias de selección utilizando una proteína de MIF recombinante y de D-DT recombinante. Basándose en un escrutinio con ELISA, se detectó la unión de anticuerpos específicos a ambos, MIF y D-DT. Los clones identificados se convirtieron en formato IgG y se expresaron en células eucariotas. Después de la purificación, una caracterización adicional de los anticuerpos seleccionados, una determinación de la CE₅₀ para MIF y D-DT, confirmó la reactividad cruzada con ambos. Además, se realizaron otros análisis funcionales para demostrar la actividad funcional de los anticuerpos seleccionados. Los anticuerpos que tenían reacción cruzada con MIF/D-DT se analizaron para determinar la capacidad de inhibir la unión de MIF a su receptor CD74. Además, se investigó la inhibición mediada por anticuerpos de la liberación dependiente de MIF de citocinas proinflamatorias, como por ejemplo, IL-1 β e IL-6. En consecuencia, se prevé una actividad y eficacia de los anticuerpos con reacción cruzada con MIF/D-DT en seres humanos.

Aunque se había sugerido un enfoque combinatorio que se dirige a MIF y D-DT (Coleman, A. M. (2008) J. of Immunology 118(4): 2330-2337), la identificación de un solo compuesto que reacciona de forma cruzada con ambas proteínas no se esperaba ya que D-DT y MIF comparten solo un 33% de identidad y un 47% de homología. Se escrutinaron grandes cantidades de clones hasta que se pudo identificar un anticuerpo con reacción cruzada con MIF/D-DT. Tomados en conjunto, de los 27000 clones analizados, más de 3000 clones mostraron especificidad hacia uno o ambos antígenos, mientras que solo 3 clones mostraron tener una reacción cruzada con MIF/D-DT en las etapas primarias y también secundarias del escrutinio. Usando los métodos descritos, el experto en la técnica apreciará cómo identificar restos que se unen a antígeno con reacción cruzada con MIF/D-DT.

Descripción de las Figuras

- FIGURA 1: Comparación de las secuencias de aminoácidos de MIF y D-DT de origen humano. D-DT humana y MIF humano comparten un 33% de identidad y un 47% de homología.
- 5 FIGURA 2: Unión específica de anticuerpos seleccionados con reactividad cruzada con MIF/D-DT, a MIF recombinante y a D-DT recombinante en ELISA. Se aplicaron anticuerpos utilizados en una concentración de 6,25 nM. Para todos los anticuerpos sometidos a ensayo, se demuestra una intensidad de la fluorescencia más de 5 veces superior a la de fondo en MIF y D-DT. (A=MOR014093; B=MOR014116; C=MOR014138)
- 10 FIGURA 3: Determinación de la concentración CE_{50} ([nM]) de los anticuerpos A y B para MIF y D-DT. (A=MOR014093; B=MOR014116)
- FIGURA 4: Determinación de la concentración CE_{50} ([nM]) del anticuerpo C para MIF y D-DT. (C=MOR014138)
- FIGURA 5: Inhibición mediada por anticuerpos de la interacción entre MIF y CD74. (A=MOR014093; B=MOR014116; C=MOR014138)
- 15 FIGURA 6: Inhibición mediada por anticuerpos de la liberación de IL-1 β e IL-6 a partir de monocitos humanos aislados estimulados con MIF y LPS. (A=MOR014093; B=MOR014116; C=MOR014138)

Descripción detallada de la descripción

- Por consiguiente, en un aspecto, la descripción se refiere a un resto que se une a antígeno, en donde el resto que se une a antígeno se une específicamente a MIF y a D-DT. En un aspecto preferido, el resto que se une a antígeno se une específicamente a MIF humano y a D-DT humana.
- 20 En un aspecto, la descripción se refiere a un resto aislado que se une a antígeno, en donde el resto que se une a antígeno se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT.
- En un aspecto preferido, el resto aislado que se une a antígeno se une con reactividad cruzada a MIF humano y a D-DT humana.
- 25 En otro aspecto, la descripción se refiere a un resto aislado que se une a antígeno, en donde el resto que se une a antígeno se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y en donde el resto que se une a antígeno es capaz de interferir específicamente en la transducción de señales mediada por MIF y mediada por D-DT. En una realización, el resto aislado que se une a antígeno es capaz de antagonizar específicamente la actividad de MIF y de D-DT.
- En otro aspecto, la descripción se refiere a un resto aislado que se une a antígeno, en donde el resto que se une a antígeno se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y en donde el resto aislado que se une a antígeno, se une a MIF y a D-DT con una concentración CE_{50} menor de 100 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM o 1 nM.
- 30 En otro aspecto, la descripción se refiere a un resto aislado que se une a antígeno, en donde el resto que se une a antígeno se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y en donde el resto aislado que se une a antígeno se une a MIF y a D-DT con una constante de disociación (K_D) menor de $1 \times 10^7 M^{-1}$, $10^8 M^{-1}$, $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, $10^{12} M^{-1}$ o $10^{13} M^{-1}$.
- 35 En un aspecto, el resto aislado que se une a antígeno reconoce un epítipo conformacional de MIF, en donde un epítipo conformacional similar está presente en D-DT y en donde dicho resto aislado que se une a antígeno reconoce ambos epítipos conformacionales.
- En un aspecto, la descripción se refiere a un resto que se une a antígeno en donde el resto que se une a antígeno es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En una realización, dicho anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. En una realización, dicho anticuerpo o un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado. En una realización, dicho anticuerpo o un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En una realización, dicho anticuerpo o un fragmento de anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada humana y una región constante de la cadena ligera humana. En una realización, dicho anticuerpo o un fragmento de anticuerpo es un isotipo de IgG. En otra realización, los anticuerpos pueden tener cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o derivado del mismo (por ejemplo IgG1f LALA). En una realización, los anticuerpos tienen el isotipo IgG1f LALA. En una realización, dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se selecciona a partir del grupo que consiste en Fab, F(ab2)', F(ab)2' y scFV. En una realización, el anticuerpo se selecciona a partir del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo sintético. En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo es un anticuerpo humano o humanizado.
- 40 En una realización, la descripción se refiere a un anticuerpo o a un fragmento del mismo, en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y comprende dos regiones idénticas que se
- 45
- 50

unen a antígeno. En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende dos regiones que se unen a antígeno, en donde cada una de dichas regiones que se unen a antígeno se une con reactividad cruzada a MIF y D-DT. En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) en donde cada cadena pesada y cada cadena ligera son idénticas.

- 5 En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y comprende dos regiones que se unen a antígeno, en donde cada una de dichas regiones que se unen a antígeno comprende seis CDRs y en donde la HCDR3 de ambas regiones que se unen a antígeno es idéntica. En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y comprende dos regiones que se unen a antígeno, en donde cada una de dichas regiones que se unen a antígeno comprende seis CDRs.
- 10 En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y comprende dos regiones que se unen a antígeno en donde cada una de dichas regiones que se unen a antígeno comprende el mismo conjunto de seis CDRs.

- 15 En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y comprende dos regiones que se unen a antígeno, en donde cada una de dichas regiones que se unen a antígeno comprende las mismas regiones variables de la cadena pesada (abreviada en este documento como VH) y de la cadena ligera (abreviada en este documento como VL). En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y comprende dos regiones que se unen a antígeno, en donde las dos regiones que se unen a antígeno comparten la misma HCDR1, la misma HCDR2, la misma HCDR3, la misma LCDR1 de, la misma LCDR2 y la misma LCDR3.

- 20 En una realización, dicho anticuerpo o un fragmento de anticuerpo se selecciona a partir del grupo que consiste en un fragmento Fab, F(ab2)', F(ab)2' y scFv.

En un aspecto, la descripción se refiere a un resto que se une a antígeno, en donde el resto que se une a antígeno es un armazón obtenido a partir de un anticuerpo.

En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo es un anticuerpo de cadena sencilla.

- 25 En un aspecto, la descripción se refiere a un resto aislado que se une a antígeno, en donde el resto que se une a antígeno, se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y en donde dicho resto que se une a antígeno se selecciona a partir del grupo que consiste en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, dia-cuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR, anticuerpos de camélido, anquirinas, anticuerpos de dominio, lipocalinas, agentes inmuno-farmacéuticos modulares pequeños, maxicuerpos, proteína A y afilinas.

- 30 En una realización de la descripción, el resto que se une a antígeno con reactividad cruzada en condiciones fisiológicas, o bien se une a MIF o a D-DT. En una realización de la descripción, el resto que se une a antígeno con reactividad cruzada en condiciones fisiológicas se une simultáneamente a MIF y a D-DT. En una realización de la descripción, el resto que se une a antígeno con reactividad cruzada en condiciones fisiológicas o bien se une a MIF o a D-DT o se une simultáneamente a MIF y a D-DT.

- 35 En un aspecto, la descripción se refiere a un resto aislado que se une a antígeno, en donde el resto que se une a antígeno se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y en donde dicho resto que se une a antígeno se une a MIF humano y a D-DT humana y adicionalmente a MIF de macaco cangrejero y a D-DT de macaco cangrejero. En un aspecto, la descripción se refiere a un resto aislado que se une a antígeno, en donde el resto que se une a antígeno, se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y en donde dicho resto que se une a antígeno se une a MIF humano y a D-DT humana y adicionalmente a MIF de macaco cangrejero o a D-DT de macaco cangrejero.
- 40

- En un aspecto, la descripción se refiere a un resto aislado que se une a antígeno, en donde el resto que se une a antígeno se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y en donde dicho resto que se une a antígeno se une a MIF humano y a D-DT humana y a MIF murino y a D-DT murina. En un aspecto, la descripción se refiere a un resto aislado que se une a antígeno, en donde el resto que se une a antígeno se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y en donde dicho resto que se une a antígeno se une a MIF humano y a D-DT humana y a MIF murino o a D-DT murina.
- 45

- En un aspecto, la descripción se refiere a un resto aislado que se une a antígeno, en donde el resto que se une a antígeno se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y en donde dicho resto que se une a antígeno se une a MIF humano y a D-DT humana y a MIF de rata y a D-DT de rata. En un aspecto, la descripción se refiere a un resto aislado que se une a antígeno, en donde el resto que se une a antígeno se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y en donde dicho resto que se une a antígeno se une a MIF humano y a D-DT humana y a MIF de rata o a D-DT de rata.
- 50

- En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo se une con reactividad cruzada a MIF de mamífero y a D-DT de mamífero. En una realización, MIF de mamífero y D-DT de mamífero proceden de especies que se seleccionan a partir de una lista que consiste en ser humano, múnido, rata, mono rhesus (*Macaca mulatta*) y macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*).
- 55

- 5 En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo se une con reactividad cruzada a MIF humano y D-DT humana. En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo se une con reactividad cruzada a MIF de ratón y a D-DT de ratón. En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo se une con reactividad cruzada a MIF de rata y a D-DT de rata. En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo se une con reactividad cruzada a MIF de mono rhesus (*Macaca mulatta*) y a D-DT de mono rhesus (*Macaca mulatta*). En una realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo se une con reactividad cruzada a MIF de macaco cangrejero y a D-DT de macaco cangrejero.
- 10 En un aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT que comprende 6 CDRs definidas por Kabat o Chothia de cualquiera de los anticuerpos en la Tabla 1.
- En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y que compite de forma cruzada con un anticuerpo descrito en la Tabla 1.
- 15 En cierta realización, el anticuerpo que compite de forma cruzada con un anticuerpo descrito en la Tabla 1, reduce la unión de uno de los anticuerpos descritos en la Tabla 1 con MIF o D-DT por lo menos en un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en una competencia cruzada basada en ELISA.
- En cierta realización, el anticuerpo que compite de forma cruzada con un anticuerpo descrito en la Tabla 1, reduce la unión de uno de los anticuerpos descritos en la Tabla 1 con MIF o D-DT por lo menos en un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en un ensayo de competencia cruzada basado en ELISA, de acuerdo con el Ejemplo 6, en comparación con el control positivo.
- 20 En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT e interacciona (por ejemplo, mediante la unión, la estabilización, la distribución espacial) con el mismo epítipo que un anticuerpo descrito en la Tabla 1.
- En cierta realización, el anticuerpo que se une al mismo epítipo en MIF y D-DT que los anticuerpos de la presente descripción, es un anticuerpo monoclonal humano. En cierta realización, el anticuerpo que se une al mismo epítipo lineal en MIF y D-DT que los anticuerpos de la presente descripción, es un anticuerpo monoclonal humano. En cierta realización, el anticuerpo que se une al mismo epítipo conformacional en MIF y D-DT que los anticuerpos de la presente descripción, es un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos monoclonales humanos se pueden preparar y aislar tal y como se describe en el presente documento.
- 25
- 30 En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que comprende una CDR3 de la cadena pesada seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 41.
- En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que comprende una VH que comprende SEQ ID NO: 14 y una VL que comprende SEQ ID NO: 13.
- 35 En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que comprende una VH que comprende SEQ ID NO: 30 y una VL que comprende SEQ ID NO: 29.
- En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que comprende una VH que comprende SEQ ID NO: 46 y una VL que comprende SEQ ID NO: 45.
- 40 En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1; una CDR2 de SEQ ID NO: 2; una CDR3 de SEQ ID NO: 3; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4; una CDR2 de SEQ ID NO: 5; y una CDR3 de SEQ ID NO: 6.
- 45 En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 17; una CDR2 de SEQ ID NO: 18; una CDR3 de SEQ ID NO: 19; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 20; una CDR2 de SEQ ID NO: 21; y una CDR3 de SEQ ID NO: 22.
- En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 33; una CDR2 de SEQ ID NO: 34; una CDR3 de SEQ ID NO: 35; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 36; una CDR2 de SEQ ID NO: 37; y una CDR3 de SEQ ID NO: 38.
- 50 En otro aspecto, la descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de la presente descripción y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- En otro aspecto, la descripción se refiere a un resto aislado que se une a antígeno, en donde el resto que se une a antígeno se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y en donde dichos restos aislados que se unen a antígeno se usan como un fármaco.

- 5 En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y que compite de forma cruzada con un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1; una CDR2 de SEQ ID NO: 2; una CDR3 de SEQ ID NO: 3; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4; una CDR2 de SEQ ID NO: 5; y una CDR3 de SEQ ID NO: 6.
- 10 En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y que compite de forma cruzada con un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 17; una CDR2 de SEQ ID NO: 18; una CDR3 de SEQ ID NO: 19; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 20; una CDR2 de SEQ ID NO: 21; y una CDR3 de SEQ ID NO: 22.
- 15 En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y que compite de forma cruzada con un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 33; una CDR2 de SEQ ID NO: 34; una CDR3 de SEQ ID NO: 35; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 36; una CDR2 de SEQ ID NO: 37; y una CDR3 de SEQ ID NO: 38.
- 20 En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y reduce la unión de un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1; una CDR2 de SEQ ID NO: 2; una CDR3 de SEQ ID NO: 3; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4; una CDR2 de SEQ ID NO: 5; y una CDR3 de SEQ ID NO: 6 por lo menos en un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en comparación con el control positivo en un ensayo de competencia cruzada basado en ELISA de acuerdo con el Ejemplo 6.
- 25 En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y reduce la unión de un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 17; una CDR2 de SEQ ID NO: 18; una CDR3 de SEQ ID NO: 19; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 20; una CDR2 de SEQ ID NO: 21; y una CDR3 de SEQ ID NO: 22 por lo menos en un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en comparación con el control positivo en un ensayo de competencia cruzada basado en ELISA de acuerdo con el Ejemplo 6.
- 30 En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT y reduce la unión de un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 33; una CDR2 de SEQ ID NO: 34; una CDR3 de SEQ ID NO: 35; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 36; una CDR2 de SEQ ID NO: 37; y una CDR3 de SEQ ID NO: 38 por lo menos en un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en comparación con el control positivo en un ensayo de competencia cruzada basado en ELISA de acuerdo con el Ejemplo 6.
- 35 En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT e interacciona (por ejemplo, mediante la unión, el impedimento estérico, la estabilización/desestabilización, la distribución espacial) con el mismo epítipo que un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1; una CDR2 de SEQ ID NO: 2; una CDR3 de SEQ ID NO: 3; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4; una CDR2 de SEQ ID NO: 5; y una CDR3 de SEQ ID NO: 6.
- 40 En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT e interacciona (por ejemplo, mediante la unión, el impedimento estérico, la estabilización/desestabilización, la distribución espacial) con el mismo epítipo que un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 17; una CDR2 de SEQ ID NO: 18; una CDR3 de SEQ ID NO: 19; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 20; una CDR2 de SEQ ID NO: 21; y una CDR3 de SEQ ID NO: 22.
- 45 En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT e interacciona (por ejemplo, mediante la unión, el impedimento estérico, la estabilización/desestabilización, la distribución espacial) con el mismo epítipo que un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 33; una CDR2 de SEQ ID NO: 34; una CDR3 de SEQ ID NO: 35; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 36; una CDR2 de SEQ ID NO: 37; y una CDR3 de SEQ ID NO: 38.
- 50 En otro aspecto, la descripción se refiere a un ácido nucleico en donde el ácido nucleico comprende una VH que comprende SEQ ID NO: 16 y una VL que comprende SEQ ID NO: 15.
- 55 En otro aspecto, la descripción se refiere a un ácido nucleico en donde el ácido nucleico comprende una VH que comprende SEQ ID NO: 32 y una VL que comprende SEQ ID NO: 31.
- En otro aspecto, la descripción se refiere a un ácido nucleico en donde el ácido nucleico comprende una VH que comprende SEQ ID NO: 48 y una VL que comprende SEQ ID NO: 47.

En otro aspecto, la descripción se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un resto aislado que se une a antígeno que se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT que tiene al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% de identidad de secuencia con los ácidos nucleicos seleccionados a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48.

5 En otro aspecto, la descripción se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico seleccionado a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48.

10 En otro aspecto, la descripción se refiere a una célula hospedadora aislada que comprende un vector, en donde dicho vector comprende un ácido nucleico seleccionado a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48 y en donde dicha célula hospedadora es capaz de expresar el polipéptido codificado por el vector.

15 En otro aspecto, la descripción se refiere a una célula hospedadora aislada que comprende un vector en donde dicho vector comprende un ácido nucleico seleccionado a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48 y en donde dicha célula hospedadora es capaz de expresar el polipéptido codificado por el vector y en donde dicha célula hospedadora es una célula de mamífero.

20 En otro aspecto, la descripción se refiere a una célula hospedadora aislada que comprende un vector en donde dicho vector comprende un ácido nucleico seleccionado a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48 y en donde dicha célula hospedadora es capaz de expresar el polipéptido codificado por el vector y en donde dicha célula hospedadora es una célula humana.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un kit que comprende un resto aislado que se une a antígeno que se une con reactividad cruzada a MIF y D-DT.

Definiciones

25 Con el fin de que la presente descripción se pueda entender más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Definiciones adicionales se exponen a lo largo de toda la descripción detallada.

El término "MIF" se refiere a MIF tal y como se define en el n° de registro: CAG30406.1 y está codificado por la secuencia de aminoácidos:

SEQ-ID: 49:

1 MPMFIVNTNV PRASVPDGF L SELTQQLAQA TGKPPQYIAV HVVPDQLMAF GGSSEPCALC
30 61 SLHSIGKIGG AQRNSYSKLL CGLLAERLRI SPDRVYINYY DMNAANVGWN NSTFA

El término "D-DT" se refiere a D-DT tal y como se define en el n° de registro NP_001346 y está codificado por la secuencia de aminoácidos:

SEQ-ID: 50:

1 MPFLELDTNL PANRVPAGLE KRLCAAAAASI LGKPADRVNV TVRPGLAMAL SGSTEPCAQL
61 SSISSIGVVGT AEDNRSHSAH FFEFLTKELA LGQDRILIRF FPLESWQICK IGTVMTFE

35 La expresión "transducción de señal" o "actividad de señalización" tal y como se utiliza en este documento, se refiere a una relación causal bioquímica, iniciada generalmente por una interacción proteína-proteína, tal como la unión de un factor de crecimiento a un receptor, lo que da lugar a la transmisión de una señal desde una porción de una célula a otra porción de una célula. La interacción de un ligando con un receptor respectivo conduce a la fosforilación de uno o varios residuos de tirosina, serina o treonina en una o varias proteínas en la serie de reacciones que causan la transducción de señales. Los procesos de transducción de señales incluyen normalmente eventos nucleares, que dan lugar a un cambio en la expresión génica. Por ejemplo, para MIF extracelular, la transmisión implica una interacción específica de MIF extracelular con receptores presentados en la superficie de poblaciones de células específicas. Los receptores para MIF extracelular son, por ejemplo, pero no limitados a los mismos, CD74, CD74/CD44 y receptores de quimiocinas tales como CXCR2 y CXCR4. De este modo la transducción de señales después de una interacción de MIF con un receptor respectivo, promueve la producción de factores angiogénicos tales como VEGF y CXCL8. En consecuencia, los receptores para D-DT extracelular después de su interacción con D-DT, inducen una transducción de señales que da como resultado, por ejemplo, pero no limitado a ello, la producción de factores angiogénicos, tales como VEGF y CXCL8.

50 El término "antagonista", tal y como se utiliza en este documento, se refiere a un resto que se une a antígeno que neutraliza la actividad biológica de un antígeno. El término "antagonizar" se utiliza en este contexto en consecuencia.

Por ejemplo, un antagonista interfiere con la transducción de una señal que está mediada por un antígeno. Ejemplos de ensayos para determinar una actividad antagonista se describen con más detalles en los ejemplos siguientes. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente descripción reducen, disminuyen o inhiben la interacción de MIF con CD74. En algunas realizaciones, los anticuerpos reducen, disminuyen o inhiben la liberación dependiente de MIF de citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-1 β , IL-6). En algunas realizaciones, las actividades de los anticuerpos se pueden medir mediante la unión a MIF y D-DT utilizando, por ejemplo, SET, ELISA, FACS o BIAcore.

El término "valencia" tal y como se utiliza en este documento, se refiere al número de posibles sitios de unión a una diana en un polipéptido. Cada sitio de unión a una diana se une específicamente a una molécula diana o un sitio específico en una molécula diana. Cuando un polipéptido comprende más de un sitio de unión a una diana, cada sitio de unión a una diana se puede unir específicamente a las mismas moléculas o a diferentes (por ejemplo, se puede unir a diferentes moléculas, por ejemplo, diferentes antígenos o diferentes epitopos en la misma molécula). Los términos "monovalente" y "bivalente" se utilizan en este contexto en consecuencia.

La expresión "resto que se une a antígeno", tal y como se utiliza en este documento, se refiere a un resto que comprende un polipéptido que confiere la capacidad de unirse específicamente a un antígeno dado (por ejemplo, MIF y D-DT). Por ejemplo, anticuerpos, derivados de anticuerpos, armazones similares a anticuerpos y armazones alternativos comprenden al menos un resto que se une a antígeno. Los restos que se unen a antígeno también se pueden incorporar en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetra-cuerpos, v-NAR y scFv biespecífico (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136). Otros ejemplos de moléculas que comprenden restos que se unen a antígeno se proporcionan en el presente documento a continuación e incluyen fibronectina (Adnexus, propiedad en su totalidad de Bristol-Myers Squibb, Waltham, MA), anticuerpos de camélido, anquirinas (Molecular Partners AG, Zúrich, Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd., Cambridge, MA y Ablynx nv, Zwijnaarde, Bélgica), lipocalinas (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), pequeños agentes inmuno-farmacéuticos modulares (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxicuerpos (Avidia, Inc., Mountain View, CA), proteína A (Affibody AG, Suecia) y afilinas (gamma-cristalina o ubi-cuitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania).

El término "anticuerpo" tal y como se utiliza en este documento, incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento o cadenas sencillas de los mismos. Un "anticuerpo" de origen natural es una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en este documento como VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada en este documento como VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDRs y cuatro FRs dispuestas desde el extremo amino terminal al carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos del hospedador o a factores, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. Los anticuerpos pueden tener cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), subclase o una versión modificada de la misma (por ejemplo IgG1f LALA).

Las expresiones "CDR1 de la región variable de la cadena pesada" y "H-CDR1" se utilizan indistintamente, como las expresiones "CDR2 de la región variable de la cadena pesada" y "H-CDR2", las expresiones "CDR3 de la región variable de la cadena pesada" y "H-CDR3", las expresiones "CDR1 de la región variable de la cadena ligera" y "L-CDR1"; las expresiones "CDR2 de la región variable de la cadena ligera" y "L-CDR2", las expresiones "CDR3 de la región variable de la cadena ligera" y "L-CDR3".

La unión del antígeno se puede realizar a través de "fragmentos" de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro de la expresión "fragmento de anticuerpo" de un anticuerpo, incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo de dominio único (dAb) (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y una región determinante de complementariedad aislada (CDR).

Un "fragmento de cadena sencilla (scFv)" es una cadena sencilla de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., (1988.) Science 242: 423-426; y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879-5883). Aunque los dos dominios VL y VH están codificados por genes distintos, se pueden unir usando métodos recombinantes, a través de un enlazador peptídico artificial que les permite que se formen como una cadena proteica sencilla. Tales anticuerpos de cadena sencilla incluyen uno o varios restos que se unen a antígeno. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica y los fragmentos se escrutan en busca de una utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

El término "epítopo" incluye cualquier región proteínica que es reconocida específicamente por una inmunoglobulina o un receptor de linfocitos T o que interacciona de otro modo con una molécula. Generalmente los epítomos son de agrupaciones con superficie químicamente activa de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de hidratos de carbono o azúcares y generalmente pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Como apreciará un experto en la técnica, prácticamente cualquier cosa a la que puede unirse específicamente un anticuerpo podría ser un epítopo. Un epítopo puede comprender aquellos residuos a los que se une el anticuerpo y puede ser "lineal" o "conformacional".

La expresión "epítopo lineal" se refiere a un epítopo en donde todos los puntos de interacción entre la proteína y la molécula con la que interacciona (tal como un anticuerpo) se producen linealmente a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína (continua).

La expresión "epítopo conformacional" se refiere a un epítopo en el que aminoácidos discontinuos a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína se juntan en conformaciones tridimensionales. En un epítopo conformacional, los puntos de interacción se producen a través de residuos de aminoácidos en la proteína que están separados entre sí.

La expresión "competencia cruzada" se refiere a restos que se unen a antígeno (tales como anticuerpos) que comparten la capacidad de unirse a una región específica de un antígeno. En la presente descripción, un resto que se une a antígeno que es "competitivo de forma cruzada" tiene la capacidad de interferir con la unión de otro resto que se une a antígeno a MIF y/o D-DT en un ensayo de unión competitiva convencional. Un anticuerpo de este tipo, de acuerdo con una teoría no limitante, se puede unir con el mismo epítopo o con uno relacionado o cercano (por ejemplo, uno estructuralmente similar o próximo espacialmente) sobre la proteína de MIF y D-DT, que el anticuerpo con el que compete. Se pueden realizar estudios de competencia cruzada para encontrar anticuerpos que se unen competitivamente con otro, por ejemplo, los anticuerpos compiten por la unión al antígeno. Por ejemplo, la presente descripción proporciona anticuerpos que compiten de forma cruzada (por ejemplo, mediante la unión, la estabilización, la distribución espacial) con los anticuerpos descritos en la Tabla 1. Un anticuerpo de ese tipo se puede unir, de acuerdo con una teoría no limitante, con el mismo epítopo o con uno relacionado o cercano (por ejemplo, uno estructuralmente similar o próximo espacialmente) sobre la proteína de MIF y D-DT, que el anticuerpo con el que compete. La capacidad o el grado con el que un anticuerpo u otro agente de unión es capaz de interferir en la unión de otro anticuerpo o molécula de unión a MIF o D-DT y, por lo tanto, si se puede decir que compete de forma cruzada de acuerdo con la invención, se puede determinar utilizando ensayos de unión por competencia convencionales. Una competencia cruzada está presente si el anticuerpo A reduce la unión del anticuerpo B en al menos un 60%, específicamente al menos un 70% y más específicamente al menos un 80% y viceversa, en comparación con el control positivo que carece de uno de dichos anticuerpos. Tal y como aprecia el experto en la técnica, la competencia se puede evaluar en diferentes configuraciones de ensayo. Un ensayo adecuado implica el uso de la tecnología Biacore (por ejemplo, usando el instrumento BIAcore 3000 (Biacore, Uppsala, Suecia)), que puede medir el grado de las interacciones utilizando tecnología de resonancia de plasmón superficial. Otro ensayo para medir la competencia cruzada utiliza un enfoque basado en ELISA (por ejemplo, el Ejemplo 6). Además un proceso de alto rendimiento para caracterizar epítomos (del inglés "binning") de anticuerpos que se basa en su competencia cruzada, se describe en el documento de Solicitud de Patente Internacional nº WO2003/48731. La competencia cruzada está presente si el anticuerpo que se está investigando reduce la unión de uno de los anticuerpos descritos en la Tabla 1 en un 60% o más, específicamente en un 70% o más y, más específicamente en un 80% o más, y si uno de los anticuerpos descritos en Tabla 1 reduce la unión de dicho anticuerpo a MIF o D-DT en un 60% o más, específicamente en un 70% o más, y más específicamente en un 80% o más.

La expresión "anticuerpo humano", tal y como se emplea en este documento, se entiende que incluye anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones estructurales como las CDRs se obtienen a partir de secuencias de origen humano. Tal y como se emplea en este documento, un anticuerpo humano comprende regiones variables pesadas o ligeras, o cadenas pesadas y ligeras de longitud completa. En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 60%, 70%, 80%, 90% o al menos 95% o incluso al menos 96%, 97%, 98% o 99% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. De este modo, dicho anticuerpo humano se puede obtener a partir de plataformas tecnológicas que comprenden anticuerpos obtenidos a partir de genes de la línea germinal humana, ya sea generados mediante amplificación por PCR del repertorio de VH/VL aislado a partir de linfocitos B o generados de forma sintética. Las plataformas tecnológicas incluyen enfoques basados en genotecas que comprenden genes de inmunoglobulinas humanas que se presentan en fagos, ribosomas o levaduras. Las tecnologías de presentación respectivas son estándar en la comunidad científica. Además, la inmunización de un ratón transgénico que es portador de un repertorio de inmunoglobulinas humanas es otro enfoque para generar anticuerpos humanos contra un antígeno de interés. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos seleccionados a partir de un banco de anticuerpos basándose en el concepto HuCAL[®] de MorphoSys (Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86) son considerados como totalmente humanos.

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal y como se emplea en este documento, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular sencilla. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra un único sitio de unión que tiene una especificidad de unión única y afinidad hacia epítomos particulares.

Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo que conserva la reactividad de un anticuerpo no humano, a la vez que es menos inmunogénico en seres humanos. Esto se puede lograr, por ejemplo, conservando las regiones CDRs no humanas y sustituyendo las partes restantes del anticuerpo con sus homólogas humanas (es decir, la región constante así como las porciones estructurales de la región variable). Véase, por ejemplo, Morrison et al (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855; Morrison y Oi (1988) Adv. Immunol., 44:65-92; Verhoeyen et al. (1988) Science, 239:1534-1536; Padlan, Molec (1991) Immun., 28:489-498; y Padlan, Molec (1994) Immun., 31:169-2177. Otros ejemplos de la tecnología de modificación genética humana incluyen, pero no se limitan a la tecnología Xoma descrita en el documento US 5.766.886.

La expresión "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que se altera, se reemplaza o se intercambia (a) la región constante o una porción de la misma, de forma que el sitio que se une a antígeno (región variable) está ligado a una región constante de una clase, una función efectora y/o una especie diferente o alterada, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, una toxina, una hormona, un factor de crecimiento, un fármaco, etc.; o se altera, se reemplaza o se intercambia (b) la región variable o una porción de la misma, con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada. Por ejemplo, un anticuerpo de ratón se puede modificar mediante la sustitución de su región constante por la región constante de una inmunoglobulina humana. Debido a la sustitución con una región constante humana, el anticuerpo quimérico puede conservar su especificidad al reconocer el antígeno aunque tenga una antigenicidad reducida en humanos, en comparación con el anticuerpo de ratón original.

El término "aislado" se refiere a un compuesto que puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o un resto que se une a antígeno que está sustancialmente exento de otros anticuerpos o restos que se unen a antígeno, que tiene diferentes especificidades antigénicas. Por otra parte, un resto aislado que se une a antígeno de un anticuerpo puede estar sustancialmente exento de otro material celular y/o productos químicos.

El término "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgE, IgG tal como IgG1 o IgG4) que se proporciona por los genes de la región constante de la cadena pesada. El isotipo también incluye versiones modificadas de una de esas clases, en donde se han hecho modificaciones para alterar la función de Fc, por ejemplo, para aumentar o reducir las funciones efectoras o la unión a receptores de Fc. Por ejemplo IgG1f LALA es una versión modificada del isotipo IgG que tiene funciones efectoras reducidas significativamente. Sustituciones específicas de aminoácidos reducen la afinidad de la unión hacia el receptor gamma RI de Fc en comparación con un anticuerpo no modificado. IgG1f LALA se describe en el documento de EE.UU. con nº de serie 08/479.752 (SCOTGEN BIOPHARMACEUTICALS INC.). En ciertas realizaciones de la presente descripción, los restos que se unen a antígeno son anticuerpos y son del tipo IgG, IgM, IgA, IgE o IgD. En realizaciones específicas, los anticuerpos son del tipo IgG. En ciertas realizaciones de la presente descripción, los anticuerpos son del subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En realizaciones específicas, los anticuerpos son del subtipo IgG1 o IgG4. En otras realizaciones específicas, los anticuerpos son del subtipo IgG1 o IgG1f LALA.

La expresión "se une específicamente" o "se une selectivamente" a un antígeno (por ejemplo, un anticuerpo que se une a MIF) se refiere a una reacción de unión que se puede determinar en presencia de un antígeno (por ejemplo, MIF humano o D-DT humana) en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. De este modo, las expresiones "que reconoce un antígeno" y "específico para un antígeno" se usan indistintamente en el presente documento con la expresión "se une específicamente a un antígeno". La unión específica de un resto que se une a antígeno, como por ejemplo un anticuerpo monoclonal, a un antígeno se puede determinar por varios métodos establecidos, conocidos en la técnica y que incluyen ELISA, FACS, transferencia Western, inmunotransferencia, BIAcore y SET. En la presente descripción, un resto que se une a antígeno se considera que es específico para un antígeno o una selección de más de un antígeno, si se demuestra que el resto que se une a antígeno es capaz de unirse a un antígeno específico o a una selección de más de un antígeno, de forma al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces superior al fondo. De este modo el fondo se determina por un resto que se une a antígeno que se sabe que es inespecífico para los antígenos seleccionados o comparando con la unión a un antígeno no relacionado.

En la presente descripción, un resto que se une a antígeno se considera que es específico para un antígeno si se determina que la CE_{50} del resto que se une a antígeno es menor de 100 nM, menor de 90 nM, menor de 80 nM, menor de 70 nM, menor de 60 nM, menor de 50 nM, menor de 40 nM, menor de 30 nM, menor de 29 nM, menor de 28 nM, menor de 27 nM, menor de 26 nM, menor de 25 nM, menor de 24 nM, menor de 23 nM, menor de 22 nM, menor de 21 nM, menor de 20 nM, menor de 15 nM, menor de 10 nM, menor de 5 nM, menor de 4 nM, menor de 3 nM, menor de 2 nM, menor de 1 nM para cada uno de los respectivos antígenos. La CE_{50} se puede determinar de acuerdo con la memoria descriptiva indicada a continuación.

El término "afinidad" tal y como se emplea en este documento, se refiere a la fuerza de una interacción entre un resto que se une a antígeno, como por ejemplo, un anticuerpo monoclonal y un antígeno, en sitios antigénicos individuales.

Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del "brazo" del anticuerpo interacciona a través de fuerzas no covalentes débiles con un antígeno en numerosos sitios; cuanto mayor es la interacción, más fuerte será la afinidad.

El término "K_D", tal y como se emplea en este documento, se refiere a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para restos que se unen a antígeno, como por ejemplo anticuerpos monoclonales, se pueden determinar usando métodos bien establecidos en la técnica. Los métodos para determinar la K_D de un resto que se une a antígeno como por ejemplo, un anticuerpo monoclonal son SET (valoración en equilibrio soluble) o resonancia de plasmón superficial utilizando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore[®]. En la presente descripción, un anticuerpo que tiene una reacción cruzada con MIF/D-DT, normalmente tiene una constante de tasa de disociación (K_D) (K_{off}/K_{on}) menor de 5x10⁻² M, menor de 10⁻² M, menor de 5x10⁻³ M, menor de 10⁻³ M, menor de 5x10⁻⁴ M, menor de 10⁻⁴ M, menor de 5x10⁻⁵ M, menor de 10⁻⁵ M, menor de 5x10⁻⁶ M, menor de 10⁻⁶ M, menor de 5x10⁻⁷ M, menor de 10⁻⁷ M, menor de 5x10⁻⁸ M, menor de 10⁻⁸ M, menor de 5x10⁻⁹ M, menor de 10⁻⁹ M, menor de 5x10⁻¹⁰ M, menor de 10⁻¹⁰ M, menor de 5x10⁻¹¹ M, menor de 10⁻¹¹ M, menor de 5x10⁻¹² M, menor de 10⁻¹² M, menor de 5x10⁻¹³ M, menor de 10⁻¹³ M, menor de 5x10⁻¹⁴ M, menor de 10⁻¹⁴ M, menor de 5x10⁻¹⁵ M o menor de 10⁻¹⁵ M o inferior.

La expresión "región que se une a antígeno" tal y como se emplea en este documento, se refiere a un dominio de un resto que se une a antígeno que es responsable de la unión específica entre un resto que se une a antígeno y un antígeno. Por ejemplo, la región que se une a antígeno de un anticuerpo o un fragmento del mismo está formada por residuos de aminoácidos de las regiones variables N-terminales de la cadena pesada (abreviada en este documento como VH) y la cadena ligera (abreviada en este documento como VL). Las regiones variables de la VH y la VL comprenden cada una tres regiones hipervariables, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los 3 CDRs de la VH y las 3 CDRs de la VL están dispuestas tridimensionalmente una respecto a la otra para formar una superficie que se une a antígeno.

La expresión "se une con reactividad cruzada" y las expresiones "específica de forma cruzada" y "reactivo de forma cruzada" se usan en este documento indistintamente y se refieren a una región que se une a antígeno que tiene la capacidad de unirse específicamente a más de un antígeno. Por ejemplo, en la presente descripción, la región que se une a antígeno se une con reactividad cruzada a MIF y D-DT. Preferiblemente, la región que se une a antígeno se une específicamente de forma cruzada a MIF humano y a D-DT humana. Por ejemplo, en la presente descripción un anticuerpo que se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT comprende dos brazos, en donde ambos brazos comprenden la misma región que se une a antígeno.

En la presente descripción, las expresiones "se une específicamente de forma cruzada a MIF y a D-DT" y "con reactividad cruzada con MIF/D-DT" se usan en este documento indistintamente y se refieren a un resto que se une a antígeno que se une con reactividad cruzada a MIF y a D-DT. La especificidad de un antígeno se ha definido anteriormente y se puede determinar por métodos conocidos por un experto en la técnica como, por ejemplo, ELISA, FACS, transferencia Western, inmunotransferencia, BIACore o SET. En la presente descripción, un resto que se une a antígeno se considera que tendrá una reacción cruzada con un número ilimitado de antígenos, si se demuestra que el resto que se une a antígeno es capaz de unirse a una selección específica de al menos dos antígenos, de forma al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces superior al fondo. De este modo el fondo se determina por un resto que se une a antígeno que se sabe que es inespecífico para los antígenos seleccionados o comparando con la unión a un antígeno no relacionado.

En la presente descripción, un resto que se une a antígeno se considera que tiene reactividad cruzada con un número ilimitado de antígenos, si se determina que la CE₅₀ del resto que se une a antígeno es menor de 100 nM, menor de 90 nM, menor de 80 nM, menor de 70 nM, menor de 60 nM, menor de 50 nM, menor de 40 nM, menor de 30 nM, menor de 29 nM, menor de 28 nM, menor de 27 nM, menor de 26 nM, menor de 25 nM, menor de 24 nM, menor de 23 nM, menor de 22 nM, menor de 21 nM, menor de 20 nM, menor de 15 nM, menor de 10 nM, menor de 5 nM, menor de 4 nM, menor de 3 nM, menor de 2 nM, menor de 1 nM para cada uno de los respectivos antígenos. La CE₅₀ se puede determinar de acuerdo con la memoria descriptiva indicada a continuación.

En la presente descripción, la reactividad cruzada de los restos que se unen a antígeno no se limita a una especie. En la presente descripción, un resto que se une a antígeno que se une específicamente de forma cruzada a MIF humano y a D-DT humana, además, reacciona de forma cruzada con MIF y/o D-DT obtenidos a partir de una o varias otras especies de mamífero (por ejemplo, murino, rata, mono rhesus y macaco cangrejero).

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y también a aminoácidos sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que actúan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que actúan de una manera similar a un aminoácido de origen natural.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o varios residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y a polímeros de aminoácido de origen no natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de polipéptido particular incluye también implícitamente variantes modificadas de forma conservadora de los mismos.

La expresión "ácido nucleico" se emplea en este documento de forma intercambiable con el término "polinucleótido" y se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. La expresión incluye ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos o residuos o enlaces del esqueleto modificados, que son sintéticos, de origen natural y de origen no natural, los cuales tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de una manera similar a la de los nucleótidos de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de quirál-metilo, ribonucleótidos de 2-O-metilo, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs). A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también incluye implícitamente variantes modificadas de manera conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, tal y como se detalla a continuación, las sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o varios codones seleccionados (o todos) está sustituida con residuos de base mixta y/o de desoxiinosina (Batzler et al. (1991) *Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsuka et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; y Rossolini et al. (1994) *Mol. Cell. Probes* 8:91-98).

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora") se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que tales términos se refieren no solo a la célula objeto en particular, sino a la progenie de tal célula. Debido a que se pueden producir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o a influencias ambientales, tal progenie no puede, de hecho, ser idéntica a la célula parental, pero aun así se incluye dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" tal y como se usa en el presente documento.

El término "vector" se entiende que hace referencia a una molécula de polinucleótido capaz de transportar otro polinucleótido al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de una replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se han introducido (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula hospedadora después de la introducción en la célula hospedadora y de ese modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están ligados funcionalmente. Tales vectores se denominan en este documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión que son útiles en técnicas de ADN recombinante, frecuentemente están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar indistintamente, ya que el plásmido es la forma utilizada más comúnmente de vector. Sin embargo, la descripción se entiende que incluye otras formas de vectores de expresión de ese tipo, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus con replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven para funciones equivalentes.

Por consiguiente, un anticuerpo que "inhibe" una o varias propiedades funcionales de MIF y/o D-DT (por ejemplo, actividades bioquímicas, inmunoquímicas, celulares, fisiológicas u otras actividades biológicas o similares) tal y como se determina de acuerdo con metodologías conocidas en la técnica y descritas en el presente documento, se entiende que se refiere a una disminución estadísticamente significativa de la actividad particular con respecto a la observada en ausencia del anticuerpo (por ejemplo, o cuando está presente un anticuerpo de control de especificidad irrelevante).

Las expresiones "porcentaje de identidad" "tanto por ciento idénticos", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, 60% de identidad, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad en una región especificada, o, cuando no se especifica, en toda la secuencia), cuando se comparan y se alinean para tener una correspondencia máxima a lo largo de una ventana de comparación o una región designada tal y como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe a lo largo de una región que tiene al menos aproximadamente 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud o más preferiblemente a lo largo de una región que tiene 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

Adicional o alternativamente, las secuencias de proteínas de la presente descripción se pueden emplear además como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Por ejemplo, tales búsquedas se pueden realizar utilizando el programa BLAST (versión 2.0) de Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Para la comparación de secuencias, normalmente una

secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias del ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias del ensayo y las de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencias, si es necesario y se designan parámetros del programa del algoritmo para las secuencias. Se pueden emplear los parámetros del programa por defecto o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de las secuencias para las secuencias del ensayo, en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; y Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. El programa informático para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Este algoritmo implica primero identificar parejas de secuencias de alta puntuación (HSPs), identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de la palabra vecina (Altschul *et al.*, *supra*). Estos aciertos iniciales de palabra vecina actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs más largas que las contengan. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como la puntuación de alineación acumulada se pueda aumentar. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para una pareja de residuos coincidentes; siempre que >0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre que <0). Para las secuencias de aminoácidos, se emplea una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de la alineación acumulada disminuye a la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o varias alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3 y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) alineaciones (B) de 50, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia, si la probabilidad de la suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico del ensayo con el ácido nucleico de referencia, es menor de aproximadamente 0,2, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01 y lo más preferiblemente menor de aproximadamente 0,001.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci. 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos en peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete del programa informático GCG (disponible en www.gcg.com), usando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250 y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Además del porcentaje de identidad de secuencia que se ha indicado anteriormente, otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo de forma cruzada con los anticuerpos generados contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por lo tanto, un polipéptido es por lo general sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solo en sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación. Además, aún otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que se pueden emplear los mismos cebadores para amplificar la secuencia.

Se describen diversos aspectos de la descripción con más detalle en las siguientes secciones y subsecciones.

Anticuerpos manipulados genéticamente y modificados

Un anticuerpo de la presente descripción puede ser un anticuerpo modificado obtenido a partir de los anticuerpos mostrados en la Tabla 1. De este modo, los anticuerpos mostrados en la Tabla 1 se utilizan como material de partida para modificar genéticamente un anticuerpo modificado.

Un anticuerpo se puede manipular genéticamente mediante la modificación de uno o varios residuos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, VH y/o VL), por ejemplo, dentro de una o varias regiones CDRs y/o dentro de una o varias regiones estructurales. Adicional o alternativamente, un anticuerpo se puede modificar genéticamente mediante una modificación de los residuos dentro de la o las regiones constantes, por ejemplo, para alterar la o las funciones efectoras del anticuerpo.

Mediante una manipulación genética o una modificación de un anticuerpo, se pueden lograr variantes mejoradas del clon parental. Entretanto se han establecido en la técnica diversas tecnologías, por ejemplo, para mejorar la afinidad, para reducir la inmunogenicidad y aumentar la función efectora de un anticuerpo.

Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que están ubicados en las seis regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada y ligera (CDRs). Por lo tanto, la maduración por afinidad comprende la modificación de CDRs específicas para alterar las propiedades de unión de un anticuerpo. La maduración por afinidad incluye la mutagénesis dirigida al sitio dentro de las regiones hipervariables y puede comprender sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos. Otro tipo de maduración por afinidad comprende la sustitución completa de CDRs específicas en un anticuerpo específico con un banco de CDRs respectivas. Acto seguido, los anticuerpos modificados se pueden analizar en ensayos de unión a antígeno convencionales (por ejemplo, análisis con ELISA, FACS, BIAcore, SET) para mejorar la afinidad hacia el antígeno respectivo. (Véase, por ejemplo, Riechmann et al., (1998) Nature 332:323-327; Jones et al., (1986) Nature 321:522-525; Queen et al., (1989) Proc. Natl. Acad., U.S.A. 86:10029-10033; documento de Patente de EE.UU nº 5.225.539 de Winter, y documentos de Patente de EE.UU nº 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.).

Debido a que las secuencias de CDRs son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos específicos que se producen de forma natural mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDRs del anticuerpo de origen natural específico, injertadas en secuencias de la región estructural procedentes de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades. Tales secuencias estructurales se pueden obtener a partir de bases de datos de ADN públicas o a partir de referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de la línea germinal. Por ejemplo, se pueden encontrar secuencias de ADN de la línea germinal para genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humana, en la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "Vase" (disponible en Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publicación nº 91-3242; Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989) Nature 342:877-883; y Al-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948; Tomlinson et al., (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; y Cox et al., (1994) Eur. J Immunol. 24:827-836.

Armazones

Otras regiones estructurales o armazones de anticuerpos/inmunoglobulinas que comprenden "restos que se unen a antígeno" se pueden emplear de acuerdo con la presente descripción. Estas incluyen anticuerpos y armazones que no se basan en inmunoglobulinas, en los que se pueden injertar las CDRs de la descripción.

Los armazones de fibronectina se basan en el dominio de fibronectina de tipo III (por ejemplo, el décimo módulo de la fibronectina de tipo III (dominio 10 Fn3)). El dominio de fibronectina de tipo III tiene 7 u 8 hebras beta que están distribuidas entre dos láminas beta, que a su vez se agrupan entre sí para formar el núcleo de la proteína, y que además contiene bucles (análogos a CDRs) que conectan las hebras beta entre sí y están expuestos a disolvente. Existen al menos tres bucles de ese tipo en el borde de cada sándwich de lámina beta, en donde el borde es el límite de la proteína perpendicular a la dirección de las hebras beta (véase el documento US 6.818.418). Estos armazones a base de fibronectina no son una inmunoglobulina, aunque el plegamiento global está estrechamente relacionado con el del fragmento más pequeño funcional de un anticuerpo, la región variable de la cadena pesada, que comprende la unidad de reconocimiento del antígeno completa en las IgG de camello y de llama. Debido a esta estructura, el anticuerpo que no es una inmunoglobulina imita las propiedades de unión a antígeno que son similares por su naturaleza y afinidad a las de los anticuerpos. Estos armazones se pueden utilizar en una estrategia de aleatorización y de barajado de los bucles *in vitro* que es similar al proceso de maduración por afinidad de los anticuerpos *in vivo*. Estas moléculas basadas en la fibronectina se pueden utilizar como armazones, en donde las regiones de bucle de la molécula se pueden reemplazar con CDRs de la descripción usando técnicas de clonación convencionales.

Las proteínas de anticuerpos de camélido obtenidas a partir de los miembros de la familia del camello y del dromedario (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromaderius*) incluyendo miembros del nuevo mundo tales como especies de llama (*Lama paccos*, *Lama glama* y *Lama vicugna*), se han caracterizado con respecto al tamaño, complejidad estructural y antigenicidad hacia sujetos humanos. Ciertos anticuerpos de IgG procedentes de esa familia de mamíferos, tal y como se encuentran en la naturaleza, carecen de cadenas ligeras y por tanto son estructuralmente distintos de la estructura cuaternaria típica de cuatro cadenas que tiene dos cadenas pesadas y dos ligeras, para los anticuerpos de otros animales. Véase el documento WO1994/04678.

La tecnología de anquirina se basa en el uso de proteínas con módulos de repetición obtenidos a partir de la anqui-

rina, como armazones para portar regiones variables que se pueden utilizar para la unión a diferentes dianas. El módulo de repetición de anquirina es un polipéptido de 33 aminoácidos que consiste en dos hélices α antiparalelas y un giro β . La unión de las regiones variables está optimizada principalmente mediante el uso de presentación en ribosomas.

5 Los avímeros se obtienen a partir del dominio A natural. Estos dominios son utilizados en la naturaleza para las interacciones proteína-proteína y en el ser humano más de 250 proteínas se basan estructuralmente en los dominios A. Los avímeros consisten en varios monómeros diferentes con "dominio A" (2-10) unidos a través de enlazadores de aminoácidos. Los avímeros se pueden crear de forma que se pueden unir al antígeno diana utilizando la metodología descrita, por ejemplo, en los documentos de publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 20040175756; 10 20050053973; 20050048512; y 20060008844.

Los ligandos por afinidad aficuerpos son proteínas pequeñas y sencillas compuestas por un haz de tres hélices basado en el almacén de uno de los dominios que se une a IgG de la proteína A. La proteína A es una proteína de la superficie de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Este dominio de almacén consiste en 58 aminoácidos, 13 de los cuales se asignan al azar para generar bancos de aficuerpos con un gran número de variantes de ligando (véase, 15 por ejemplo, el documento US 5.831.012). Las moléculas de aficuerpos imitan los anticuerpos; tienen un peso molecular de 6 kDa, en comparación con el peso molecular de los anticuerpos, que es de 150 kDa. A pesar de su pequeño tamaño, el sitio de unión de las moléculas aficuerpos es similar al de un anticuerpo.

Las anticalinas son productos desarrollados por la empresa Pieris ProteoLab AG. Se obtienen a partir de lipocalinas, un grupo extendido de proteínas pequeñas y robustas que por lo general están involucradas en el transporte fisiológico o el almacenamiento de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Diversas lipocalinas naturales se encuentran en los tejidos humanos o líquidos corporales. La estructura de la proteína es una reminiscencia de las inmunoglobulinas, con bucles hipervariables en la parte superior de una región estructural rígida. Sin embargo, en contraste con los anticuerpos o sus fragmentos recombinantes, las lipocalinas se componen de una sola cadena de polipéptido con 160 a 180 residuos de aminoácidos, que es solo marginalmente más grande que un dominio único 25 de inmunoglobulina. El conjunto de cuatro bucles, que constituye el bolsillo de unión, muestra una plasticidad estructural pronunciada y tolera una variedad de cadenas laterales. De este modo, el sitio de unión se puede volver a configurar en un procedimiento patentado con el fin de reconocer moléculas diana prescritas de forma diferente con afinidad y especificidad elevadas. Una proteína de la familia de la lipocalina, la proteína que se une a bilina (BBP) de Pieris brassicae, se ha utilizado para desarrollar anticalinas mediante una mutagénesis del conjunto de cuatro bucles. Un ejemplo de un documento de solicitud de patente que describe anticalinas es la Publicación PCT nº 30 WO1999/16873.

Las moléculas de afilina son pequeñas proteínas que no son inmunoglobulinas que están diseñadas para tener afinidades específicas hacia proteínas y moléculas pequeñas. Nuevas moléculas de afilina se pueden seleccionar muy rápidamente a partir de dos bancos, cada uno de los cuales se basa en una proteína con un almacén diferente obtenida a partir de ser humano. Las moléculas de afilina no muestran ninguna homología estructural con las proteínas de inmunoglobulinas. Actualmente, se emplean dos armazones de afilina, uno de los cuales es gamma cristalina, una proteína estructural del cristalino del ojo humano y el otro es de la superfamilia de proteínas "ubiquitina". Ambos armazones humanos son muy pequeños, muestran una estabilidad frente a una temperatura elevada y son casi resistentes a los cambios de pH y los agentes desnaturizantes. Esta estabilidad elevada es debida principalmente 40 a la estructura de lámina beta expandida de las proteínas. Ejemplos de proteínas obtenidas a partir de gamma cristalina se describen en el documento WO2001/04144 y ejemplos de proteínas similares a "ubiquitina" se describen en el documento WO2004/106368.

Los miméticos de epítopos de proteínas (PEM) son moléculas cíclicas, de tamaño medio similares a péptidos (PM 1-2 kDa) que imitan estructuras secundarias de horquilla beta de las proteínas, la estructura secundaria más importante implicada en las interacciones proteína-proteína. 45

Generación de anticuerpos

(i) Ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos

La descripción proporciona moléculas de ácido nucleico sustancialmente purificadas que codifican polipéptidos que comprenden segmentos o dominios de las cadenas de anticuerpos que tienen reacción cruzada con MIF/D-DT, 50 descritos anteriormente. En una realización específica, las moléculas de ácido nucleico son las identificadas en la Tabla 1. Algunas otras moléculas de ácido nucleico de la descripción comprenden secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas (por ejemplo, al menos 65, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%) a las secuencias de nucleótidos de las identificadas en la Tabla 1. Una subclonación de los ácidos nucleicos mencionados anteriormente en vectores de expresión convencionales y apropiados y una expresión de dichos vectores de expresión en un sistema 55 de expresión apropiado, origina polipéptidos codificados por esos polinucleótidos que tienen una reacción cruzada con MIF y D-DT.

También se proporcionan en la descripción polinucleótidos que codifican al menos una región CDR y por lo general las tres regiones CDRs de la cadena pesada o ligera del anticuerpo que tiene reacción cruzada con MIF/D-DT que

se ha expuesto anteriormente. Algunos otros polinucleótidos codifican la totalidad o sustancialmente la totalidad de la secuencia de la región variable de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo que tiene reacción cruzada con MIF/D-DT que se ha expuesto anteriormente. Debido a la composición del código genético, una variedad de secuencias de ácidos nucleicos codificará cada una de las secuencias de aminoácidos de la inmunoglobulina.

- 5 Las secuencias de polinucleótidos se pueden producir mediante síntesis de ADN en fase sólida de novo o mediante mutagénesis con PCR de una secuencia existente (por ejemplo, las secuencias tal y como se describen en los Ejemplos a continuación) que codifica un anticuerpo que tiene reacción cruzada con MIF/D-DT o su fragmento de unión. La síntesis química directa de ácidos nucleicos se puede llevar a cabo por métodos conocidos en la técnica, tales como el método de fosfotriéster de Narang et al., (1979) Meth. Enzymol. 68:90; el método de fosfodiéster de Brown et al., (1979) Meth. Enzymol. 68:109; el método de dietilfosforamidita de Beaucage et al., (1981) Tetra. Lett., 22:1859; y el método de soporte sólido del documento de Patente de EE.UU. nº 4.458.066. La introducción de mutaciones en una secuencia de polinucleótido mediante PCR se puede realizar como se describe, por ejemplo, en PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., (1991) Nucleic Acids Res. 19:967; y Eckert et al., (1991) PCR Methods and Applications 1:17.

También se proporcionan en la descripción vectores de expresión y células hospedadoras para producir los anticuerpos que tienen reacción cruzada con MIF/D-DT descritos anteriormente. Se pueden emplear varios vectores de expresión para expresar los polinucleótidos que codifican las cadenas del anticuerpo que tiene reacción cruzada con MIF/D-DT o fragmentos de unión. Ambos vectores de expresión, basados en virus y no basados en virus, se pueden utilizar para producir los anticuerpos en una célula hospedadora de mamífero. Los vectores y sistemas que no son víricos incluyen plásmidos, vectores episomales, normalmente con un casete de expresión para expresar una proteína o ARN y cromosomas artificiales humanos (véase, por ejemplo, Harrington et al., (1997) Nat Genet 15:345). Por ejemplo, los vectores no víricos útiles para la expresión de los polinucleótidos y polipéptidos que tienen reacción cruzada con MIF/D-DT en células de mamífero (por ejemplo, humanas), incluyen pThioHis A, B y C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B y C, (Invitrogen, San Diego, CA), vectores MPSV y numerosos otros vectores conocidos en la técnica para la expresión de otras proteínas. Los vectores víricos útiles incluyen vectores basados en retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, vectores basados en SV40, virus del papiloma, virus de Epstein Barr HBP, vectores de virus vaccinia y virus del bosque de Semliki (SFV). Véase, Brent et al., (1995) Annu. Rev. Microbiol. 49 807; y Rosenfeld et al., (1992) Cell 68:143.

30 La elección del vector de expresión depende de las células hospedadoras deseadas en las que se va a expresar el vector. Normalmente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (por ejemplo, potenciadores) que están ligadas funcionalmente a los polinucleótidos que codifican una cadena de anticuerpo o un fragmento que tiene reacción cruzada con MIF/D-DT. En algunas realizaciones, se emplea un promotor inducible para evitar la expresión de secuencias insertadas, excepto bajo condiciones de inducción. Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo, arabinosa, lacZ, promotor de metalotioneína o promotor de choque térmico. Los cultivos de organismos transformados se pueden expandir bajo condiciones no inductoras, sin sesgar la población de secuencias codificadoras cuyos productos de expresión son mejor tolerados por las células hospedadoras. Además de los promotores, otros elementos reguladores también pueden ser necesarios o deseados para una expresión eficaz de una cadena de anticuerpo o un fragmento que tiene reacción cruzada con MIF/D-DT. Estos elementos incluyen normalmente un codón de iniciación ATG y un sitio de unión al ribosoma adyacente u otras secuencias. Además, la eficacia de la expresión se puede potenciar mediante una inclusión de potenciadores apropiados en el sistema celular en uso (véase, por ejemplo, Scharf et al., (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125; y Bittner et al., (1987) Meth. Enzymol., 153:516). Por ejemplo, el potenciador de SV40 o el promotor de CMV se pueden usar para aumentar la expresión en células hospedadoras de mamífero.

45 Los vectores de expresión también pueden proporcionar una posición de la secuencia señal de secreción para formar una proteína de fusión con polipéptidos codificados por secuencias de anticuerpos insertadas que tienen reacción cruzada con MIF/D-DT.

Más frecuentemente, las secuencias de anticuerpos insertadas que tienen reacción cruzada con MIF/D-DT, están ligadas a secuencias señal antes de la inclusión en el vector. Los vectores que se utilizan para recibir las secuencias que codifican dominios variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo que tiene reacción cruzada con MIF/D-DT, también pueden codificar regiones constantes o partes de las mismas. Tales vectores permiten la expresión de las regiones variables como proteínas de fusión con las regiones constantes, lo que conduce a la producción de anticuerpos intactos o fragmentos de los mismos. Normalmente, tales regiones constantes son humanas.

55 Las células hospedadoras para albergar y expresar las cadenas de anticuerpos que tienen reacción cruzada con MIF/D-DT, pueden ser o bien procariontas o eucariotas. *E. coli* es un hospedador procarionta útil para la clonación y la expresión de los polinucleótidos de la presente descripción. Otros hospedadores microbianos adecuados para el uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis* y otras *Enterobacteriaceae*, tales como *Salmonella*, *Serratia* y varias especies de *Pseudomonas*. En esos hospedadores procariontas, también se pueden preparar vectores de expresión, que normalmente contienen secuencias de control de la expresión, compatibles con la célula hospedadora (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estará presente cualquier cantidad de una variedad de promotores bien conocidos, tal como el sistema de promotor de lactosa, un sistema de promotor de triptófano (*trp*), un sistema de

promotor de beta-lactamasa o un sistema de promotor de fago lambda. Los promotores normalmente controlan la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora y tienen secuencias del sitio de unión a ribosoma y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción. Otros microbios, tales como las levaduras, también se pueden emplear para expresar polipéptidos que tienen reacción cruzada con MIF/D-DT de la descripción. Las células de insecto en combinación con vectores de baculovirus también se pueden utilizar.

En algunas realizaciones preferidas, las células hospedadoras de mamífero se usan para expresar y producir los polipéptidos que tienen reacción cruzada con MIF/D-DT de la presente descripción. Por ejemplo, pueden ser o bien genes de inmunoglobulina que se expresan de forma endógena en una línea celular de hibridoma o una línea celular de mamífero que alberga un vector de expresión exógena que incluye cualquier célula animal o humana normal mortal o normal o anormal inmortal (por ejemplo, las células SP2/0 de mieloma, células CHO, células HeLa, células PER.C6, células COS, células HKB11, células NS0). Por ejemplo, se ha desarrollado una variedad de líneas de células hospedadoras adecuadas, capaces de secretar inmunoglobulinas intactas, incluyendo las líneas celulares de CHO, diversas líneas celulares de COS, células HeLa, líneas celulares de mieloma, linfocitos B transformados e hibridomas. El uso de un cultivo de células de tejido de mamífero para expresar polipéptidos se describe en general, por ejemplo, en Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, NY, NY, 1987. Los vectores de expresión para células hospedadoras de mamífero pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (véase, por ejemplo, Queen et al., (1986) Immunol Rev. 89:49-68) y sitios de información del procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción. Estos vectores de expresión usualmente contienen promotores obtenidos a partir de genes de mamífero o de virus de mamífero. Los promotores adecuados pueden ser constitutivos, específicos del tipo de célula, específicos de la etapa y/o modulables o regulables. Los promotores útiles incluyen, pero no se limitan a, el promotor de metalotioneína, el promotor tardío principal de adenovirus constitutivo, el promotor de MMTV inducible con dexametasona, el promotor de SV40, el promotor de MRP polIII, el promotor de MPSV constitutivo, el promotor de CMV inducible con tetraciclina (tal como el promotor de CMV humano inmediato temprano), el promotor de CMV constitutivo y combinaciones de promotor-potenciador conocidas en la técnica.

Los métodos para introducir vectores de expresión que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, una transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que un tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación se pueden utilizar para otros hospedadores celulares. (Véase en general Sambrook, *et al.*, supra). Otros métodos incluyen, por ejemplo, la electroporación, el tratamiento con fosfato de calcio, la transformación mediada por liposomas, la inyección y la microinyección, métodos balísticos, virosomas, inmunoliposomas, conjugados de polimerización y ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, fusión con la proteína estructural VP22 del virus del herpes (Elliot y O'Hare, (1997) Cell 88:223), captación de ADN mejorada con agentes y transducción *ex vivo*. Para una producción a largo plazo de alto rendimiento de proteínas recombinantes, frecuentemente se desea una expresión estable.

(ii) Generación de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (AcMos) se pueden producir a través de una variedad de técnicas, que incluyen la metodología de anticuerpos monoclonales convencional, por ejemplo, la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, (1975) Nature 256: 495. Se pueden emplear muchas técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la transformación vírica u oncogénica de linfocitos B.

Un sistema animal para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento bien establecido. Los protocolos de inmunización y las técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para una fusión, se conocen en la técnica. Las parejas de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente descripción se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera se puede obtener a partir del hibridoma murino de interés y modificar genéticamente para que contenga secuencias de inmunoglobulinas no murinas (por ejemplo, humanas) usando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas se pueden ligar a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento de Patente de EE.UU. n.º 4.816.567 de Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDRs murinas se pueden insertar en una región estructural humana usando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento de Patente de EE.UU. n.º 5225539 de Winter et al. y los documentos de Patente de EE.UU. n.º 5.530.101; 5585089; 5693762 y 6180370 de Queen et al.

En una cierta realización, los anticuerpos de la descripción son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos se pueden generar usando ratones transgénicos o transcromosómicos que son portadores de partes del sistema inmune humano, en lugar del sistema inmune de ratón. Esos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones que se denominan en este documento ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente y se denominan colectivamente en este documento "ratones de Ig humana".

El HuMAb mouse[®] (Medarex, Inc.) contiene miniloci de genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana reordenadas de la cadena pesada (μ y γ) y de la cadena ligera κ , junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de la cadena μ y κ endógenos (véase, por ejemplo, Lonberg, et al., (1994) *Nature* 368 (6474):856-859). Por consiguiente, los ratones muestran una expresión reducida de la IgM de ratón o κ y en respuesta a una inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera humana introducidos experimentan un cambio de clase y una mutación somática para generar IgGk monoclonal humana de alta afinidad (Lonberg et al. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg y Huszar, (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 y Harding y Lonberg, (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y el uso de ratones HuMAb y las modificaciones genómicas realizadas mediante tales ratones, se describen adicionalmente en Taylor et al., (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen et al., (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3720-3724; Choi et al., (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen et al., (1993) *EMBO J.* 12:821-830; Tuailon et al., (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor et al., (1994) *International Immunology* 579-591; y Fishwild et al., (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Véanse además, los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todos de Lonberg y Kay; Patente de EE.UU. nº 5.545.807 de Surani et al.; Publicaciones PCT nº WO1992/103918, WO1993/12227, WO1994/25585, WO1997/113852, WO1998/24884 y WO1999/45962, todas de Lonberg y Kay; y la Publicación PCT nº WO2001/14424.

En otra realización, los anticuerpos humanos de la descripción se puede conseguir utilizando un ratón que es portador de secuencias de inmunoglobulina humana en los transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que es portador de un transgén de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Tales ratones, denominados en este documento "ratones KM", se describen en detalle en el documento de Publicación PCT WO2002/43478 de Ishida et al.

Aún más adicionalmente, sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden utilizar para producir anticuerpos que tienen reacción cruzada con MIF/D-DT de la descripción. Por ejemplo, se puede emplear un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.). Tales ratones se describen, por ejemplo, en los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 de Kucherlapati et al.

Por otra parte, sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden utilizar para producir anticuerpos que tienen reacción cruzada con MIF/D-DT de la descripción. Por ejemplo, se pueden utilizar ratones que son portadores tanto de un transcromosoma de la cadena pesada humana como de un transcromosoma de la cadena ligera humana, denominados "ratones TC"; tales ratones se describen en Tomizuka et al., (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Además, vacas que son portadoras de transcromosomas de la cadena pesada y ligera humana se han descrito en la técnica (Kuroiwa et al., (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) y se pueden utilizar para producir anticuerpos que tienen reacción cruzada con MIF/D-DT de la descripción.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la descripción también se pueden preparar usando métodos de presentación en fagos para el escrutinio de genotecas de genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica o se describen en los ejemplos siguientes. Véanse, por ejemplo: los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner et al.; los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.427.908 y 5.580.717 de Dower et al.; los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty et al.; y los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths et al.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la descripción también se pueden preparar usando métodos de presentación en ribosomas, presentación en ARNm, presentación en bacterias y presentación en levaduras para escrutar genotecas de genes de inmunoglobulina humana. En general, las células eucariotas que presentan genotecas de anticuerpos humanos son estándar en la técnica (véase Plückthun, A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (10): 4937-42; Lipovsek et al. (2004) *Imm. Methods* 290 (1-2): 51-67; He et al. (2007) *Nature* 4 (3): 281-288; Gold et al. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (9): 4825-6; Fukuda I, Kojoh K, Tabata N, et al. (2006) *Nucleic Acids Res.* 34 (19): e127; Francisco et al. (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 10444-48; Georgiou et al. (1997) *Nat. Biotech.* 15 (1): 29-34; Boder et al. (2000) *Proc Nat Acad Sci*, 97(20): 10701-10705; Weaver-Feldhaus et al. (2004) *FEBS Letters* 564 (1-2): 24-34).

Los anticuerpos monoclonales humanos de la descripción también se pueden preparar utilizando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunes humanas, de manera que se puede generar una respuesta de anticuerpos humanos después de la inmunización. Tales ratones se describen, por ejemplo, en los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson et al.

(iii) Manipulación genética de la región estructural o Fc

Un tipo de manipulación de la región estructural implica la mutación de uno o varios residuos dentro de la región estructural o incluso dentro de una o varias regiones CDRs, para eliminar epítomos de linfocitos T para reducir de este modo la inmunogenidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se conoce como "desinmunización" y

se describe con más detalle en el documento de Patente de EE.UU. nº 20030153043 de Carr et al.

En adición o de forma alternativa a las modificaciones realizadas dentro de las regiones estructurales o CDRs, los anticuerpos de la descripción se pueden manipular genéticamente de modo que incluyan modificaciones dentro de la región Fc, normalmente para alterar una o varias propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor de Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la descripción se puede modificar químicamente (por ejemplo, uno o más restos químicos se pueden fijar al anticuerpo) o modificar para alterar su glicosilación, alterar de nuevo una o varias propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación.

En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de tal manera que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altera, por ejemplo, aumentándolo o disminuyéndolo. Este enfoque se describe adicionalmente en el documento de Patente de EE.UU. nº 5.677.425 de Bodmer et al. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región bisagra de Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o varias mutaciones de aminoácidos se introducen en la región de la interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra, de modo que el anticuerpo tiene una unión alterada a la proteína A de estafilococos (SpA) en relación con un dominio Fc-bisagra natural que se une a SpA. Este enfoque se describe con más detalle en el documento de Patente de EE.UU. nº 6.165.745 de Ward et al.

En otras realizaciones, la región Fc se altera mediante la sustitución de al menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o varios aminoácidos se pueden sustituir con un residuo de aminoácido diferente, de manera que el anticuerpo tiene una afinidad alterada hacia un ligando efector, pero conserva la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector hacia el que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. La versión modificada del isotipo correspondiente se conoce como IgG1f LALA en la comunidad científica. Como ya se ha mencionado anteriormente, este enfoque se describe en más detalle en los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.624.821 y 5.648.260, ambos de Winter et al.

En otra realización, uno o varios aminoácidos seleccionados a partir de residuos de aminoácidos se pueden sustituir con un residuo de aminoácido diferente, de modo que el anticuerpo tiene una unión a C1q alterada y/o reducida o se suprime la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe con más detalle en el documento de Patente de EE.UU. nº 6.194.551 de Idusogie et al.

En otra realización, uno o varios residuos de aminoácidos están alterados para alterar de ese modo la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en el documento de publicación PCT WO1994/29351 de Bodmer et al.

En aún otra realización, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo hacia un receptor de Fcγ mediante la modificación de uno o varios aminoácidos. Este enfoque se describe adicionalmente en el documento de Publicación PCT WO2000/42072 de Presta. Por otra parte, los sitios de unión en la IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn se han cartografiado y se han descrito variantes con una unión mejorada (véase, Shields et al., (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

En todavía otra realización, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo hacia el "antígeno". Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr, por ejemplo, mediante la alteración de uno o varios sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o varias sustituciones de aminoácidos que dan lugar a la eliminación de uno o varios sitios de glicosilación de la región estructural de la región variable para eliminar de ese modo la glicosilación en ese sitio. Una aglicosilación de ese tipo puede aumentar la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno. Un enfoque de ese tipo se describe con más detalle en los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.714.350 y 6.350.861 de Co et al.

Adicional o alternativamente, se puede preparar un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras de GlcNac bisecantes incrementadas. Tales patrones de glicosilación alterados han mostrado que aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con la maquinaria de glicosilación alterada. Células con una maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células hospedadoras en las que se expresan anticuerpos recombinantes de la descripción para producir de este modo un anticuerpo con una glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hang et al. describe una línea celular con un gen FUT8 interrumpido funcionalmente, que codifica una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en una línea celular de ese tipo, muestran hipofucosilación. El documento de publicación PCT

WO2003/035835 de Presta describe una línea celular CHO variante, las células Lec13, con capacidad reducida para fijar fucosa a hidratos de carbono ligados a Asn(297), que también da lugar a una hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields et al., (2002) J. Biol. Chem. 277 26733-26740). El documento de publicación PCT WO1999/54342 de Umana et al. describe líneas celulares manipuladas genéticamente para expresar glicosiltransferasas que modifican glicoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de tal manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares manipuladas genéticamente mostraban un aumento de las estructuras de GlcNac bisecantes lo que daba lugar a un aumento de la actividad ADCC de los anticuerpos (véase también Umana et al., (1999) Nat. Biotech. 17:176-180).

En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Varios enfoques son posibles. Por ejemplo, se puede introducir una o varias de las siguientes mutaciones: T252L, T254S y T256F, como se describe en el documento de Patente de EE.UU. n° 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo se puede alterar dentro de la región CH1 o CL para contener un epítipo que se une a un receptor de rescate, tomado a partir de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, tal como se describe en los documentos de Patente de EE.UU. n° 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al.

Composiciones farmacéuticas

La descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los restos que se unen a antígeno que tienen reacción cruzada con MIF/D-DT (intactos o fragmentos de unión) formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización de la descripción, el anticuerpo que tiene reacción cruzada con MIF/D-DT (intacto o fragmentos de unión) se formula junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener adicionalmente uno o varios otros agentes terapéuticos que son adecuados para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con MIF y/o D-DT. Los vehículos farmacéuticos mejoran o estabilizan la composición, o facilitan la preparación de la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles.

Una composición farmacéutica de la presente descripción se puede administrar a través de una variedad de métodos conocidos en la técnica. La vía y/o el modo de administración varía dependiendo de los resultados deseados. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, o que se administre de forma proximal al sitio de la diana. El vehículo farmacéuticamente aceptable debe ser adecuado para una administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el resto que se une a antígeno, el anticuerpo, la molécula biespecífica y multiespecífica, puede estar recubierto por un material para proteger al compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

La composición debe ser estéril y fluida. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol y cloruro de sodio en la composición. Se puede provocar una absorción a largo plazo de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Las composiciones farmacéuticas de la descripción se pueden preparar de acuerdo con métodos bien conocidos y puestos en práctica rutinariamente en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20ª ed., 2000; y Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Las composiciones farmacéuticas se preparan preferiblemente en condiciones GMP. Normalmente, una dosis terapéuticamente eficaz o una dosis efectiva del resto que se une a antígeno que tiene reacción cruzada con MIF/D-DT, se emplea en las composiciones farmacéuticas de la descripción. Los restos que se unen a antígeno que tienen reacción cruzada con MIF/D-DT se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según esté indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parentales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Una forma de dosificación unitaria tal y como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente descripción, se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, una composición y un modo de administración, sin que sea tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionada depende de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente descripción empleadas o el éster, la sal o la amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto

particular que está siendo empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico previo del paciente que está siendo tratado, y factores similares.

5 Un médico o un veterinario puede comenzar con dosis de los anticuerpos de la descripción, empleados en la composición farmacéutica, a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado. En general, las dosis eficaces de las composiciones de la presente descripción, para el tratamiento de un trastorno inflamatorio alérgico descrito en el presente documento, varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otras medicaciones administradas y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Las dosificaciones del tratamiento se tienen que valorar para optimizar la seguridad y la eficacia. Para una administración sistémica con un anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg y más normalmente de 0,01 a 15 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Un régimen de tratamiento ejemplar implica una administración sistémica una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Para una administración intravítrea de un anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 10 mg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica una administración sistémica una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses.

10 Los restos que se unen a antígeno y los anticuerpos de la presente descripción se administran habitualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosificaciones individuales pueden ser semanalmente, mensualmente o anualmente. En algunos métodos de administración sistémica, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de 1-1000 µg/ml y en algunos métodos de 25-500 µg/ml. Alternativamente, el resto que se une a antígeno se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del resto que se une a antígeno en el paciente. En general, los anticuerpos humanos y humanizados muestran una semivida mayor que la de los anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de la administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes siguen recibiendo el tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, y preferiblemente hasta que el paciente muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de ahí, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

20 Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles que incluyen un anticuerpo que tiene reacción cruzada con MIF/D-DT (intacto o fragmentos de unión), el anticuerpo que tiene reacción cruzada con MIF/D-DT (intacto o fragmentos de unión) se mezcla con un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 La dosis deseada de anticuerpos o fragmentos de los mismos es aproximadamente la misma que para un anticuerpo o un polipéptido, basándose en moles/kg de peso corporal. La concentración plasmática deseada de los anticuerpos o fragmentos de los mismos es aproximada, basándose en moles/kg de peso corporal. La dosis puede ser de al menos 15 µg, al menos 20 µg, al menos 25 µg, al menos 30 µg, al menos 35 µg, al menos 40 µg, al menos 45 µg, al menos 50 µg, al menos 55 µg, al menos 60 µg, al menos 65 µg, al menos 70 µg, al menos 75 µg, al menos 80 µg, al menos 85 µg, al menos 90 µg, al menos 95 µg o al menos 100 µg. Las dosis administradas a un sujeto pueden ascender a al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 o más.

30 Para los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la descripción, la dosificación administrada a un paciente puede ser de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del paciente. La dosificación puede estar entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, 0,0001 mg/kg a 0,25 mg/kg, 0,0001 a 0,15 mg/kg, 0,0001 a 0,10 mg/kg, 0,001 a 0,5 mg/kg, 0,01 a 0,25 mg/kg o 0,01 a 0,10 mg/kg de peso corporal del paciente.

35 La dosificación de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la descripción se puede calcular usando el peso del paciente en kilogramos (kg) multiplicado por la dosis que se va a administrar en mg/kg. La dosificación de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la descripción puede ser de 150 µg/kg o menos, 125 µg/kg o menos, 100 µg/kg o menos, 95 µg/kg o menos, 90 µg/kg o menos, 85 µg/kg o menos, 80 µg/kg o menos, 75 µg/kg o menos, 70 µg/kg o menos, 65 µg/kg o menos, 60 µg/kg o menos, 55 µg/kg o menos, 50 µg/kg o menos, 45 µg/kg o menos, 40 µg/kg o menos, 35 µg/kg o menos, 30 µg/kg o menos, 25 µg/kg o menos, 20 µg/kg o menos, 15 µg/kg o menos, 10 µg/kg o menos, 5 µg/kg o menos, 2,5 µg/kg o menos, 2 µg/kg o menos, 1,5 µg/kg o menos, 1 µg/kg o menos, 0,5 µg/kg o menos o 0,5 µg/kg o menos del peso corporal de un paciente.

40 La dosis unitaria de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la descripción puede ser de 0,1 mg a 20 mg, 0,1 mg a 15 mg, 0,1 mg a 12 mg, 0,1 mg a 10 mg, 0,1 mg a 8 mg, 0,1 mg a 7 mg, 0,1 mg a 5 mg, de 0,1 a 2,5 mg, 0,25 mg a 20 mg, 0,25 a 15 mg, 0,25 a 12 mg, 0,25 a 10 mg, 0,25 a 8 mg, 0,25 mg a 7 mg, 0,25 mg a 5 mg, 0,5 mg a 2,5 mg, 1 mg a 20 mg, 1 mg a 15 mg, 1 mg a 12 mg, 1 mg a 10 mg, 1 mg a 8 mg, 1 mg a 7 mg, 1 mg a 5 mg o 1 mg a 2,5 mg.

45 La dosificación de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la descripción puede lograr un título sérico de al

menos 0,1 µg/ml, al menos 0,5 µg/ml, al menos 1 µg/ml, al menos 2 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 6 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml, al menos 25 µg/ml, al menos 50 µg/ml, al menos 100 µg/ml, al menos 125 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 175 µg/ml, al menos 200 µg/ml, al menos 225 µg/ml, al menos 250 µg/ml, al menos 275 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 325 µg/ml, al menos 350 µg/ml, al menos 375 µg/ml o al menos 400 µg/ml en un sujeto. Alternativamente, la dosificación de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la descripción puede lograr un título sérico de al menos 0,1 µg/ml, al menos 0,5 µg/ml, al menos 1 µg/ml, al menos 2 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 6 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml, al menos 25 µg/ml, al menos 50 µg/ml, al menos 100 µg/ml, al menos 125 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 175 µg/ml, al menos 200 µg/ml, al menos 225 µg/ml, al menos 250 µg/ml, al menos 275 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 325 µg/ml, al menos 350 µg/ml, al menos 375 µg/ml o al menos 400 µg/ml en el sujeto.

Las dosis de anticuerpos o fragmentos de los mismos de la descripción se pueden repetir y las administraciones pueden estar separadas por al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses o al menos 6 meses.

Una cantidad eficaz para un paciente particular puede variar dependiendo de factores tales como la afección que se va a tratar, la salud general del paciente, el método, la vía y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios (véase, por ejemplo, Maynard, et al. (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., Londres, Reino Unido).

La vía de administración puede ser, por ejemplo, mediante una aplicación tópica o cutánea, inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intracerebroespinal, intralesional o mediante sistemas de liberación sostenida o un implante (véase, por ejemplo, Sidman et al. (1983) Biopolymers 22:547-556; Langer, et al. (1981) J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277; Langer (1982) Chem. Tech. 12:98-105; Epstein, et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692; Hwang, et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034; los documentos de Patente de EE.UU. nº 6.350.466 y 6.316.024). Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Además, la administración pulmonar también se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y una formulación con un agente para un aerosol. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de EE.UU. nº 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y los documentos de publicación PCT WO1992/19244, WO1997/32572, WO1997/44013, WO1998/31346 y WO1999/66903.

Una composición de la presente descripción también se puede administrar a través de una o varias vías de administración utilizando uno o varios entre una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la materia, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración seleccionadas para anticuerpos o fragmentos de los mismos de la descripción, incluyen la vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenterales, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La administración parenteral puede representar modos de administración distintos a la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, la vía intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, inyección e infusión epidural e intraesternal. Alternativamente, una composición de la descripción se puede administrar a través de una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Terapias adicionales (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos), que se pueden administrar en combinación con los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la descripción, se pueden administrar separadas menos de 5 minutos, separadas menos de 30 minutos, separadas menos de 1 hora, separadas aproximadamente 1 hora, separadas de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas, separadas de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, separadas de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas, separadas de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas, separadas de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas, separadas de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas, separadas de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas, separadas de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas, separadas de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas, separadas de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas, separadas de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas, separadas de aproximadamente 12 horas a 18 horas, separadas de 18 horas a 24 horas, separadas de 24 horas a 36 horas, separadas de 36 horas a 48 horas, separadas de 48 horas a 52 horas, separadas de 52 horas a 60 horas, separadas de 60 horas a 72 horas, separadas de 72 horas a 84 horas, separadas de 84 horas a 90 horas, o separadas de 96 horas a 120 horas de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la descripción. Las dos o más terapias se pueden administrar dentro de una misma visita del paciente.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la descripción y las otras terapias se pueden administrar de forma cíclica. La terapia cíclica implica la administración de una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo, seguido de la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo, opcionalmente seguido de la administra-

ción de una tercera terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo y así sucesivamente, y repetir esta administración secuencial, es decir, el ciclo con el fin de reducir el desarrollo de una resistencia a una de las terapias, para evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias y/o para mejorar la eficacia de las terapias.

- 5 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la descripción se pueden formular para asegurar una distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la descripción cruzan la BBB (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de preparación de liposomas, véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de EE.UU. nº 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o varios restos que se transportan selectivamente en células u órganos específicos, mejorando de este modo la administración dirigida del fármaco (véase, por ejemplo, V. V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Restos de direccionamiento a modo de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, el documento de Patente de EE.UU. nº 5.416.016 de Low et al.); manósidos (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P. G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor de la proteína A tensioactiva (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p 120 (Schreier et al (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véase también K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J. J. Killian; I. J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

La descripción proporciona protocolos para la administración de una composición farmacéutica que comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos de la descripción, solos o en combinación con otras terapias, a un sujeto que lo requiere. Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación de la presente descripción, se pueden administrar de forma concomitante o secuencial a un sujeto. La terapia (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación de la presente descripción, también se puede administrar de forma cíclica. La terapia cíclica implica la administración de una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo, seguido por la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo y repetir esa administración secuencial, es decir, el ciclo con el fin de reducir el desarrollo de una resistencia a una de las terapias (por ejemplo, los agentes), para evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias (por ejemplo, los agentes) y/o para mejorar la eficacia de las terapias.

Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación de la descripción se pueden administrar a un sujeto de forma concurrente. El término "concurrentemente" no está limitado a la administración de terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) a exactamente el mismo tiempo, sino más bien se entiende que una composición farmacéutica que comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos de la descripción, se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de tal manera que los anticuerpos de la descripción pueden actuar junto con la otra u otras terapias para proporcionar un mayor beneficio que si se administran de otro modo. Por ejemplo, cada terapia se puede administrar a un sujeto al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden, en diferentes momentos temporales; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, se deben administrar suficientemente próximas en el tiempo con el fin de proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada terapia se puede administrar a un sujeto por separado, en cualquier forma apropiada y a través de cualquier vía adecuada. En diversas realizaciones, las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se administran a un sujeto separadas menos de 15 minutos, menos de 30 minutos, menos de 1 hora, separadas aproximadamente 1 hora, separadas desde aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, separadas desde aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, separadas desde aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas, separadas desde aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas, separadas desde aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas, separadas desde aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas, separadas desde aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas, separadas desde aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas, separadas desde aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas, separadas desde aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas, separadas desde aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas, separadas de 24 horas, separadas 48 horas, separadas 72 horas, o separadas 1 semana. En otras realizaciones, dos o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se administran dentro de una misma visita del paciente.

Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación se pueden administrar a un sujeto en la misma composición farmacéutica. Alternativamente, los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación se pueden administrar concurrentemente a un sujeto en composiciones farmacéuticas distintas. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar a un sujeto a través de la misma vía de administración o vías diferentes.

La descripción que se ha descrito totalmente, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y reivindicaciones, que son ilustrativos y no están destinados a ser limitantes de forma adicional.

Tabla 1: Secuencias de anticuerpos

| NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA | Región del Ac | Secuencia |
|------------------------------------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (A) MOR014093 | | |
| SEQ ID NO:1 (Kabat) | HCDR1 | DYYMD |
| SEQ ID NO:2 (Kabat) | HCDR2 | AISSSGSTTYADSVKG |
| SEQ ID NO:3 (Kabat) | HCDR3 | GNLFGSTYVMGFDH |
| SEQ ID NO:4 (Kabat) | LCDR1 | SGDSIGSTHVS |
| SEQ ID NO:5 (Kabat) | LCDR2 | RKSNRPS |
| SEQ ID NO:6 (Kabat) | LCDR3 | SSWDESEVV |
| SEQ ID NO:7 (Chothia) | HCDR1 | GFTFSDY |
| SEQ ID NO:8 (Chothia) | HCDR2 | SSSGST |
| SEQ ID NO:9 (Chothia) | HCDR3 | GNLFGSTYVMGFDH |
| SEQ ID NO:10 (Chothia) | LCDR1 | SGDSIGSTHVS |
| SEQ ID NO:11 (Chothia) | LCDR2 | RKSNRPS |
| SEQ ID NO:12 (Chothia) | LCDR3 | SSWDESEVV |
| SEQ ID NO:13 | VL | DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDSIGSTHVSWYQQKPGQAPVLIYRKSNRPSGIPE RFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSSWDESEVVFSGGKLTVLGQ |
| SEQ ID NO:14 | VH | QVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMDWVRQAPGKGLEWVSAISSGS TTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNLFGSTYVMGFDH WGQGLTVVSS |
| SEQ ID NO:15 | DNA VL | GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGTGAGCCCGGGCCAGACCGCG AGCATTACCTGTAGCGGCGATTCCATCGGTTCTACTCATGTTTCTTGGTACCAGCA GAAACCGGGCCAGGCGCGGTGCTGGTGATCTACCGTAAATCTAACCGTCCGAG CGGCATCCCGGAACGTTTATAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACC ATTAGCGGCACCCAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCTCTTCTTGGGACT CTGAATCTGTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCTAGGTCAG |
| SEQ ID NO:16 | DNA VH | |

ES 2 711 999 T3

| NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA | Región del Ac | Secuencia |
|------------------------------------------|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCGGGTGGCAGCCT GCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGATTCACCTTTTCTGACTACTACATGGACTGG GTGCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCGCTATCTCTTCTTG GTTCTACTACCTACTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATCAGCCGCGA TAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACG GCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTAACCTGTTCCGTTCTACTTACGTTATGGGTTT CGATCATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTACTGTTAGCTCA |
| (B) MOR014116 | | |
| SEQ ID NO:17 (Kabat) | HCDR1 | DYAIS |
| SEQ ID NO:18 (Kabat) | HCDR2 | LIPLFGTANYAQKFQG |
| SEQ ID NO:19 (Kabat) | HCDR3 | SPAYQLVTPYYYYVSDWFDV |
| SEQ ID NO:20 (Kabat) | LCDR1 | SGSSSNIGSNYVS |
| SEQ ID NO:21 (Kabat) | LCDR2 | DNSERPS |
| SEQ ID NO:22 (Kabat) | LCDR3 | QSWDASPWSYV |
| SEQ ID NO:23 (Chothia) | HCDR1 | GGTFSDY |
| SEQ ID NO:24 (Chothia) | HCDR2 | IPLFGT |
| SEQ ID NO:25 (Chothia) | HCDR3 | SPAYQLVTPYYYYVSDWFDV |
| SEQ ID NO:26 (Chothia) | LCDR1 | SGSSSNIGSNYVS |
| SEQ ID NO:27 (Chothia) | LCDR2 | DNSERPS |
| SEQ ID NO:28 (Chothia) | LCDR3 | QSWDASPWSYV |
| SEQ ID NO:29 | VL | DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQLPGTAPKLLIYDNERPSGV PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSWDASPWSYVFGGGTKLTVLGG |
| SEQ ID NO:30 | VH | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSDYAIWVRQAPGQGLEWMGLIPLFG TANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSPAYQLVTPYYYYVSDW FDVWGGQGLTVTVSS |
| SEQ ID NO:31 | DNA VL | |

ES 2 711 999 T3

| NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA | Región del Ac | Secuencia |
|------------------------------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGTGCACCGGGCCAGCGCGTG ACCATTAGCTGTAGCGGCAGCAGCAACATTGGTTCTAACTACGTGTCTTGGT ACCAGCAGCTGCCGGGCACGGCGCCGAAACTGCTGATCTACGACAACCTGAAC GCCCCAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCCA GCCTGGCGATTACCGCCTGCAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGT CTTGGGACGCTTCTCCGTGGTCTTACGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGT CCTAGGTCAG |
| SEQ ID NO:32 | DNA VH | CAGGTGCAATTGGTGAGAGCGGTGCCGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGT GAAAGTTAGCTGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTTCTGACTACGCTATCTCTTGG GTGCGCCAGGCCCCGGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCTGATCATCCCGCTG TTCGGCACTGCGAACTACGCCAGAAATTTACGGGCCGGGTGACCATTACCGCCG ATGAAAGCACCAGCACCCCTATATGGAAGTGGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATA CGGCCGTGATTATTGCGCGCGTTCTCCGGCTTACCAGCTGGTTACTCCGTACTAC TACGTTTCTGACTGGTTCGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCT CA |
| (C) MOR014138 | | |
| SEQ ID NO:33 (Kabat) | HCDR1 | SYAIH |
| SEQ ID NO:34 (Kabat) | HCDR2 | RIIPHFGTAYYAQKFQG |
| SEQ ID NO:35 (Kabat) | HCDR3 | VQVYMSVLGWGYENYMDV |
| SEQ ID NO:36 (Kabat) | LCDR1 | RASQSVSAFQLG |
| SEQ ID NO:37 (Kabat) | LCDR2 | GASTRAT |
| SEQ ID NO:38 (Kabat) | LCDR3 | QQYIQYPYT |
| SEQ ID NO:39 (Chothia) | HCDR1 | GGTFTSY |
| SEQ ID NO:40 (Chothia) | HCDR2 | IPHFGT |
| SEQ ID NO:41 (Chothia) | HCDR3 | VQVYMSVLGWGYENYM DV |
| SEQ ID NO:42 (Chothia) | LCDR1 | RASQSVSAFQLG |
| SEQ ID NO:43 (Chothia) | LCDR2 | GASTRAT |
| SEQ ID NO:44 (Chothia) | LCDR3 | QQYIQYPYT |
| SEQ ID NO:45 | VL | DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSAFQLGWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI PARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQYIQYPYTFGQGTKEIKRT |

| NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA | Región del Ac | Secuencia |
|------------------------------------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO:46 | VH | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFTSYAIHWVRQAPGQGLEWMGRIIPHFG TAYYAQKFAQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVQVYMSVLGWGYENY MDVWVGQGLVTVSS |
| SEQ ID NO:47 | ADN VL | GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCCTGAGCCTGAGCCCGGGTGAACGT GCCACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTCTGTTTCTGCTTCCAGCTGGGTTGGT ACCAGCAGAAACCGGGCCAGGCCCGCGTCTATTAATCTACGGTGCTTCTACTCG TGCGACCGGCAATCCGGCGGTTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCACC CTGACCATTAGCAGCCTGGAACCGGAAGACTTTGCGGTGTATTATTGCCAGCAGT ACATCCAGTACCCGTACACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAACGTAC G |
| SEQ ID NO:48 | ADN VH | CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGT GAAAGTTAGCTGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTACTTCTTACGCTATCCATTGG GTGCGCCAGGCCCGGGCCAGGGCCTCGAGTGATGGGCCGTATCATCCCGCAT TTCGGCACTGCGTACTACGCCAGAAATTTAGGGCCGGGTGACCATTACCGCCG ATGAAAGCACCAGCACCGCTATATGGAAGTGGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATA CGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGTTCAGGTTTACATGTCTGTTCTGGGTTGGGG TTACGAAAACACTACATGGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCCTGGTGACTGTTAGCTCA |

Materiales y Métodos

La descripción que se ha descrito totalmente, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y reivindicaciones, que son ilustrativos y no están destinados a ser limitantes de forma adicional.

5 **1: Uso de un banco de anticuerpos de presentación en fagos para la identificación de anticuerpos**

Para la selección de anticuerpos que reconocen específicamente de forma cruzada MIF y D-DT, se empleó un banco de presentación de fagos comercialmente disponible, el banco HuCAL PLATINUM[®] de MorphoSys. Los anticuerpos terapéuticos que se unen de forma específica cruzada a MIF y D-DT, se generaron mediante la identificación y la selección de clones que tenían afinidades de unión hacia ambas proteínas. Dicho banco de anticuerpos se basa en el concepto HuCAL[®] (Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86) y emplea la tecnología CysDisplay[™] para la presentación del Fab sobre la superficie del fago (documento WO2001/05950 de Lohning).

(A) Selección por adsorción

Para identificar los anticuerpos que tenían reacción cruzada con MIF/D-DDT, se llevaron a cabo diversas estrategias de selección por adsorción durante el proyecto. Para ello, MIF humano purificado recombinante y D-DT humana se utilizaron como antígenos para la selección. MIF recombinante se refiere a MIF tal y como se define en el número de registro: CAG30406.1 D-DT se refiere a D-DT como se define en el número de registro NP_001346. Ambos antígenos se han utilizado como antígenos sin marcar, marcados con HIS o biotinilados para el proceso de selección y de cribado.

Todas las estrategias de selección por adsorción y los antígenos descritos se emplearon para el proceso de selección de anticuerpos. Cada estrategia de selección por adsorción comprendía al menos 3 rondas individuales de selección por adsorción y contenía antígenos únicos, concentraciones de antígeno y lavado riguroso. Además todas las estrategias de selección por adsorción y los antígenos descritos se combinaron y se mezclaron y se utilizaron como diversas estrategias de selección por adsorción diferenciales.

i) Selección por adsorción en fase sólida contra MIF y D-DT

Para las selecciones por adsorción en fase sólida, se incubaron fagos bloqueados con proteína de MIF recombinante o D-DT que recubría una superficie sólida (por ejemplo, una placa Maxisorp) o MIF biotinilado recombinante o D-DT inmovilizada sobre una placa de neutravidina Reacti-bind (Thermo Scientific). Los fagos inespecíficos se eliminaron mediante lavado a fondo empleando PBST y PBS. Se realizaron al menos 3 rondas de selección por adsorción y los antígenos MIF o D-DT se utilizaron o bien de forma consistente a lo largo de las 3 rondas de selección por adsorción, o de una manera alterna.

Después de cada ronda de selección por adsorción, los fagos restantes se eluyeron y los fagos eluidos se utilizaron inmediatamente para la infección de bacterias *E. coli* TG1. Después de rescatar los fagos usando un fago auxiliar, el fago policlonal amplificado resultante se valoró de nuevo y se utilizó en etapas de selección consecutivas.

Para cada selección por adsorción individual, la concentración de antígeno y el lavado riguroso se ajustaron de acuerdo con los títulos resultantes determinados después de cada ronda de selección por adsorción individual para dirigir la selección de clones que eran portadores de una afinidad elevada hacia al antígeno respectivo.

(ii) Selección por adsorción contra MIF con captura con anticuerpos policlonales anti-MIF

Adicionalmente, se utilizó un antisuero específico de MIF policlonal para presentar la proteína MIF purificada sobre una superficie sólida al banco de fagos para los fines de selección por adsorción. De esta manera con el anticuerpo específico de MIF policlonal se recubrió una placa Maxisorp durante una noche. Después de lavar con PBS y bloquear con 5% de leche/PBS, la proteína MIF purificada se dispuso sobre la placa y se incubó adicionalmente durante 1 hora. De este modo MIF fue capturado por los anticuerpos específicos de MIF que recubrían la placa y se presentó a los fagos en diversas orientaciones. Se realizaron al menos 3 rondas de selección por adsorción de acuerdo con la descripción de selección por adsorción en fase sólida contra MIF y D-DT.

(iii) Selección por adsorción en semi-solución contra MIF y D-DT

Para las selecciones por adsorción en semi-solución, MIF humano recombinante se ligó a Dynabeads M-270 con ácido carboxílico.

Los fagos aclarados previamente, se incubaron durante 1-2 horas con perlas recubiertas con MIF en un rotador. Las perlas se recogieron después utilizando un separador magnético y se lavaron con PBST y PBS. Los fagos unidos a las perlas eluyeron durante 7 min a TA en 300 μ L de Tris-HCl 10 mM/DTT 20 mM, pH 8,0. Los fagos eluidos se utilizaron inmediatamente para la infección de bacterias *E. coli* TG1. La determinación de la infección con los fagos, la amplificación, la producción de fagos y el título resultante se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente en la selección por adsorción en fase sólida contra MIF y D-DT.

(iv) Selección por adsorción en fase de solución frente a MIF biotinilado y D-DT

Cada ronda de selección por adsorción en fase de solución se realizó utilizando diversas proteínas MIF recombinantes biotiniladas o D-DT recombinantes biotiniladas. Las proteínas se biotinilaron usando el kit de biotinilación de proteínas de Amersham ECL™ (GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante. Perlas magnéticas ligadas a estreptavidina (Dynabeads, Dynal) y fagos-anticuerpos HuCAL PLATINUM® se lavaron y se bloquearon con Chemiblocker (Chemicon). El material sobrenadante de los fagos se transfirió a un tubo de reacción de 2 ml bloqueado y se añadió el antígeno biotinilado apropiado y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente en un rotador. Se añadieron 100 μ L de perlas magnéticas de estreptavidina bloqueadas a cada grupo de selección por adsorción y la mezcla se incubó durante 20 minutos en un rotador a temperatura ambiente. Las perlas se recogieron con un separador de partículas magnéticas (Dynal) durante aproximadamente 3 minutos y la solución se desechó. Los fagos que se unían al fondo se eliminaron mediante un lavado a fondo usando PBST. Los fagos unidos se eluyeron de las perlas Dynabeads mediante la adición de 200 μ L de DTT 20 mM/Tris-HCl 10 mM (pH 8) a cada tubo e incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las Dynabeads se retiraron usando el separador de partículas magnéticas y el material sobrenadante se sometió a *E. coli* TG-1. Los fagos adicionales se recogieron de las Dynabeads mezclando una vez con 200 μ L de PBS, recogiendo el material sobrenadante y añadiéndolo a *E. coli* TG-1 como se ha descrito anteriormente. La infección con los fagos se realizó de una manera idéntica a la descrita en la selección por adsorción en fase sólida.

(v) Selección por adsorción en fase de solución contra a MIF-His no biotinilado

Como la biotinilación podría tener una influencia negativa sobre la estructura tridimensional natural de MIF, se incluyó una estrategia de selección por adsorción en fase de solución alternativa de forma adicional. El proceso de selección por adsorción era, en general, como se ha descrito anteriormente, pero para permitir el uso de moléculas de MIF no biotiniladas, se capturó el marcador His del complejo fago-MIF-His a través de perlas magnéticas Ni-NTA.

(b) Subclonación y microexpresión de fragmentos Fab seleccionados

Para facilitar una rápida expresión de Fab soluble, los insertos que codificaban Fab del fago seleccionado con Hu-

CAL PLATINUM[®] se subclonaron a través de sitios de corte con enzimas de restricción en vectores de expresión específicos. Después de la transformación de bacterias TG1-F usando los vectores que codificaban Fab, se realizó la expresión de clon único y la preparación de extractos periplásmicos que contenían fragmentos de HuCAL[®]-Fabs. Se emplearon extractos periplásmicos que contenían Fab para las etapas de escrutinio iniciales.

- 5 Para las etapas de escrutinio secundarias se emplearon Fabs purificados. La expresión de los fragmentos Fab en células TG-1 se realizó en cultivos en matraz con agitación, utilizando 500 ml de medio 2x YT complementado con 34 µg/ml de cloranfenicol. Los cultivos se agitaron a 30°C hasta que la DO_{600 nm} alcanzó 0,5. La expresión se indujo mediante la adición de IPTG 0,75 mM durante 20 h a 30°C. Las células se rompieron usando lisozima y fragmentos Fab aislados mediante cromatografía con Ni-NTA (Bio-Rad, Alemania). Las concentraciones de proteína se determinaron por espectrofotometría UV. La pureza de los fragmentos Fab se analizó en estado desnaturalizado reducido, usando SDS-PAGE y en estado natural mediante HP-SEC.

2: Conversión a IgG

- 15 Con el fin de expresar IgGs de longitud completa, fragmentos del dominio variable de las cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) se subclonaron desde vectores de expresión de Fab en vectores apropiados pMORPH[®]_hlg para IgG2 humana, IgG4 humana, IgG4_Pro humana e IgG1f LALA humana.

3: Expresión transitoria y purificación de IgG humana

- 20 Las células HKB11 eucariotas se transfectaron con cantidades iguales de vector de expresión de la cadena pesada y ligera de IgG (pMORPH2) o vector de expresión de ADN que codificaba las cadenas pesadas y ligeras de las IgGs (pMORPH4). El material sobrenadante del cultivo celular se recogió generalmente 3 a 7 días después de la transfección. Después de una filtración estéril, la solución se sometió a cromatografía por afinidad de proteína A convencional (MabSelect SURE, GE Healthcare). Si no se indica de otro modo, el intercambio de tampón se realizó o bien a 1x PBS de Dulbecco (pH 7,2, Invitrogen) o a tampón citrato (citrato 100 mM, NaCl 150 mM, pH 5,0) y las muestras se filtraron (tamaño de poro 0,2 µm) de forma estéril. Las concentraciones de proteína se determinaron por espectrofotometría UV. La pureza de IgG se analizó en condiciones desnaturalizantes, reductoras y no reductoras en SDS-PAGE o mediante el uso de Agilent BioAnalyzer y en estado natural mediante HP-SEC.

4: Escrutinio

(i) Escrutinio con ELISA de MIF y D-DT

- 30 En total, se realizaron más de 50 enfoques de selección por adsorción individuales que terminaron en más de 50 grupos de fagos que se habían escrutado para confirmar la especificidad cruzada con MIF y D-DT y para identificar clones de anticuerpos únicos.

El escrutinio primario se llevó a cabo mediante ELISA y MIF o D-DT humano recombinante biotinilado con una concentración de 1 µg/ml que recubría placas de neutravidina Reacti-bind (Thermo Scientific) durante 1,5 h a temperatura ambiente. Las placas de neutravidina Reacti-bind se habían tratado previamente con PBS/5% de leche desnatada en polvo.

- 35 Después de lavar con PBST, extractos periplásmicos que contenían Fab o IgGs purificadas se aplicaron y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente.

Después de un lavado posterior, Fab o IgG unidas de forma específica al antígeno se detectaron a través de anticuerpo secundario específico del fragmento Fc-γ de IgG anti-humana de cabra con AP (Fa Jackson ImmunoResearch) y la aplicación posterior de Attophos (Fa ROCHE).

40 Resultados:

Después del escrutinio primario se identificaron ~3000 aciertos a partir de ~27000 clones analizados en total, que se unían específicamente a MIF o D-DT. De esos 3000 aciertos primarios, 740 fueron sometidos a un análisis de secuencia y 410 clones se pudieron identificar por ser únicos. Después de un escrutinio más intenso de esos 410 clones, solo 3 probaron que tenían reactividad cruzada con MIF y D-DT en formato Fab e IgG.

45 Ejemplos de trabajo:

Ejemplo 1: Unión específica de anticuerpos a MIF recombinante y D-DT mediante ELISA

- 50 La reactividad cruzada de los anticuerpos con MIF humano y D-DT humana, se determinó por ELISA. MIF o D-DT humanos recombinantes biotinilados con una concentración de 1 µg/ml se aplicaron para recubrir placas negras Reacti-bind de 384 pocillos recubiertas con neutravidina (Thermo Scientific) durante 1,5 h a temperatura ambiente. Las placas con neutravidina Reacti-bind se habían tratado previamente con PBS/5% de leche desnatada en polvo. Después de lavar con PBST, las IgGs purificadas se aplicaron en una concentración de 6,25 nM sobre una placa recubierta con MIF o D-DT, respectivamente y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de un lavado posterior, se detectó la IgG unida específicamente a antígeno a través de un anticuerpo secundario espe-

cífico del fragmento Fc- γ de IgG anti-humana de cabra con AP (Fa Jackson ImmunoResearch) y la aplicación posterior de Attophos (Fa ROCHE) de acuerdo con el manual del fabricante. La intensidad de la fluorescencia se midió a través de un lector Tecan Reader GeniosPro y la intensidad de la fluorescencia de los clones individuales se comparó con el anticuerpo de control.

5 **Resultados:**

Después de una amplia caracterización, 3 clones individuales se identificaron con éxito por tener reacción cruzada con MIF humano y D-DT humana. Mostraron que se unían con reactividad cruzada con una intensidad de señal al menos 5 veces mayor que en comparación con el control negativo para ambos antígenos (FIGURA 2). En particular, se sometieron a ensayo anticuerpos monoclonales anti-MIF de la técnica anterior, IIID9, Bax69 y Bax94 (véase el documento de publicación PCT WO2009/086920), junto con MAB289 (R&D) y 2A10 (AbD Serotec) en las mismas condiciones, y detectaban solamente MIF humano pero no D-DT y no tenían reactividad cruzada.

Ejemplo 2: Determinación de la CE_{50} de anticuerpos que tienen reacción cruzada con MIF y D-DT mediante ELISA.

Para una caracterización adicional, se determinó la concentración CE_{50} para cada uno de los anticuerpos que tenían reacción cruzada con MIF y D-DT, basándose en la configuración de ELISA de acuerdo con el Ejemplo 1. Las concentraciones de cada uno de los anticuerpos individuales que se habían valorado y 8 concentraciones distintas desde 0 nM a 166 nM, se aplicaron conjuntamente sobre una placa recubierta con MIF y una placa recubierta con D-DT. MIF o D-DT humano recombinante biotinilado con una concentración de 1 μ g/ml se aplicaron para recubrir placas negras Reacti-bind de 384 pocillos recubiertas con neutravidina (Thermo Scientific) durante 1,5 h a temperatura ambiente. Después de lavar con PBST, las IgGs purificadas se añadieron a la placa recubierta con MIF o D-DT, respectivamente y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de un lavado posterior, se detectó la IgG unida específicamente a antígeno a través de un anticuerpo secundario específico del fragmento Fc- γ de IgG anti-humana de cabra con AP (Fa Jackson ImmunoResearch) y la aplicación posterior de Attophos (Fa ROCHE) de acuerdo con el manual del fabricante. La intensidad de la fluorescencia se midió a través de un lector Tecan Reader GeniosPro y la intensidad de la fluorescencia de los clones individuales se representó gráficamente en una curva típica de valoración de anticuerpo. Los valores de CE_{50} se determinaron con el programa GraphPad Prism empleando un análisis de regresión no lineal.

Resultados:

Para los 3 anticuerpos que tenían reacción cruzada con MIF/D-DT (A=MOR014093; B=MOR014116; C=MOR014138), la concentración CE_{50} se pudo determinar y variaba de 0,3 nM a 22 nM (FIGURA 3 y FIGURA 4).

Tabla 2: Concentraciones CE_{50} de MOR014093 (A), MOR014116 (B) y MOR014138 (C)

| Clon | CE_{50} [nM] | |
|------|----------------|-------|
| | MIF | D-DT |
| A | 1,138 | 21,24 |
| B | 0,486 | 8,473 |
| C | 0,3597 | 2,287 |

Ejemplo 3: Inhibición de la unión de MIF a CD74 a través de anticuerpos que tienen reacción cruzada con MIF y D-DT

La capacidad de los anticuerpos que tenían reacción cruzada con MIF y D-DT seleccionados para inhibir la unión de MIF al receptor CD74, se analizó mediante un ensayo de competencia *in vitro* empleando el ectodominio de CD74 inmovilizado (sCD74⁷³⁻²³²). Pocillos individuales de una placa de 384 pocillos se recubrieron durante una noche a 4°C con 26 μ g/ml de sCD74⁷³⁻²³², se lavaron y se bloquearon durante 2 h con PBS/BSA al 5%. MIF biotinilado (5 μ g/ml) en combinación con anticuerpo con reacción cruzada anti-MIF/D-DT o de control (50 μ g/ml) se aplicaron conjuntamente por duplicado y se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. El MIF unido, biotinilado se determinó mediante la adición de fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina durante 1 h, seguido por lavado y detección con Attophos. La intensidad de la fluorescencia se midió a través de un lector Tecan Read GeniosPro. Los valores se representaron gráficamente como porcentaje de la intensidad de la fluorescencia en relación con pocillos que contenían MIF humano biotinilado con anticuerpo de control.

En conjunto, los anticuerpos que tenían reacción cruzada con MIF/D-DT dados a conocer en la presente solicitud mostraban una funcionalidad diferente en términos de inhibición de la unión de MIF a CD74. Aunque un anticuerpo (MOR014093) se caracterizaba por inhibir casi el 80% de la interacción entre MIF/CD74, dos anticuerpos (MOR014116 y MOR014138) mostraron una inhibición de moderada a ausente de la unión de MIF a CD74 (FIGURA 5).

Ejemplo 4: Inhibición de la liberación de IL-6 e IL-1 β a través de anticuerpos que tienen reacción cruzada con MIF/D-DT

Para caracterizar adicionalmente los anticuerpos que tienen reacción cruzada con MIF/D-DT, se analizó la liberación de IL-6 e IL-1 β a partir de monocitos en presencia de los 3 anticuerpos identificados con unión específica cruzada.

Para ello se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) a partir de sangre de un donante, según el protocolo convencional, utilizando Biocoll (Biochrome). La separación de los monocitos de las PBMCs se realizó utilizando el "kit II para aislar monocitos humanos" de Miltenyi Biotec, que es un sistema de etiquetado magnético indirecto. La separación magnética se realizó en un separador Vario MACS™ (clasificación de células activada de forma magnética; Miltenyi Biotec) con columnas LS de acuerdo con el manual instructor.

Monocitos aislados ($-0,2 \times 10^6$ células/ml; en medio RPMI que contenía FCS al 2%) se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se incubaron con anticuerpos específicos que tenían reacción cruzada con MIF y D-DT que tenían una concentración final de 100 μ g/ml por pocillo, durante 1 hora a 37°C, 5% de CO₂. Posteriormente, los monocitos tratados con anticuerpo se estimularon con 0,1 ng/ml de Escherichia coli (serotipo 0111:B4 O111:B4) LPS (Sigma) y se incubaron durante una noche a 37°C, 5% de CO₂. Se recogió el material sobrenadante y se determinó la concentración respectiva de IL-6 e IL-1 β mediante el sistema CBA Flex Set basado en perlas (BD Biosciences) y se comparó con un anticuerpo no específico utilizado como control negativo.

Después del análisis de acuerdo con la descripción anterior, el anticuerpo MOR014116 (B) retenía de un 20% a 30% de la liberación de IL-6 e IL-1 β inducida después de la exposición a LPS, mientras que el anticuerpo MOR014093 (A) inhibía un 10% de IL-1 β y el anticuerpo MOR014138 (C) no mostraba ningún efecto sobre ambas citocinas proinflamatorias analizadas (FIGURA 6).

Ejemplo 5: Estrategia de selección para la identificación de anticuerpos que tienen reacción cruzada con MIF/D-DT

Para la identificación de anticuerpos que tienen reacción cruzada con MIF/D-DT a partir de un banco de anticuerpos de presentación en fagos, se puede realizar una selección por adsorción en fase de solución usando MIF humano recombinante y D-DT humana recombinante como antígeno, de manera alterna. Mediante el uso de MIF y D-DT de manera alterna a lo largo de un procedimiento de selección por adsorción de tres etapas, solo se identifican las regiones específicas que detectaban restos que se unían a antígeno que se conservan en ambos antígenos.

Ambos antígenos, MIF humano, purificado recombinante y D-DT humana, se utilizan como antígenos biotinilados para el proceso de selección y escrutinio, y su actividad funcional se prueba de antemano a través de un ensayo con tautomerasa como se describe a continuación, para asegurar un plegamiento correcto y una estructura tridimensional fisiológica de ambas proteínas.

Ensayo de la actividad tautomerasa:

MIF, así como D-DT tienen una actividad enzimática (tautomerasa). Esta región enzimática activa se cree que es esencial para su actividad biológica. Se utiliza el sustrato hidroxifenilpirimidina (HPP). Alternativamente, D-Dopacromo se puede utilizar como sustrato para analizar la actividad tautomerasa. Una solución que contiene MIF o D-DT se añade a 3700 μ l de tampón borato y se complementa con PBS hasta un total de 4000 μ l para una concentración final de MIF o de D-DT de 50 nM. De los cuales, 96 μ l se transfieren a una placa de 96 pocillos. Se añaden 4 μ l de 4-HPP 25 mM (Aldrich, n° de Cat. 114286-5G, PM=180,16), pH 6,0, a los pocillos respectivos y la absorbancia se lee inmediatamente a 306 nm durante 30 segundos. Una actividad tautomerasa para ambas proteínas, MIF y D-DT, indica su conformación fisiológica.

Selección por adsorción en fase de solución de MIF-D-DT-MIF alternante usando MIF humano biotinilado y D-DT humana

Perlas magnéticas ligadas a estreptavidina (Dynabeads M-280, c=10 mg/ml, Dynal) y la preparación de fagos de un banco de anticuerpos que se presentan en fagos, se lavan y se bloquean con Chemiblocker (Chemicon). Después, 50 μ l de cada preparación de fago-anticuerpos se mezclan con 450 μ l de PBS y se añaden 500 μ l más de 2xChemiblocker/0,1% de Tween. De forma paralela, 1 ml de perlas magnéticas ligadas a estreptavidina se lavan dos veces con 1 ml de PBS y se resuspenden en 1 ml de 1xChemiblocker. Después del lavado, las perlas se suspenden en 100 μ l de PBS y se añaden 100 μ l de 1xChemiblocker. Ambos, los fagos así como las perlas magnéticas, se incuban durante 1,5 h en un rotador a temperatura ambiente.

Después de bloquear con Chemiblocker, las preparaciones de fago-anticuerpos se incuban con perlas magnéticas

ligadas a estreptavidina durante 30 minutos para preadsorber todos los fagos-anticuerpos que se pegan de forma inespecífica a las perlas magnéticas. Después de la incubación, las perlas se aíslan usando un separador magnético y el material sobrenadante que contiene los fagos se utiliza para la primera ronda de selecciones por adsorción.

1ª ronda de selección por adsorción:

- 5 Para la primera ronda de selección por adsorción los fagos-anticuerpos prebloqueados y preadsorbidos se añaden a MIF humano biotilado 100 nM y se incuban en un rotador durante 1 hora a temperatura ambiente. Después la mezcla de fago-antígeno se transfiere a tubos que contienen las perlas magnéticas prebloqueadas ligadas a estreptavidina y se incuban rotando durante 20 minutos más antes de que las perlas magnéticas se capturen empleando un separador magnético y el material sobrenadante se retire cuidadosamente de las perlas y se descarte. Posteriormente, las perlas restantes se lavan 5x con 500 µl de PBST sin incubación, seguido de 2 etapas de lavado con PBST y 5 minutos de incubación y rotación y 3 etapas de lavado con PBS sin incubación.

Elución de fagos, infección con fagos y rescate de fagos:

- 15 Después de la última etapa de lavado, las perlas magnéticas se vuelven a suspender en 200 µl de DTT 20 mM/Tris-HCl 10 nM (pH 8) de tampón de elución para eluir los fagos del MIF humano capturado por las perlas magnéticas ligadas a estreptavidina. Después, los fagos aislados se transfieren a un tubo Falcon de 50 ml que contiene cultivos precalentados de *E. coli* TG-1⁺ y se incuban durante 45 min a 37°C sin agitación para inducir la infección de las bacterias *E. coli* con los fagos.

- 20 Después de la incubación, las bacterias se aíslan mediante centrifugación durante 5 minutos, a 4000 g y 4°C y el sedimento se resuspende en 600 µl de medio 2xYT y la suspensión bacteriana se extiende en 2 a 4 placas grandes con agar LB/CAM/Glu. Las placas se almacenan durante la noche a 30°C.

- 25 Al día siguiente, las bacterias se raspan de las placas de agar utilizando 5 ml de 2xYT/Cam/Glu/glicerol (15%) y una espátula Drygalski estéril y la suspensión se diluye hasta una DO_{600 nm} de ~0,4-0,5 o se incuba a 37°C hasta que se alcanza una DO_{600 nm} de ~0,4-0,5. Se transfieren 5 ml de la suspensión respectiva a un tubo distinto y se añade una preparación de fago auxiliar VCSM13 (en total 4,5x10¹⁰ fagos/5 ml de cultivo) y se incuba durante 30 minutos a 37°C.

- 30 Después, las *E. coli* infectadas se centrifugan durante 5 minutos a 4000 g y 4°C y el material sobrenadante se retira. El sedimento se resuspende en 20 ml de medio 2xYT/Cam/Kan/IPTG (0,25 nM) para inducir la producción de fagos en ausencia de glucosa. Se incuba la suspensión de *E. coli* durante 18 h a 22°C y se agita (250 rpm) y después se centrifuga durante 10 min a 4000 g y 4°C. El material sobrenadante que contiene los fagos se recoge y se añade a 5 ml de PEG/NaCl (20% de PEG600, NaCl 2,5 M) enfriado con hielo y se incuba durante 30 minutos sobre hielo. Los fagos precipitados se aíslan mediante centrifugación durante 35 min a 22000 g y 4°C y se retira el material sobrenadante. El sedimento de fagos-anticuerpos precipitados se resuspende en 500 µl de PBS y se puede utilizar para la siguiente ronda de selección por adsorción.

2ª ronda de selección por adsorción:

- 35 Para la segunda ronda de selección por adsorción, los fagos aislados resultantes de la primera ronda de selección por adsorción se utilizan y se incuban con D-DT 100 nM biotilada humana en un rotador durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, la mezcla de fago-antígeno se transfiere a tubos que contienen las perlas magnéticas prebloqueadas ligadas a estreptavidina y se incuban rotando durante 20 minutos más, antes de que las perlas magnéticas se capturen usando un separador magnético y el material sobrenadante se retira cuidadosamente. Posteriormente, las perlas restantes se lavan 5x con 500 µl de PBST sin incubación, seguido de 3 etapas de lavado con PBST y 5 minutos de incubación y rotación y 3 etapas de lavado con PBS sin incubación.

Después de la 2ª ronda de selección por adsorción, los fagos específicos de antígeno se eluyen y se aíslan de acuerdo con la descripción anterior.

3ª ronda de selección por adsorción:

- 45 Para la 3ª ronda de selección por adsorción, los fagos resultantes aislados en la 2ª ronda de selección por adsorción, se utilizan y se incuban con MIF 10 nM biotilado humano en un rotador durante 1 hora a temperatura ambiente. Después la mezcla de fago-antígeno se transfiere a tubos que contienen las perlas magnéticas prebloqueadas ligadas a estreptavidina y se incuban rotando durante 20 minutos más antes de que las perlas magnéticas se capturen utilizando un separador magnético y el material sobrenadante se retire cuidadosamente. Posteriormente, las perlas restantes se lavan 5x con 500 µl de PBST sin incubación, seguido de 3 etapas de lavado con PBST y 10 minutos de incubación y rotación y 3 etapas de lavado con PBS sin incubación.

Después de la 3ª ronda de selección por adsorción, los fagos específicos del antígeno se eluyen de acuerdo con la descripción anterior y el fago-DNA se aísla a partir de las bacterias infectadas y el ADN que codifica Fab se subclona en vectores específicos para la expresión de Fab, como se describe en Materiales y Métodos 1(b).

Los Fabs o IgGs aislados después de la conversión, se pueden escrutar y caracterizar de acuerdo con el ensayo descrito en el presente documento.

Ejemplo 6: Ensayo de competencia cruzada basado en ELISA

5 La competencia cruzada de un anticuerpo u otro agente de unión que se une con reactividad cruzada a MIF y D-DT, se puede detectar mediante el uso de un ensayo ELISA de acuerdo con el siguiente procedimiento convencional.

El principio general del ensayo de ELISA implica recubrir con un anticuerpo que tiene reacción cruzada con MIF/D-DT los pocillos de una placa de ELISA. A continuación, se añade una cantidad en exceso de un segundo anticuerpo, que tiene potencialmente una reacción cruzada con MIF/D-DT en solución (es decir, no unido a la placa de ELISA). Posteriormente, se añade entonces una cantidad limitada de MIF-Fc o D-DT-Fc a los pocillos.

10 El anticuerpo que recubre los pocillos y el anticuerpo en solución competirán por la unión al número limitado de moléculas de MIF o de D-DT. A continuación, la placa se lava para eliminar las moléculas de MIF o D-DT que no se han unido al anticuerpo del recubrimiento y para eliminar también el segundo anticuerpo en fase de solución, así como cualquier complejo formado entre el segundo anticuerpo en fase de solución y MIF o D-DT. La cantidad de MIF o D-DT unida se mide entonces usando un reactivo de detección adecuado de MIF o D-DT. Para ello, MIF o D-DT se pueden fusionar con un marcador, como por ejemplo Fc, Flag, etc. que se puede detectar a través de un anticuerpo adecuado, específico del marcador.

15 Un anticuerpo en solución que es competitivo de forma cruzada con el anticuerpo del recubrimiento será capaz de causar una disminución del número de moléculas de MIF o D-DT que el anticuerpo del recubrimiento puede unirse con respecto a la cantidad de moléculas de MIF o de D-DT que el anticuerpo del recubrimiento puede unirse en ausencia del segundo anticuerpo, en fase de solución.

20 Este ensayo se describe con más detalle más adelante para dos anticuerpos denominados Ab-X y Ab-Y. En el caso de que se elija Ab-X para ser el anticuerpo inmovilizado, se recubre sobre los pocillos de la placa de ELISA, después de lo cual las placas se bloquean con una solución de bloqueo adecuada para minimizar la unión no específica de reactivos que se añaden posteriormente. A continuación se añade una cantidad en exceso de Ab-Y a la placa de ELISA de tal manera que los moles de sitios de unión de Ab-Y MIF o D-DT por pocillo, sean al menos 10 veces superiores a los moles de sitios de unión de Ab-X MIF o D-DT que se utilizan, por pocillo, durante el recubrimiento de la placa de ELISA. Se añade MIF o D-DT a continuación, de tal manera que los moles de MIF o D-DT añadidos por pocillo sean al menos 25 veces inferiores a los moles de sitios de unión de Ab-X MIF o D-DT que se utilizan para recubrir cada pocillo. Después de un período de incubación adecuado, la placa de ELISA se lava y se añade un reactivo de detección de MIF o D-DT para medir la cantidad de moléculas de MIF o D-DT unidas específicamente por el anticuerpo que tiene reacción cruzada con MIF/D-DT recubierto (en este caso Ab-X). La señal de fondo para el ensayo se define como la señal obtenida en los pocillos con el anticuerpo recubierto (en este caso Ab-X), el segundo anticuerpo en fase de solución (en este caso Ab-Y), solo tampón (es decir, sin MIF o D-DT) y reactivos de detección de MIF o D-DT. La señal de control positivo para el ensayo se define como la señal obtenida en los pocillos con el anticuerpo recubierto (en este caso Ab-X), solo tampón del segundo anticuerpo en fase de solución (es decir, sin segundo anticuerpo en fase de solución), MIF o D-DT y reactivos de detección de MIF o D-DT. El ensayo ELISA se tiene que ejecutar de tal manera que la señal de control positivo sea al menos 6 veces la señal de fondo.

30 Para evitar cualquier artefacto (por ejemplo, afinidades significativamente diferentes entre Ab-X y Ab-Y hacia MIF o D-DT) como resultado de la elección del anticuerpo que se utiliza como anticuerpo para el recubrimiento y para utilizar como segundo (competidor) anticuerpo, el ensayo de bloqueo cruzado se tiene que ejecutar en dos formatos: 1) el formato 1 es cuando Ab-X es el anticuerpo que recubre la placa de ELISA y Ab-Y es el anticuerpo competidor que está en solución y 2) el formato 2 es cuando Ab-Y es el anticuerpo que recubre la placa de ELISA y Ab-X es el anticuerpo competidor que está en solución.

35 La descripción que se ha descrito totalmente, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y reivindicaciones, que son ilustrativos y no están destinados a ser limitantes de forma adicional.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> MorphoSys AG

<120> Anticuerpos que tienen reactividad cruzada con el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y la D-dopacromo tautomerasa (D-DT)

50 <160> 50

<170> BiSSAP 1.0

ES 2 711 999 T3

<210> 1
 < 211> 5
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

5

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..5
 < 223> /mol_type="protein" /nota="MOR014093_HCDR1 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 1
Asp Tyr Tyr Met Asp
 1 5

10

<210> 2
 < 211> 17
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

15

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..17
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014093_HCDR2 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 2
Ala Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
Gly

20

<210> 3
 < 211> 14
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

25

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..14
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014093_HCDR3 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 3
Gly Asn Leu Phe Gly Ser Thr Tyr Val Met Gly Phe Asp His
 1 5 10

30

<210> 4
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

35

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..11
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014093_LCDR1 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 4
Ser Gly Asp Ser Ile Gly Ser Thr His Val Ser
 1 5 10

40

<210> 5
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

ES 2 711 999 T3

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..7
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014093_LCDR2 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

5

<400> 5
 Arg Lys Ser Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 6
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

10

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..9
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014093_LCDR3 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

15

<400> 6
 Ser Ser Trp Asp Ser Glu Ser Val Val
 1 5

<210> 7
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

20

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..7
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014093_HCDR1 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

25

<400> 7
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 1 5

<210> 8
 < 211> 6
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

30

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..6
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014093_HCDR2 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

35

<400> 8
 Ser Ser Ser Gly Ser Thr
 1 5

<210> 9
 < 211> 14
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

40

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..14
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014093_HCDR3 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

ES 2 711 999 T3

```

<400> 6
Gly Asn Leu Phe Gly Ser Thr Tyr Val Met Gly Phe Asp His
1           5           10

5
<210> 10
< 211> 11
< 212> PRT
< 213> secuencias artificiales

<220>
< 221> FUENTE
< 222> 1..11
10 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014093_LCDR1 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 10
Ser Gly Asp Ser Ile Gly Ser Thr His Val Ser
1           5           10

15
<210> 11
< 211> 7
< 212> PRT
< 213> secuencias artificiales

<220>
< 221> FUENTE
< 222> 1..7
20 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014093_LCDR2 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 11
Arg Lys Ser Asn Arg Pro Ser
1           5

25
<210> 12
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> secuencias artificiales

<220>
< 221> FUENTE
< 222> 1..9
30 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014093_LCDR3 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 12
Ser Ser Trp Asp Ser Glu Ser Val Val
1           5

35
<210> 13
< 211> 108
< 212> PRT
< 213> secuencias artificiales

<220>
< 221> FUENTE
< 222> 1..108
40 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014093_VL" /organismo="secuencias artificiales"

```

ES 2 711 999 T3

¹⁰⁰ 1¹²³
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Ser Thr His Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Arg Lys Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Ser Glu Ser Val Val
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105

5 <210> 14
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> secuencias artificiales

10 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..123
 <223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014093_VH" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 14
 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asn Leu Phe Gly Ser Thr Tyr Val Met Gly Phe Asp His
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15 <210> 15
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..324
 <223> /mol_type="ADN" /nota="MOR014093_ADN VL" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 15
 gatatcgaac tgaccagcc gccgagcgtg agcgtgagcc cgggccagac cgcgagcatt 60
 acctgtagcg gcgattccat cggttctact catgtttctt ggtaccagca gaaaccgggc 120
 caggcgcggg tgctgggtgat ctaccgtaaa tctaaccgtc cgagcggcat cccggaacgt 180
 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgog accctgacca ttagcggcac ccaggcggaa 240
 gacgaagcgg attattactg ctcttcttgg gactctgaat ctggtgtggt tggcggcggc 300
 acgaagttaa ccgtcctagg tcag 324

ES 2 711 999 T3

<210> 16
 < 211> 369
 < 212> ADN
 < 213> secuencias artificiales

5 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..369
 < 223> /mol_type="ADN" /nota="MOR014093 ADN VH" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 16
 cagggtgcaat tgctggaaag cggcgggtggc ctggtgcagc cgggtggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgcgg cgtccggatt caccttttct gactactaca tggactgggt gcccaggcc 120
 ccgggcaaag gtctcgagt ggtttccgct atctcttctt ctggttctac tacctactat 180
 gcggtatagcg tgaaaggccg ctttaccatc agccgcgata attcgaaaa caccctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcggtgtaac 300
 ctgttcgggtt ctacttacgt tatgggtttc gatcattggg gccaaaggcac cctggtgact 360
 10 gtttagctca 369

<210> 17
 < 211> 5
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

15 <220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..5
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014116_HCDR1 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 17
 Asp Tyr Ala Ile Ser
 20 1 5

<210> 18
 < 211> 17
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

25 <220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..17
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014116_HCDR2 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 18
 Leu Ile Ile Pro Leu Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 30 1 5 10 15
 Gly

<210> 19
 < 211> 19
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

35 <220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..19
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014116_HCDR3 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

ES 2 711 999 T3

¹⁰⁰ 10
 Ser Pro Ala Tyr Gln Leu Val Thr Pro Tyr Tyr Tyr Val Ser Asp Trp
 1 5 10 15
 Phe Asp Val

5
 <210> 20
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

10
 <220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..13
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MORO14116_LCDR1 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 20
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

15
 <210> 21
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

20
 <220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..7
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MORO14116_LCDR2 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 21
 Asp Asn Ser Glu Arg Pro Ser
 1 5

25
 <210> 22
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

30
 <220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..11
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MORO14116_LCDR3 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 22
 Gln Ser Trp Asp Ala Ser Pro Trp Ser Tyr Val
 1 5 10

35
 <210> 23
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

40
 <220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..7
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MORO14116_HCDR1 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 23
 Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr
 1 5

ES 2 711 999 T3

<210> 24
< 211> 6
< 212> PRT
< 213> secuencias artificiales

5 <220>
< 221> FUENTE
< 222> 1..6
< 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014116_HCDR2 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 24
Ile Pro Leu Phe Gly Thr
1 5

10 <210> 25
< 211> 19
< 212> PRT
< 213> secuencias artificiales

15 <220>
< 221> FUENTE
< 222> 1..19
< 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014116_HCDR3 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 25
Ser Pro Ala Tyr Gln Leu Val Thr Pro Tyr Tyr Tyr Val Ser Asp Trp
1 5 10 15
Phe Asp Val

20 <210> 26
< 211> 13
< 212> PRT
< 213> secuencias artificiales

25 <220>
< 221> FUENTE
< 222> 1..13
< 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014116_LCDR1 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 26
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Ser
1 5 10

30 <210> 27
< 211> 7
< 212> PRT
< 213> secuencias artificiales

35 <220>
< 221> FUENTE
< 222> 1..7
< 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014116_LCDR2 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 27
Asp Asn Ser Glu Arg Pro Ser
1 5

40 <210> 28
< 211> 11
< 212> PRT
< 213> secuencias artificiales

ES 2 711 999 T3

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..11
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014116_LCDR3 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

5 <400> 28
 Gln Ser Trp Asp Ala Ser Pro Trp Ser Tyr Val
 1 5 10

<210> 29
 < 211> 112
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

10

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..112
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014116 VL" /organismo="secuencias artificiales"

15 <400> 29
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Asn Ser Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Ala Ser Pro
 85 90 95
 Trp Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

<210> 30
 < 211> 128
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

20

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..128
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014116 VH" /organismo="secuencias artificiales"

25 <400> 30
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Leu Ile Ile Pro Leu Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Ala Tyr Gln Leu Val Thr Pro Tyr Tyr Tyr Val Ser
 100 105 110
 Asp Trp Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

ES 2 711 999 T3

<210> 31
 < 211> 336
 < 212> ADN
 < 213> secuencias artificiales

5 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..336
 < 223> /mol_type="ADN" /nota="MOR014116 ADN VL" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 31
 gatatcgtgc tgacccagcc gccgagcgtg agcgggtgcac cgggccagcg cgtgaccatt 60
 agctgtagcg gcagcagcag caacattggt tctaactacg tgtcttggtta ccagcagctg 120
 ccgggcacgg cgccgaaact gctgatctac gacaactctg aacgcccagag cggcgtgccg 180
 gatcgccttta gcggatccaa aagcggcacc agcggccagcc tggcgattac cggcctgcaa 240
 gcagaagacg aagcggatta ttactgccag tcttgggacg cttctccgtg gtcttacgtg 300
 10 tttggcggcg gcacgaagtt aaccgtccta ggtcag 336

<210> 32
 < 211> 384
 < 212> ADN
 < 213> secuencias artificiales

15 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..384
 < 223> /mol_type="ADN" /nota="MOR014116 ADN VH" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 32
 caggtgcaat tgggtgcagag cgggtgccgaa gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaaagtt 60
 agctgcaaag catccggagg gacgttttct gactacgcta tctcttgggt gcgccaggcc 120
 ccgggccagg gcctogagtg gatgggcctg atcatcccgc tgttcggcac tgcgaactac 180
 gccagaaat ttcagggccg ggtgaccatt accgccgatg aaagcaccag caccgcctat 240
 atggaactga gcagcctgcg cagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgttctccg 300
 gcttaccagc tggttactcc gtactactac gtttctgact ggttcgatgt ttggggccaa 360
 20 ggcaccctgg tgactggttag ctca 384

<210> 33
 < 211> 5
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

25 <220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..5
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014138_HCDR1 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 33
 Ser Tyr Ala Ile His
 1 5

30 <210> 34
 < 211> 17

ES 2 711 999 T3

< 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

<220>
 < 221> FUENTE
 5 < 222> 1..17
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014138_HCDR2 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 34
 Arg Ile Ile Pro His Phe Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210> 35
 10 < 211> 18
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

<220>
 < 221> FUENTE
 15 < 222> 1..18
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014138_HCDR3 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 35
 Val Gln Val Tyr Met Ser Val Leu Gly Trp Gly Tyr Glu Asn Tyr Met
 1 5 10 15
 Asp Val

<210> 36
 20 < 211> 12
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

<220>
 < 221> FUENTE
 25 < 222> 1..12
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014138_LCDR1 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 36
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ala Phe Gln Leu Gly
 30 1 5 10

<210> 37
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

<220>
 < 221> FUENTE
 35 < 222> 1..7
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014138_LCDR2 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 37
 Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 40 1 5

<210> 38
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..9
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014138_LCDR3 (Kabat)" /organismo="secuencias artificiales"

5

<400> 38
 Gln Gln Tyr Ile Gln Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 39
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

10

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..7
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014138_HCDR1 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

15

<400> 39
 Gly Gly Thr Phe Thr Ser Tyr
 1 5

<210> 40
 < 211> 6
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

20

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..6
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014138_HCDR2 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

25

<400> 40
 Ile Pro His Phe Gly Thr
 1 5

<210> 41
 < 211> 18
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

30

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..18
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014138_HCDR3 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

35

<400> 41
 Val Gln Val Tyr Met Ser Val Leu Gly Trp Gly Tyr Glu Asn Tyr Met
 1 5 10 15
 Asp Val

<210> 42
 < 211> 12
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

40

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..12
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014138_LCDR1 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ala Phe Gln Leu Gly
 1 5 10

5 <210> 43
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

10 <220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..7
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014138_LCDR2 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 43
 Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5

15 <210> 44
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

20 <220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..9
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014138_LCDR3 (Chotia)" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 44
 Gln Gln Tyr Ile Gln Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

25 <210> 45
 < 211> 110
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

30 <220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..110
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014138 VL" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 45
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ala Phe
 20 25 30
 Gln Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Gln Tyr Pro
 85 90 95
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

35 <210> 46
 < 211> 127
 < 212> PRT
 < 213> secuencias artificiales

ES 2 711 999 T3

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..127
 < 223> /mol_type="proteína" /nota="MOR014138 VH" /organismo="secuencias artificiales"

5 <400> 46
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Ile Pro His Phe Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Gln Val Tyr Met Ser Val Leu Gly Trp Gly Tyr Glu Asn
 100 105 110
 Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 47
 < 211> 330
 < 212> ADN
 < 213> secuencias artificiales

10

<220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..330
 < 223> /mol_type="ADN" /nota="MOR014138 ADN VL" /organismo="secuencias artificiales"

15 <400> 47
 gatatcgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctga gcccggtga acgtgccacc 60
 ctgagctgca gagcgagcca gtctgtttct gctttccagc tgggttggtta ccagcagaaa 120
 cccggccagg ccccgcgtct attaatctac ggtgcttcta ctcgtgacgac cggcattccg 180
 gcgcgtttta gcggcagcgg atccggcacc gatttcaccc tgaccattag cagcctggaa 240
 ccggaagact ttgcggtgta ttattgccag cagtacatcc agtaccgta cacctttggc 300
 cagggcacga aagttgaaat taaacgtacg 330

<210> 48
 < 211> 381
 < 212> ADN
 < 213> secuencias artificiales

20

<220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..381
 < 223> /mol_type="ADN" /nota="MOR014138 ADN VH" /organismo="secuencias artificiales"

ES 2 711 999 T3

```

-100- 49
caggtgcaat tggcgcagag cggcgcgaa gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaaagtt      60
agctgcaaag catccggagg gacgtttact tcttacgcta tccattgggt gcgccaggcc      120
ccgggccagg gcctcgagtg gatgggcogt atcatccgcg atttcggcac tgcgtactac      180
gccagaaat ttcagggccg ggtgaccatt accgcgatg aaagcaccag caccgcctat      240
atggaactga gcagcctgag cagcgaagat acggcogtgt attattgcgc gcgtgttcag      300
gtttacatgt ctgttctggg ttgggggttac gaaaactaca tggatgtttg gggccaaggg      360
accctggtga ctgttagctc a                                             381

```

5 <210> 49
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..115
 <223> /mol_type="proteína" /nota="MIF; N° de registro: CAG30406.1" /organismo="Homo sapiens"

```

<400> 49
Met Pro Met Phe Ile Val Asn Thr Asn Val Pro Arg Ala Ser Val Pro
1          5          10          15
Asp Gly Phe Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Ala Gln Ala Thr Gly
          20          25          30
Lys Pro Pro Gln Tyr Ile Ala Val His Val Val Pro Asp Gln Leu Met
          35          40          45
Ala Phe Gly Gly Ser Ser Glu Pro Cys Ala Leu Cys Ser Leu His Ser
          50          55          60
Ile Gly Lys Ile Gly Gly Ala Gln Asn Arg Ser Tyr Ser Lys Leu Leu
          65          70          75          80
Cys Gly Leu Leu Ala Glu Arg Leu Arg Ile Ser Pro Asp Arg Val Tyr
          85          90          95
Ile Asn Tyr Tyr Asp Met Asn Ala Ala Asn Val Gly Trp Asn Asn Ser
          100          105          110
Thr Phe Ala
          115

```

15 <210> 50
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..118
 <223> /mol_type="proteína" /nota="D-DT; N° de registro NP-001346" /organismo="Homo sapiens"

ES 2 711 999 T3

100-50
 Met Pro Phe Leu Glu Leu Asp Thr Asn Leu Pro Ala Asn Arg Val Pro
 1 5 10 15
 Ala Gly Leu Glu Lys Arg Leu Cys Ala Ala Ala Ala Ser Ile Leu Gly
 20 25 30
 Lys Pro Ala Asp Arg Val Asn Val Thr Val Arg Pro Gly Leu Ala Met
 35 40 45
 Ala Leu Ser Gly Ser Thr Glu Pro Cys Ala Gln Leu Ser Ile Ser Ser
 50 55 60
 Ile Gly Val Val Gly Thr Ala Glu Asp Asn Arg Ser His Ser Ala His
 65 70 75 80
 Phe Phe Glu Phe Leu Thr Lys Glu Leu Ala Leu Gly Gln Asp Arg Ile
 85 90 95
 Leu Ile Arg Phe Phe Pro Leu Glu Ser Trp Gln Ile Gly Lys Ile Gly
 100 105 110
 Thr Val Met Thr Phe Leu
 115

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo del mismo, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo se une con reactividad cruzada a MIF, en donde MIF es un polipéptido codificado por el aminoácido de SEQ ID NO.: 49, y a D-DT, en donde D-DT es un polipéptido codificado por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.: 50.
2. El anticuerpo aislado o el fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo
- (a) es capaz de interferir específicamente en la transducción de señales mediada por MIF y mediada por D-DT,
- (b) es capaz de antagonizar la actividad de MIF y D-DT,
- 10 (c) se une a MIF y a D-DT con una concentración CE_{50} menor de 100 nM, o
- (d) se une a MIF y a D-DT con una constante de disociación (KD) menor de $1 \times 10^7 M^{-1}$.
3. El anticuerpo aislado o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo se une adicionalmente a
- (a) MIF de macaco cangrejero y/o D-DT de macaco cangrejero,
- 15 (b) MIF murino y/o D-DT murina, o
- (c) MIF de rata y/o D-DT de rata.
4. Un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 1, que compite de forma cruzada con un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo del mismo, que comprende
- (a) una VH que comprende SEQ ID NO: 14 y una VL que comprende SEQ ID NO: 13;
- 20 (b) una VH que comprende SEQ ID NO: 30 y una VL que comprende SEQ ID NO: 29; o
- (c) una VH que comprende SEQ ID NO: 46 y una VL que comprende SEQ ID NO: 45.
5. Un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 1, que comprende
- (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1; una CDR2 de SEQ ID NO: 2; una CDR3 de SEQ ID NO: 3; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4; una CDR2 de SEQ ID NO: 5; y una CDR3 de SEQ ID NO: 6;
- 25 (b) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 17; una CDR2 de SEQ ID NO: 18; una CDR3 de SEQ ID NO: 19; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 20; una CDR2 de SEQ ID NO: 21; y una CDR3 de SEQ ID NO: 22; o
- (c) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 33; una CDR2 de SEQ ID NO: 34; una CDR3 de SEQ ID NO: 35; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 36; una CDR2 de SEQ ID NO: 37; y una CDR3 de SEQ ID NO: 38.
- 30 6. Un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 5, que comprende
- (a) una VH que comprende SEQ ID NO: 14 y una VL que comprende SEQ ID NO: 13;
- (b) una VH que comprende SEQ ID NO: 30 y una VL que comprende SEQ ID NO: 29; o
- 35 (c) una VH que comprende SEQ ID NO: 46 y una VL que comprende SEQ ID NO: 45.
7. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo seleccionado a partir de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 40 9. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde el ácido nucleico comprende
- (a) una VH que comprende SEQ ID NO: 16 y una VL que comprende SEQ ID NO: 15;
- (b) una VH que comprende SEQ ID NO: 32 y una VL que comprende SEQ ID NO: 31; o

- (c) una VH que comprende SEQ ID NO: 48 y una VL que comprende SEQ ID NO: 47.
10. Un vector que comprende un ácido nucleico según las reivindicaciones 8-9.
11. Una célula hospedadora aislada que comprende un vector según la reivindicación 10.

FIGURA 1

```

MIF_HUMAN PMFIVNTNVPRASVPDGFELSELTQQLAQATGKPPQYIAVHVVPDQLMAF
D-DT_HUMAN PFLELDTNLPANRVPAGLEKRLCAAAASILGKPADRVNVTVRPGLAMAL
*:: :***:* ** *: ..* * . ***.: : * * * . ** :

MIF_HUMAN GGSSEPCALCSLHSIGKIGGAQ-NRSYKLLCGLLAERLRISPDRVYINY
D-DT_HUMAN SGSTEPCAQLSISISIGVVGTAEDNRSHSAHFFEFLLKELALGQDRILTRF
.**.**** * : *** :* * : ***.* : :*:. * .. ** : *.:

MIF_HUMAN YDMNAANVGWNN--STFA
D-DT_HUMAN FPLESWQIGKIGTVMIFL
: : : : : * . **

```

FIGURA 2

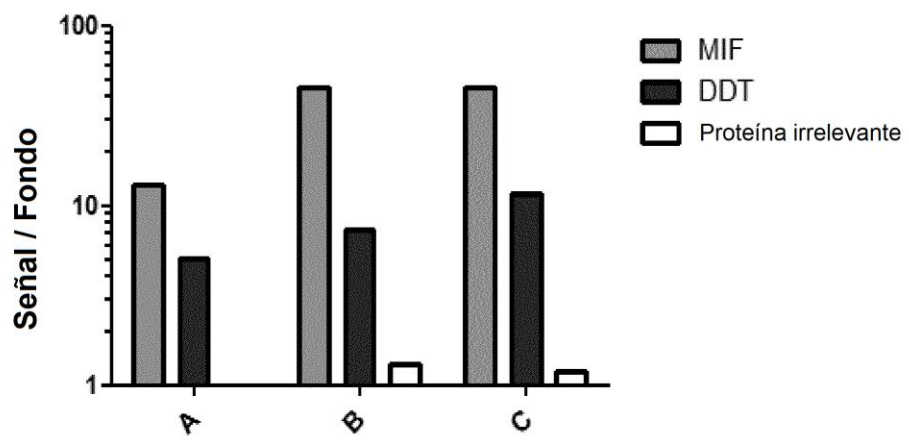


FIGURA 3

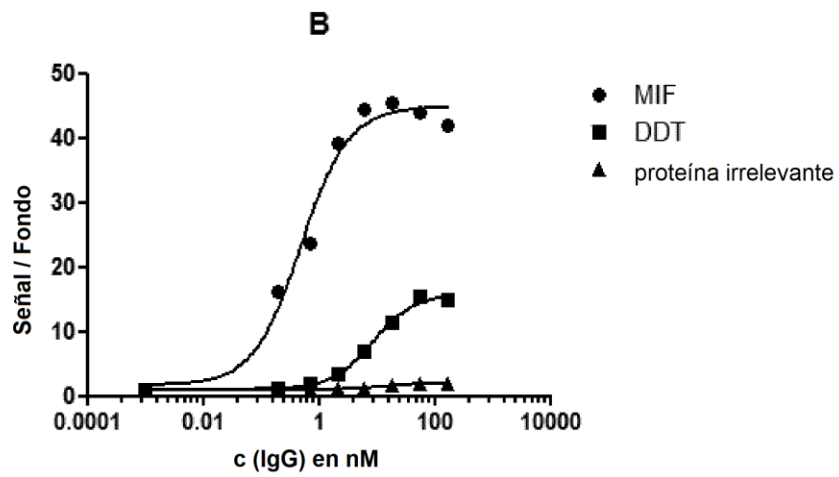
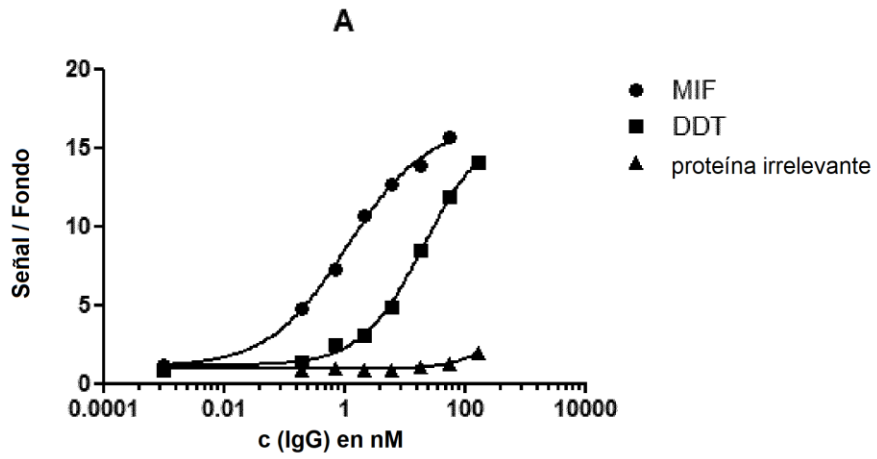
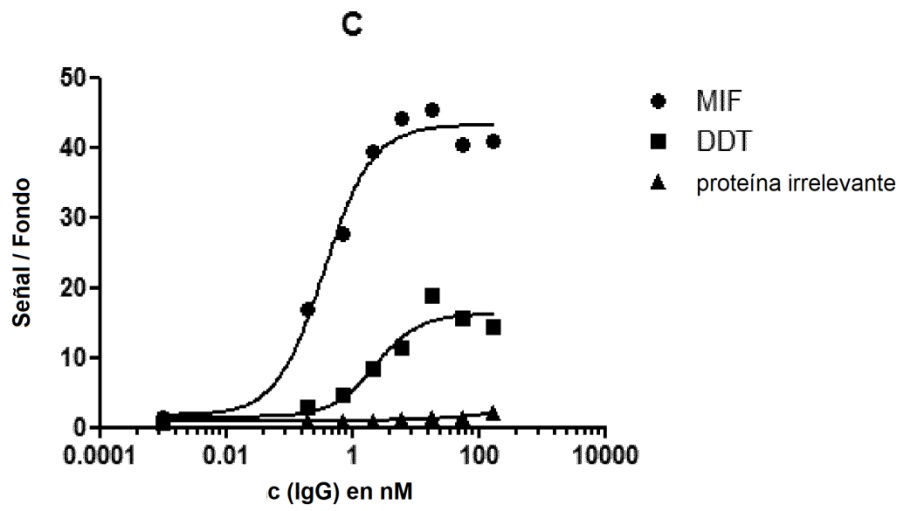


FIGURA 4



| | MIF | DDT |
|------|--------|-------|
| CE50 | 0.3597 | 2.287 |

FIGURA 5

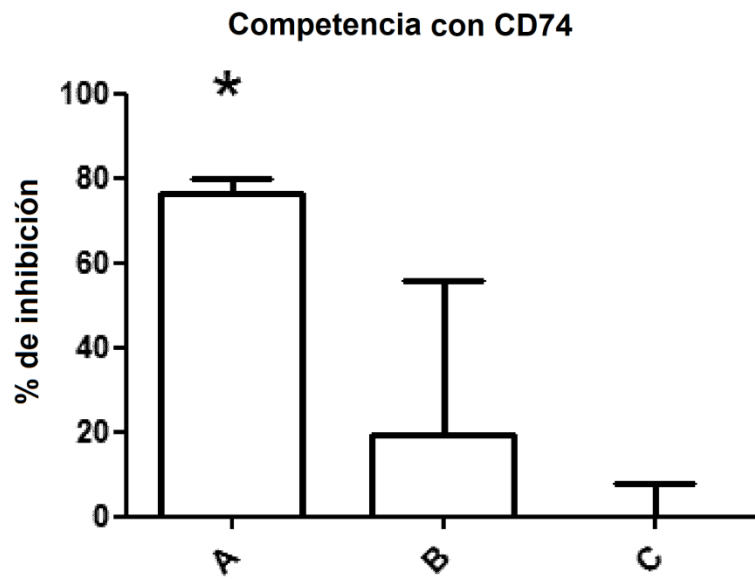
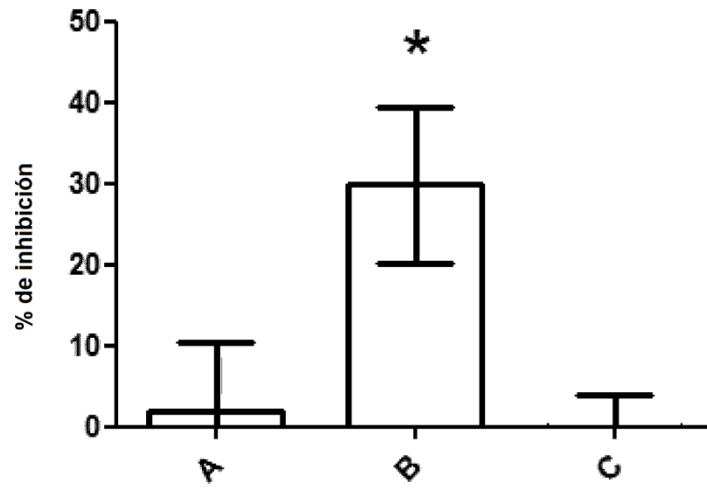


FIGURA 6

Liberación de IL-6



Liberación de IL-1

