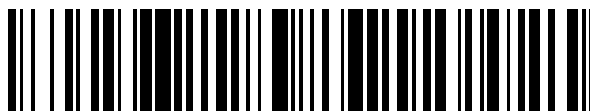


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 036**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 31/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2013** **PCT/EP2013/057892**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013** **WO13156472**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2013** **E 13718822 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019** **EP 2838559**

54 Título: **Terapia de combinación de anticuerpos anti-MIF y glucocorticoides**

30 Prioridad:

16.04.2012 US 201261624988 P

06.07.2012 US 201261668864 P

14.03.2013 US 201361785626 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.08.2020

73 Titular/es:

BAXALTA GMBH (50.0%)

Thurgauerstrasse 130

8152 Glattpark (Opfikon), CH y

BAXALTA INCORPORATED (50.0%)

72 Inventor/es:

KERSCHBAUMER, RANDOLF;

VOELKEL, DIRK;

SCHEIFLINGER, FRIEDRICH y

EHRlich, HARTMUT

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 779 036 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

Terapia de combinación de anticuerpos anti-MIF y glucocorticoides

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos anti-MIF, en particular a su uso en combinación con glucocorticoides, en el tratamiento de enfermedades relacionadas con MIF.

Antecedentes

- 10 El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citocina aislada inicialmente basándose en su capacidad de inhibir la migración aleatoria *in vitro* de células exudadas peritoneales de cobayas hipersensibles a tuberculina (que contienen macrófagos) (Bloom *et al.* Science 1966, 153, 80-2; David *et al.* PNAS 1966, 56, 72-7). Hoy en día, MIF se conoce como un regulador ascendente crítico de la respuesta inmunitaria innata y adquirida que ejerce un espectro pleiotrópico de actividades.

- 15 El ADNc de MIF humano se clonó en 1989 (Weiser *et al.*, PNAS 1989, 86, 7522-6), y su ubicación genómica se mapeó con el cromosoma 22. El producto del gen MIF humano es una proteína con 114 aminoácidos (después de la escisión de la metionina N-terminal) y una masa molecular aparente de aproximadamente 12,5 kDa. El MIF no tiene una homología de secuencia significativa con ninguna otra proteína. La proteína cristaliza como un trímero de subunidades idénticas. Cada monómero contiene dos hélices alfa antiparalelas que se empaquetan contra una lámina beta de cuatro cadenas. El monómero tiene dos cadenas beta adicionales que interactúan con las láminas beta de las subunidades adyacentes para formar la superficie de contacto entre los monómeros.

- 20 Las tres subunidades están dispuestas para formar un cilindro que contiene un canal accesible al disolvente que atraviesa el centro de la proteína a lo largo de un eje molecular triple (Sun *et al.* PNAS 1996, 93, 5191-5196).

- Se informó que la secreción de MIF de los macrófagos se indujo a concentraciones muy bajas de glucocorticoides (Calandra *et al.* Nature 1995, 377, 68-71). Sin embargo, el MIF también contrarregula los efectos de los glucocorticoides y estimula la secreción de otras citocinas tales como el factor de necrosis tumoral TNF- α y la interleucina IL-1 β (Baugh *et al.*, Crit Care Med 2002, 30, S27-35). También se demostró que el MIF, por ejemplo, presentaba propiedades proangiogénicas, proliferativas y antiapoptóticas, promoviendo así el crecimiento de células tumorales (Mitchell, R.A., Cellular Signalling, 2004, 16 (1): págs. 13-19; Lue, H. *et al.*, Oncogene 2007, 26 (35): págs. 5046-59). También, por ejemplo, se asocia directamente con el crecimiento de linfoma, melanoma y cáncer de colon (Nishihira *et al.* J Interferon Cytokine Res. 2000, 20: 751-62).

- 35 El MIF es un mediador de muchos estados patológicos y, por tanto, está asociado con una variedad de enfermedades, incluyendo entre otras, enfermedad intestinal inflamatoria (EII), artritis reumatoide (AR), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), asma, glomerulonefritis, nefropatía por IgA, infarto de miocardio (IM), septicemia y cáncer, aunque no se limitan a las mismas. Los anticuerpos anti-MIF policlonales y monoclonales se han desarrollado contra MIF humano recombinante (Shimizu *et al.*, FEBS Lett. 1996; 381, 199-202; Kawaguchi *et al.*, Leukoc. Biol. 1986, 39, 223-232 y Weiser *et al.*, Cell. Immunol 1985, 90, 16778).

- 40 Se han sugerido anticuerpos anti-MIF para uso terapéutico. Calandra *et al.*, (J. Inflamm. (1995); 47, 39-51), según los informes, usaron anticuerpos anti-MIF para proteger a los animales del choque séptico por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas inducido experimentalmente. Se sugirieron anticuerpos anti-MIF como medio de terapia para modular la producción de citocinas en choque séptico y otros estados patológicos inflamatorios.

- El documento US 6.645.493 divulga anticuerpos anti-MIF monoclonales derivados de células de hibridoma, que neutralizan la actividad biológica de MIF. Pudo demostrarse en un modelo animal que estos anticuerpos anti-MIF derivados de ratones tuvieron un efecto beneficioso en el tratamiento del choque inducido por endotoxinas.

- 50 El documento US 200310235584 divulga métodos para preparar anticuerpos de alta afinidad para MIF en animales en los que el gen MIF se ha inactivado homocigóticamente.

- 55 El factor de inhibición de la glicosilación (GIF) es una proteína descrita por Galat *et al.* (Eur. J. Biochem, 1994, 224, 417-21). Ahora se reconoce que MIF y GIF son idénticos. Watarai *et al.* (PNAS 2000, 97, 13251-6) describieron anticuerpos policlonales que se unen a diferentes epítopos de GIF para identificar la naturaleza bioquímica de la modificación postraducciona de GIF en células Ts. Watarai *et al.* anteriormente, informaron que el GIF se produce en diferentes isoformas conformacionales *in vitro*. Un tipo de isómero se produce por modificación química de un único residuo de cisteína. La modificación química conduce a cambios conformacionales dentro de la proteína GIF.

- Los glucocorticoides, a veces también denominados glucocorticosteroides, son una clase de hormonas esteroideas que se unen al receptor de glucocorticoides, que está presente en casi todos los animales vertebrados. Los glucocorticoides forman parte del mecanismo de retroalimentación del sistema inmunitario que reduce la actividad inmunitaria, es decir, la inflamación. En medicina, se usan para tratar enfermedades que están provocadas por un sistema inmunitario hiperactivo, por lo que son ejemplos de tales enfermedades las alergias, el asma, las

enfermedades autoinmunitarias y la septicemia. También interfieren con algunos de los mecanismos anómalos en las células cancerosas, por lo que también se usan para tratar el cáncer. Al unirse al receptor de glucocorticoides, el complejo del receptor de glucocorticoides activado regula la expresión de proteínas antiinflamatorias en el núcleo mediante un proceso conocido como transactivación y reprime la expresión de proteínas proinflamatorias en el citosol al atenuar las acciones en la inducción génica (a través de NF- κ B, AP1, homodímeros jun-jun, etc.). En principio, los glucocorticoides se definen como un subgrupo de corticosteroides. Además, se conoce una nueva clase de compuestos con actividad glucocorticoide (SEGRA, agonistas selectivos del receptor de glucocorticoides). Estos compuestos ejercen sólo algunas de las acciones de los glucocorticoides agonistas completos, es decir, no logran obtener el espectro completo de transactivación, transrepresión y acciones indirectas sobre la inducción génica (a través de NF- κ B, AP1, homodímeros jun-jun, etc.). Por analogía con los moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM = tamoxifeno, raloxifeno, toremifeno), estos compuestos también se denominan moduladores selectivos del receptor de glucocorticoides (SERM). Los ejemplos de SEGRA/SEGRM incluyen mapracorat (= BOL303242X = ZK245186), compuesto A, RU24856, RU24782, RU40066, ZK 216348.

Un ejemplo importante de glucocorticoides naturales es el cortisol (o hidrocortisona) que es esencial para la vida y regula o apoya una variedad de funciones cardiovasculares, metabólicas, inmunológicas y homeostáticas importantes.

También hay varios glucocorticoides sintéticos disponibles.

Los glucocorticoides actúan en tres campos principales, es decir, el campo de desarrollo inmunológico, metabólico y fetal. En el campo inmunitario, regulan por incremento la expresión de proteínas antiinflamatorias y regulan por disminución la expresión de proteínas proinflamatorias. Los efectos metabólicos pueden resumirse de la siguiente manera:

- Estimulación de la gluconeogénesis, particularmente en el hígado: esta ruta da como resultado la síntesis de glucosa a partir de sustratos no hexosa tales como aminoácidos y glicerol a partir de la descomposición de triglicéridos y es particularmente importante en carnívoros y determinados herbívoros. Potenciar la expresión de enzimas implicadas en la gluconeogénesis es probablemente la función metabólica mejor conocida de los glucocorticoides.
- Movilización de aminoácidos de tejidos extrahepáticos: sirven como sustratos para la gluconeogénesis.
- Inhibición de la captación de glucosa en tejido muscular y adiposo: los ácidos grasos liberados por la lipólisis se usan para la producción de energía en tejidos como el músculo, y el glicerol liberado proporciona otro sustrato para la gluconeogénesis.

En el desarrollo fetal, los glucocorticoides promueven la maduración del pulmón y la producción del tensioactivo que es necesario para la función pulmonar extrauterina. Son otras sustancias clave para el desarrollo normal del cerebro.

Se ha creado una variedad de glucocorticoides sintéticos, algunos mucho más potentes que el cortisol, para uso terapéutico.

Se diferencian en farmacocinética (absorción, semivida, volumen de distribución, aclaramiento) y en farmacodinámica. La potencia de los glucocorticoides, la duración del efecto y la superposición de la potencia de los mineralocorticoides varían. El cortisol (hidrocortisona) es la comparación convencional para la potencia de los glucocorticoides. La hidrocortisona es el nombre usado para las preparaciones farmacéuticas de cortisol. La potencia oral puede ser menor que la potencia parenteral dado que cantidades significativas (hasta el 50% en algunos casos) pueden absorberse en el intestino.

Ejemplos son:

Hidrocortisona, acetato de cortisona, cortisona/cortisol, fluorocortolona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, dexametasona, betametasona, parametasona.

Además, hay compuestos que sólo imitan algunas pero no todas las acciones de los glucocorticoides; estos compuestos se denominan SEGRA (agonistas selectivos del receptor de glucocorticoides). Los ejemplos de SEGRA/SEGRM incluyen mapracorat (= BOL303242X = ZK245186), compuesto A, RU24856, RU24782, RU40066, ZK 216348.

Esteroides principalmente para aplicación local (por ejemplo, pulverizador-pulmón, supositorio-colon, crema-piel): hidrocortisona, beclometasona, budesonida, fluticasona, flunisolida, mometasona, ciclesonida, clobetasona.

Fue muy sorprendente encontrar que la producción de MIF de macrófagos y células T fue inducida en lugar de inhibida por glucocorticoides en roedores (Calandra T, Bernhagen J, Metz CN *et al.*, (1995) MIF as a glucocorticoid-

induced modulator of cytokine production. *Nature* 377: 68-71; y Bacher M, Metz CN, Calandra T, *et al.*, (1996) An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *PNAS* 93: 7849-7854).

Como se conocía que el MIF tiene propiedades proinflamatorias, estos resultados parecieron al principio paradójicos y difíciles de conciliar. Posteriormente, sin embargo, se descubrió que el MIF anula en efecto los hechos inmunosupresores antiinflamatorios de los glucocorticoides.

Aunque se ha demostrado que los glucocorticoides son útiles y exitosos en el tratamiento de varias enfermedades y trastornos diferentes (véase a continuación), la administración puede tener una variedad de efectos secundarios, dependiendo del tipo de medicamento usado. Los efectos secundarios más comunes incluyen

- Inmunosupresión
- Hiperglucemia debido al aumento de la gluconeogénesis, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa ("diabetes esteroidea")
- Fragilidad de la piel aumentada, fácil de magullar
- Balance de calcio negativo debido a la absorción intestinal de calcio reducida
- Osteoporosis inducida por esteroides; densidad ósea reducida (osteoporosis, osteonecrosis, mayor riesgo de fractura, reparación de fractura más lenta)
- Aumento de peso debido al aumento de la deposición de grasa visceral y troncal (obesidad central) y estimulación del apetito
- Insuficiencia suprarrenal (si se usa durante mucho tiempo y se detiene repentinamente sin disminuir)
- Ruptura muscular (proteólisis), debilidad; masa muscular y reparación reducidas
- Expansión de almohadillas de grasa malar y dilatación de pequeños vasos sanguíneos en la piel
- Anovulación, irregularidad de los periodos menstruales
- Insuficiencia de crecimiento, retraso puberal
- Aminoácidos plasmáticos aumentados, formación de urea aumentada; balance negativo de nitrógeno
- Efecto excitador sobre el sistema nervioso central (euforia, psicosis)
- Glaucoma debido a presión craneal aumentada
- Cataratas

La combinación de problemas clínicos producidos por glucocorticoides en exceso y prolongados, sintéticos o endógenos, se denomina síndrome de Cushing.

Además de los efectos enumerados anteriormente, el uso de esteroides a dosis altas durante más de una semana comienza a producir la supresión de las glándulas suprarrenales del paciente ya que los glucocorticoides exógenos suprimen la hormona liberadora de corticotropina hipotalámica (CRH) y la hormona adrenocorticotrófica hipofisaria (ACTH). Con la supresión prolongada, las glándulas suprarrenales se atrofian (se encogen físicamente) y pueden tardar meses en recuperar la función completa después de la interrupción del glucocorticoide exógeno.

Durante este tiempo de recuperación, el paciente es vulnerable a insuficiencia suprarrenal en momentos de estrés, tal como una enfermedad.

Por último, pero no menos importante, los pacientes que recibieron glucocorticoides durante períodos prolongados también pueden desarrollar resistencia a los glucocorticoides. En estos pacientes, incluso las dosis altas de glucocorticoides no son suficientes para provocar una respuesta antiinflamatoria adecuada (Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory disease. *Lancet* 2009 30 de mayo; 373 (9678): 1905-1917).

Los efectos secundarios enumerados anteriormente aumentan gravemente si se aumenta la dosificación del fármaco glucocorticoide administrado. Disminuir la cantidad del fármaco administrado generalmente también dará como

resultado efectos secundarios más bajos o aliviados.

Por tanto, sigue existiendo una necesidad urgente en la técnica de proporcionar una terapia para enfermedades y trastornos relacionados con MIF que permita la reducción de la dosis de administración de un glucocorticoide dado.

5

Descripción de la invención

Este objeto se ha resuelto mediante la presente invención.

10 En particular, pudo demostrarse que mediante una terapia de combinación de anticuerpos anti-MIF y un glucocorticoide dado, podía detectarse un efecto sinérgico que permitiría el tratamiento de enfermedades relacionadas con MIF con una dosificación más baja del glucocorticoide y/o lograr un mayor efecto con una dosificación similar en comparación con el tratamiento de esta enfermedad con el glucocorticoide solo.

15 En particular, pudo demostrarse que un tratamiento mediante una terapia de combinación de anticuerpos anti-oxMIF y un glucocorticoide dado está asociado con un efecto sinérgico, tal como se describió anteriormente y se ejemplifica en los ejemplos de la presente invención.

20 Los niveles elevados de MIF, es decir, los niveles de MIF en general, se detectan después del inicio de diversas enfermedades, entre otros, después del inicio de enfermedades inflamatorias o cáncer. Sin embargo, el MIF circula también en sujetos sanos, lo que dificulta una clara diferenciación. oxMIF, por el contrario, no está presente en sujetos sanos. oxMIF aumenta en estados patológicos y es detectable en muestras de pacientes como, por ejemplo, sangre, suero y orina.

25 Se ha descubierto después de una investigación exhaustiva de MIF y sus anticuerpos que los anticuerpos RAB9, RAB4 y RAB0 se unen específicamente a oxMIF (y son incapaces de unirse a redMIF). Esta unión también se observa para los anticuerpos RAM9, RAM4 y RAM0.

30 En experimentos anteriores llevados a cabo por los inventores, pudo demostrarse que los procedimientos oxidativos como la oxidación mediada por cistina, la oxidación mediada por GSSG (ox. glutatión) o la incubación de MIF con Proclin300 o los agentes reticulantes de proteínas (por ejemplo, BMOE) provocan la unión de MIF a los anticuerpos mencionados anteriormente.

Las sorprendentes conclusiones alcanzadas por los presentes inventores son:

35

- La modulación redox (oxidación leve mediada por cistina/GSSG) de MIF recombinante (humano, murino, rata, CHO, mono)) o el tratamiento de MIF recombinante con Proclin300 o agentes reticulantes de proteínas conduce a la unión de los anticuerpos anti-MIF RAB9, RAB4 y RAB0 de Baxter

40

- La reducción de oxMIF conduce a la pérdida de unión a Ac
- La especificidad de las isoformas de oxMIF se correlaciona con la eficacia biológica del Ac *in vivo*.
- Los niveles de oxMIF pueden correlacionarse con un estado patológico.

45

Este conocimiento adicional con respecto al (ox)MIF sirvió de base para estudios posteriores de los presentes inventores.

Algunas realizaciones preferidas de la presente invención son:

50

1. Un anticuerpo anti-MIF en combinación con un glucocorticoide para su uso en el tratamiento de una enfermedad receptiva a los glucocorticoides.

55

2. El anticuerpo anti-MIF en combinación con un glucocorticoide según el punto 1, en el que la enfermedad receptiva a los glucocorticoides responde al tratamiento con un glucocorticoide.

3. El anticuerpo anti-MIF en combinación con un glucocorticoide según los puntos 1 ó 2, para uso en el tratamiento de inflamación, alergia, cáncer o asma.

60

4. El anticuerpo anti-MIF en combinación con un glucocorticoide según los puntos 1, 2 ó 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-oxMIF.

5. La combinación según uno cualquiera de los puntos 1-4, en la que el anticuerpo anti-MIF se selecciona del siguiente grupo: anticuerpo anti-MIF RAB9, RAB4, RAB0, RAM9, RAM4 y/o RAM0.

65

6. La combinación según cualquiera de los puntos 1 a 5, en la que el glucocorticoide se selecciona del grupo que consiste en agonistas del receptor de glucocorticoides, por ejemplo, metilprednisolona, prednisolona, trimacina, dexametasona, parametasona, fluorocortolona, budesonida, fluticasona, flunisolida, ciclesonida, mometasona, clobetasona, cortisona e hidrocortisona, y SEGRA/SEGRM antiinflamatorios (por ejemplo, mapracorat (= BOL303242X = ZK245186), compuesto A, RU24856, RU24782, RU4G066, ZK 216348).

7. La combinación según cualquiera de los puntos 1 a 6, en la que el anticuerpo anti-MIF es uno cualquiera de los anticuerpos RAB9, RAB4 o RAB0 o RAM9, RAM4 o RAM0, preferiblemente el anticuerpo RAM9, el glucocorticoide se selecciona del grupo de (metil)prednisolona y dexametasona en el caso de administración sistémica y budesonida en el caso de administración local y la enfermedad relacionada con MIF es inflamación, en particular nefritis, incluso más preferida nefritis lúpica, glomerulonefritis, nefropatía por IgA o IgM, vasculitis sistémicas (por ejemplo, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener y púrpura de Schoenlein Henoch), nefritis anti-GBM y/o glomerulonefritis rápidamente progresiva (tipo I, II, III o IV), como, por ejemplo, nefritis por ANCA (anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos).

8. La combinación según cualquiera de los puntos 1 a 6, en la que el anticuerpo anti-MIF es uno cualquiera de los anticuerpos RAB9, RAB4 o RAB0, o RAM9, RAM4 o RAM0 preferiblemente el anticuerpo RAM9, el glucocorticoide se selecciona del grupo de (metil)prednisolona y dexametasona en el caso de administración sistémica y budesonida en el caso de administración local y la enfermedad relacionada con MIF es nefritis lúpica.

9. La combinación según cualquiera de los puntos 1 a 6, en la que el anticuerpo anti-MIF es uno cualquiera de los anticuerpos RAB9, RAB4 o RAB0, o RAM9, RAM4 o RAM0, preferiblemente RAM9, el glucocorticoide se selecciona del grupo de (metil)prednisolona y dexametasona en el caso de administración sistémica y budesonida en el caso de administración local y la enfermedad relacionada con MIF es lupus eritematoso sistémico.

10. La terapia de combinación según cualquiera de los puntos 1 a 6, en la que el anticuerpo anti-MIF es uno cualquiera de los anticuerpos RAB9, RAB4 o RAB0, o RAM9, RAM4 o RAM0, preferiblemente RAM9, el glucocorticoide se selecciona del grupo de dexametasona y (metil)prednisolona en el caso de administración sistémica y budesonida en el caso de administración local y la enfermedad relacionada con MIF es inflamación cutánea.

11. La terapia de combinación según cualquiera de los puntos 1 a 6, en la que el anticuerpo anti-MIF es uno cualquiera de los anticuerpos RAB9, RAB4 o RAB0, o RAM9, RAM4 o RAM0, preferiblemente RAM9, el glucocorticoide se selecciona del grupo de dexametasona y (metil)prednisolona en el caso de administración sistémica y budesonida o hidrocortisona en el caso de administración local y la enfermedad relacionada con MIF está provocada por una respuesta inmunitaria mediada por células T.

12. La terapia de combinación según los puntos 10 u 11, en la que la respuesta inmunitaria mediada por células T es inflamación cutánea, por ejemplo, psoriasis o hipersensibilidad de contacto.

13. La terapia de combinación según uno cualquiera de los puntos 10-12, en la que el glucocorticoide es budesonida y en la que la budesonida se formula para aplicación tópica.

14. La terapia de combinación tal como se reivindica en cualquiera de los puntos 1 a 5, en la que el anticuerpo anti-MIF es uno cualquiera de los anticuerpos RAB9, RAB4 o RAB0, o RAM9, RAM4 o RAM0, preferiblemente RAM9, el glucocorticoide es budesonida y la enfermedad relacionada con MIF es enfermedad intestinal inflamatoria (EII), en la que la EII se selecciona de colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

15. La terapia de combinación tal como se define en cualquiera de los puntos 1 a 6, en la que el anticuerpo anti-MIF es uno cualquiera de los anticuerpos RAB9, RAB4 o RAB0, o RAM9, RAM4 o RAM0, preferiblemente RAM9, el glucocorticoide se selecciona del grupo de (metil)prednisolona y dexametasona en el caso de administración sistémica y la budesonida en el caso de administración local y la enfermedad relacionada con MIF es esclerosis múltiple.

16. Un kit que comprende la combinación tal como se define en cualquiera de los puntos 1 a 15 anteriores, e instrucciones de uso.

17. Una combinación tal como se define en cualquiera de los puntos 1 a 15 anteriores, o el kit del punto 16, para su uso en el tratamiento de una enfermedad receptiva a los glucocorticoides, en particular inflamación, alergia, asma o cáncer.

Los anticuerpos mencionados anteriormente se caracterizan y respaldan tanto por sus secuencias como por depósitos como plásmidos en *E. coli* (cepa TG1), que comprende o bien la cadena ligera o bien la cadena pesada de cada uno de los anticuerpos mencionados anteriormente RAB0, RAB4 y RAB9, respectivamente y RAM0, RAM4 y RAM9, respectivamente.

Los plásmidos se caracterizan por su número DSM, que es el número oficial obtenido tras el depósito en virtud del Tratado de Budapest en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, Braunschweig, Alemania. Los plásmidos se depositaron en cepas de *E. coli*, respectivamente.

5 El plásmido con el número DSM 25110 comprende la secuencia de cadena ligera del anticuerpo anti-MIF RAB4.

El plásmido con el número DSM 25112 comprende la secuencia de cadena pesada (IgG4) del anticuerpo anti-MIF RAB4.

10 La coexpresión de los plásmidos DSM 25110 y DSM 25112 en una célula huésped adecuada da como resultado la producción del anticuerpo anti-MIF RAB4 preferido.

El plásmido con el número DSM 25111 comprende la secuencia de cadena ligera del anticuerpo anti-MIF RAB9.

15 El plásmido con el número DSM 25113 comprende la secuencia de cadena pesada (IgG4) del anticuerpo anti-MIF RAB9.

La coexpresión de los plásmidos DSM 25111 y DSM 25113 en una célula huésped adecuada da como resultado la producción del anticuerpo anti-MIF RAB9 preferido.

20 El plásmido con el número DSM 25114 comprende la secuencia de cadena ligera del anticuerpo anti-MIF RAB0.

El plásmido con el número DSM 25115 comprende la secuencia de cadena pesada (IgG4) del anticuerpo anti-MIF RAB0.

25 La coexpresión de los plásmidos DSM 25114 y DSM 25115 en una célula huésped adecuada da como resultado la producción del anticuerpo anti-MIF RAB0 preferido.

30 Se depositaron plásmidos adicionales según el Tratado de Budapest el 12 de abril de 2012 en la DSMZ para las secuencias de cadena ligera y pesada de RAM0, RAM4 y RAM9, respectivamente, de la siguiente manera:

RAM9 (cadena pesada): *E. coli* GA.662-01.pRAM9hc - DSM 25860.

RAM4 (cadena ligera): *E. coli* GA.906-04.pRAM4lc - DSM 25861.

35 RAM9 (cadena ligera): *E. coli* GA.661-01.pRAM9lc - DSM 25859.

RAM4 (cadena pesada): *E. coli* GA.657-02.pRAM4hc - DSM 25862.

40 RAM0 (cadena ligera): *E. coli* GA.906-01.pRAM0lc - DSM 25863.

RAM0 (cadena pesada): *E. coli* GA.784-01.pRAM0hc - DSM 25864.

45 El término tratamiento "profiláctico" o "terapéutico" está reconocido en la técnica y se refiere a la administración de un fármaco a un paciente. Si se administra antes de la manifestación clínica del estado no deseado (por ejemplo, enfermedad u otro estado no deseado del animal huésped), entonces el tratamiento es profiláctico, es decir, protege al huésped contra el desarrollo del estado no deseado, mientras que si se administra después de la manifestación de la enfermedad del estado no deseado, el tratamiento es terapéutico (es decir, está destinado a disminuir, mejorar o mantener el estado no deseado existente o los efectos secundarios del mismo).

50 Tal como se usa en el presente documento, un compuesto anti-(ox)MIF se refiere a cualquier agente que atenúa, inhibe, se opone, contrarresta o disminuye la actividad biológica de (ox)MIF. Un compuesto anti(ox)MIF puede ser un agente que inhibe o neutraliza la actividad de (ox)MIF, por ejemplo, un anticuerpo, particularmente preferido, los anticuerpos tal como se describen en el presente documento, incluso más preferidos los anticuerpos RAB9, RAB4 y/o RAB0 o RAM9, RAM4 o RAM0.

55 El antagonista de MIF preferido según la presente invención es un anticuerpo anti-MIF. Incluso más preferido, el anticuerpo anti-MIF es un anticuerpo contra oxMIF. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-oxMIF, por ejemplo, los anticuerpos mencionados anteriormente o una porción de unión a antígeno de los mismos se unen a oxMIF con una K_D de menos de 100 nM, preferiblemente una K_D de menos de 50 nM, incluso más preferido con una K_D de menos de 10 nM.

60 La invención se refiere además a kits que comprenden un anticuerpo anti-MIF o una porción de unión a antígeno del mismo, así como un agente glucocorticoide según la invención. Un kit puede incluir además del anticuerpo y el agente glucocorticoide, agentes terapéuticos adicionales y usos de los mismos. Un kit también puede incluir instrucciones de uso en un método terapéutico.

Los resultados anteriores han demostrado que un anticuerpo anti-MIF que sólo se une a oxMIF y no se une a redMIF e inhibe además GCO y/o la proliferación celular induce un efecto beneficioso en un modelo animal.

5 Descripción detallada de la invención

La invención se describe adicionalmente en las figuras adjuntas.

Descripción de las figuras:

10 Figura 1: diagrama esquemático del tratamiento de búsqueda de dosis con dexametasona tal como se llevó a cabo en el ejemplo 1a.

15 Figura 2: proteinuria el día 8 después de la administración de varias dosis diferentes de dexametasona.

Figura 3: infiltración de macrófagos después de la administración de varias dosis de dexametasona. Se determinó el número de macrófagos (células positivas para ED1) por sección transversal glomerular. Se muestra el resultado para cada animal, así como la media para cada grupo.

20 Figura 4: semilunas glomerulares después de varias dosis de dexametasona. Se indica el porcentaje de semilunas glomerulares determinado para cada animal y se muestra la media para cada grupo.

Figura 5: diagrama esquemático del hallazgo de dosis para el anticuerpo anti-MIF RAM9 en una formulación de glicina según el ejemplo 1b.

25 Figura 6: proteinuria el día 8 después de dos dosis de anticuerpo RAM9.

Figura 7: infiltración de macrófagos después de dos dosis de anticuerpo RAM9. Se determinó el número de macrófagos (células positivas para ED1) por sección transversal glomerular. Se muestra el resultado para cada animal, así como la media para cada grupo.

Figura 8: formación de semilunas glomerulares después de dos dosis de anticuerpo RAM9. Se indica el porcentaje de semilunas glomerulares determinado para cada animal y se muestra la media para cada grupo.

35 Figura 9: diagrama esquemático del programa de tratamiento para una combinación de dexametasona y anticuerpo RAM9 según el ejemplo 1c.

Figura 10: reducción de proteinuria después del tratamiento combinado con anticuerpo RAM9 (intervalo de dosis 0-120 mg/kg) y dexametasona (0,025 mg/kg). Se representa la media de dos experimentos independientes. Las flechas muestran el % de reducción de proteinuria por diferentes dosis de dexametasona sin la aplicación de anticuerpos.

Figura 11: reducción observada de la infiltración de macrófagos después del tratamiento combinado con anticuerpo RAM9 (intervalo de dosis 0-120 mg/kg) y dexametasona (0,025 mg/kg). Se representa la media de dos experimentos independientes. Las flechas muestran el % de reducción de la infiltración de macrófagos por diferentes dosis de dexametasona sin la aplicación de anticuerpos.

Figura 12: reducción de la formación de semilunas después del tratamiento combinado con anticuerpo RAM9 (intervalo de dosis 0-120 mg/kg) y dexametasona (0,025 mg/kg). Se representa la media de dos experimentos independientes. Las flechas muestran el % de reducción de la formación de semilunas por las diferentes dosis de dexametasona sin la aplicación de anticuerpos.

Figura 13: *respuesta de hipersensibilidad de contacto (CHS) a DNFB*. Reacción de CHS atenuada en la oreja expuesta de ratones tratados con anti-MIF (RAM9) en combinación con hidrocortisona (+HC) en comparación con ratones tratados con RAM9 sin aplicación de hidrocortisona (-HC). Se usaron ratones tratados con anticuerpo de control de isotipo (con o sin aplicación tópica de hidrocortisona) como control negativo. Se usaron ocho ratones por grupo y se cuantificó la dermatitis de contacto de la oreja reducida midiendo la diferencia del grosor de la oreja entre la oreja derecha (expuesta) y la izquierda (no expuesta).

60 Definiciones y técnicas generales

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que comúnmente entienden los expertos en la técnica. En general, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención

se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y comentan a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos que se indique lo contrario. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989) y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992) y Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), que se incorporan en el presente documento como referencia.

“MIF” o “factor inhibidor de la migración de macrófagos” se refiere a la proteína, que se conoce como mediador crítico en la respuesta inmunitaria e inflamatoria, y como contrarregulador de glucocorticoides. El MIF incluye MIF de mamífero, específicamente MIF humano (número de registro primario Swiss-Prot: P14174), en el que la forma monomérica se codifica como una proteína de 115 aminoácidos pero se produce como una proteína de 114 aminoácidos debido a la escisión de la metionina inicial. “MIF” también incluye “GIF” (factor de inhibición de la glicosilación) y otras formas de MIF, tales como proteínas de fusión de MIF.

La numeración de los aminoácidos de MIF comienza con la metionina N-terminal (aminoácido 1) y termina con la alanina C-terminal (aminoácido 115).

“MIF oxidado” u oxMIF se define para los propósitos de la invención como una isoforma de MIF que se produce por tratamiento de MIF con reactivos oxidantes suaves, tales como la cistina. Tal como se ha demostrado por la presente invención, el oxMIF recombinante que se ha tratado de esta manera comprende isoforma(s) de MIF que comparte(n) reordenamientos estructurales con oxMIF que (por ejemplo) se produce *in vivo* después de la exposición de animales a bacterias.

Para los propósitos de esta invención, redMIF se define como MIF reducido y es MIF que no se une a RAB0, RAB9 y/o RAB4.

Los anticuerpos anti-oxMIF descritos en esta invención son capaces de discriminar entre oxMIF y redMIF, que se generan por oxidación o reducción leve, respectivamente. Los anticuerpos anti-oxMIF son útiles para detectar específicamente oxMIF. La discriminación entre estos conformadores se evalúa mediante ELISA o resonancia de plasmón superficial. Ambas técnicas pueden realizarse tal como conoce bien un experto en la técnica y tal como se describe a continuación.

Evaluación de la unión diferencial de los anticuerpos por Biacore.

La cinética de unión de oxMIF y redMIF al anticuerpo RAB9 y RAB0 se examina mediante análisis de resonancia de plasmón superficial usando un sistema Biacore 3000. Los anticuerpos se recubrieron en un chip CM5 (= dextrano carboximetilado) y se inyectó proteína MIF recombinante, previamente incubada con Proclin300 al 0,2%. (Proclin300 consiste en isotiazolonas oxidativas que estabilizan la estructura de oxMIF). En el tampón HBS-EP nativo (= tampón de transferencia Biacore) sin la adición de ProClin300, ninguna de las proteínas MIF recombinantes se unió a RAB9, RAB0 o al anticuerpo de referencia (anticuerpo de control de isotipo irrelevante) usado como control de unión negativo (de fondo).

En una realización preferida, oxMIF es MIF que está unido diferencialmente por el anticuerpo RAB9, RAB4 y/o RAB0 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, lo que significa que estos anticuerpos se unen a oxMIF mientras que redMIF no está unido por ninguno de estos anticuerpos.

En otras realizaciones, los anticuerpos anti-oxMIF, por ejemplo, los anticuerpos mencionados anteriormente o una porción de unión a antígeno de los mismos se unen a oxMIF con una K_D de menos de 100 nM, preferiblemente una K_D de menos de 50 nM, incluso más preferido con una K_D de menos de 10 nM. En una realización aún más preferida, los anticuerpos se unen a oxMIF con una K_D de menos de 5 nM.

La (no) unión de un anticuerpo, por ejemplo, RAB9, RAB4 o RAB0 (para oxMIF o redMIF) puede determinarse como conoce generalmente un experto en la técnica, siendo ejemplos uno cualquiera de los siguientes métodos: ELISA con MIF recombinante en su estado reducido u oxidado, o resonancia de plasmón superficial usando MIF recombinante en su estado reducido u oxidado, como el conocido ensayo Biacore, descrito anteriormente.

Un método preferido para la determinación de la unión es la resonancia de plasmón superficial de un anticuerpo a, por ejemplo, rec.(ox)MIF tras lo cual “unión” pretende representarse con una K_D de menos de 100 nM preferiblemente menos de 50 nM, incluso más preferiblemente menos de 10 nM mientras que la no unión a redMIF se caracteriza por una K_D de más de 400 nM. “Unión” y “unión específica” se usan indistintamente en el presente documento para denotar lo anterior. “Unión diferencial” en el contexto de esta solicitud significa que un compuesto, en particular los anticuerpos tal como se describen en el presente documento, se unen a oxMIF (por ejemplo, con los valores de K_D mencionados anteriormente) mientras que no se unen a redMIF (definiéndose la no unión de nuevo tal como anteriormente).

Un “anticuerpo” se refiere a un anticuerpo intacto o una porción de unión a antígeno que compite con el anticuerpo intacto por la unión (específica). Véase en general, *Fundamental Immunology*, cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (incorporado como referencia). El término anticuerpo incluye anticuerpos humanos, anticuerpos de mamíferos, anticuerpos aislados y formas genéticamente modificadas tales como anticuerpos quiméricos, camelizados o humanizados, aunque no se limita a los mismos.

El término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, (ox)MIF). Las porciones de unión a antígeno pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Las porciones de unión a antígeno incluyen, por ejemplo, aunque no se limitan a, lo siguiente: fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y de la región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos quiméricos, anticuerpos y polipéptidos que contienen al menos una porción de un anticuerpo que es suficiente para conferir unión de antígeno específica al polipéptido, es decir, oxMIF o redMIF. Desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, tanto los dominios variables maduros de cadena ligera como los de cadena pesada comprenden las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está según las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Maryland (1987 y 1991)), Chothia *et al.* *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987) o Chothia *et al.*, *Nature* 342: 878-883 (1989). Un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo puede derivatizarse o unirse a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo puede unirse funcionalmente a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una molécula de unión.

El término “K_D” se refiere en el presente documento, según el conocimiento general de un experto en la técnica, a la constante de disociación de equilibrio de un anticuerpo particular con el antígeno respectivo. Esta constante de disociación de equilibrio mide la afinidad. La afinidad determina cuánto complejo se forma en el equilibrio (estado estacionario en el que la asociación equilibra la disociación) (en el presente documento: oxMIF o redMIF y anticuerpo).

K_a = constante de tasa de asociación [M⁻¹ s⁻¹]

K_d = constante de tasa de disociación [s⁻¹]

K_D = constante de disociación de equilibrio = K_d/k_a [M]

El término “anticuerpo humano” se refiere a cualquier anticuerpo en el que los dominios variables y constantes son secuencias humanas. El término abarca anticuerpos con secuencias derivadas de genes humanos, pero que se han cambiado, por ejemplo, para disminuir la posible inmunogenicidad, aumentar la afinidad, eliminar las cisteínas que pueden provocar plegamiento no deseado, etc. El término abarca tales anticuerpos producidos de forma recombinante en células no humanas, que pueden, por ejemplo, impartir glicosilación no típica de células humanas.

El término “anticuerpo humanizado” se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias humanas y que contienen también secuencias no humanas; en particular, un “anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo no humano en el que se han añadido secuencias humanas y/o secuencias humanas reemplazan las secuencias no humanas.

El término “anticuerpo camelizado” se refiere a anticuerpos en los que la estructura o secuencias de anticuerpos se ha cambiado para parecerse más a los anticuerpos de los camellos, también denominados anticuerpos camélidos. Los métodos para el diseño y la producción de anticuerpos camelizados forman parte del conocimiento general de un experto en la técnica.

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

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

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

operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores de expresión”).

Pueden producirse anticuerpos anti-(ox)MIF, entre otros, por medio de vectores de expresión convencionales, tales como vectores bacterianos (por ejemplo, pBR322 y sus derivados) o vectores eucariotas. Esas secuencias que codifican para el anticuerpo pueden proporcionarse con secuencias reguladoras que regulan la replicación, expresión y/o secreción de la célula huésped.

Estas secuencias reguladoras comprenden, por ejemplo, promotores (por ejemplo, CMV o SV40) y secuencias señal. Los vectores de expresión también pueden comprender marcadores de selección y amplificación, tales como el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR), higromicina B fosfotransferasa y timidina cinasa. Los componentes de los vectores usados, tales como marcadores de selección, replicones, potenciadores, pueden obtenerse comercialmente o prepararse mediante métodos convencionales. Los vectores pueden construirse para la expresión en diversos cultivos celulares, por ejemplo, en células de mamífero tales como CHO, COS, HEK293, NSO, fibroblastos, células de insectos, levaduras o bacterias tales como *E. coli*. En algunos casos, se usan células que permiten una glicosilación óptima de la proteína expresada.

El/los gen(es) de la cadena ligera del anticuerpo anti-(ox)MIF y el/los gen(es) de la cadena pesada del anticuerpo anti-(ox)MIF pueden insertarse en vectores diferenciados o los genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpos se insertan en el vector de expresión mediante métodos convencionales, por ejemplo, ligamiento de sitios de restricción complementarios en el fragmento y vector del gen del anticuerpo, o ligamiento de extremo romo si no hay sitios de restricción presentes.

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

La producción de anticuerpos anti-(ox)MIF también puede incluir cualquier método conocido en la técnica para el cultivo de dichas células transformadas, por ejemplo, de manera continua o discontinua, y la expresión del anticuerpo anti-(ox)MIF, por ejemplo, constitutiva o por inducción. Se refiere en particular al documento WO 2009/086920 para referencia adicional para la producción de anticuerpos anti-(ox)MIF. En una realización preferida, los anticuerpos anti-(ox)MIF producidos según la presente invención se unen a oxMIF o a un epítipo del mismo. Los anticuerpos particularmente preferidos según la presente invención son los anticuerpos RAB9, RAB4 y/o RAB0. Los anticuerpos alternativos preferidos son RAM9, RAM4 y/o RAM0.

Las secuencias de estos anticuerpos se divulgan en el documento WO 2009/086920; véase además la lista de secuencias de la presente solicitud y lo siguiente:

SEQ ID NO: 1 para la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de RAB9:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRSSQRIM TYLNWYQKPK GKAPKLLIFV ASHSQSGVPS RFRGSGSETD
FTLTISGLQP EDSATYYCQQ SFWTPLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY
PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN
RGEC,

SEQ ID NO: 2 para la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de RAB4:

DIQMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQGV SSSLAWYQK PGQAPRLLIY GTSSRATGIP DRFGSGASGT
DFTLTISRLQ PEDFAVYYCQ QYGRSLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY
PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN
RGEC,

SEQ ID NO: 3 para la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de RAB0:

DIQMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQGV SSSLA WYQQK PGQAPRLLIY GTSSRATGIP DRFSGSASGT
DFTLTISR LQ PEDFAVYYCQ QYGRSLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY
PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN
RGE C,

SEQ ID NO: 4 para la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de RAB2:

DIQMTQSPVT LSLSPGERAT LSCRASQSVR SSYLA WYQQK PGQTPRLLIY GASNRATGIP DRFSGSGSGT
DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGNLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY
PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN
RGE C,

5

SEQ ID NO: 5 para la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de RAB9:

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYSMNWVRQA PGKGLEWVSS
IGSSGGTTY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAGSQ
WLYGMDVWGQ GTTVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY
FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVTVTP SSSLGKTYT
CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM
ISRTPEVTCV VDV SQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV
VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P
PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSDG
SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCVMHEAL HNHYTQKSLS LSLGK,

10

SEQ ID NO: 6 para la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de RAB4:

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYAMDWVRQA PGKGLEWVSG
IVPSGGFTKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN
VIAVAGTGY YGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSEST A
ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS
SSLGKTYTC NV D HKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF
PPKPKDTLMI SRTPEVTCV VDV SQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP
REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSDGS FFLYSRLTV D KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
SLGK,

SEQ ID NO: 7 para la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de RAB0:

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS WYAMDWVRQA PGKGLEWVSG
IYPSGGRTKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN
VIAVAGTGY YGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSEST A
ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS
SSLGKTYTC NV D HKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF
PPKPKDTLMI SRTPEVTCV VDV SQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP
REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSDGS FFLYSRLTV D KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
SLGK,

15

SEQ ID NO: 8 para la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de RAB2:

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYAMDWVRQA PGKGLEWVSG IVPSGGFTKY ADSVKGRFTI
SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN VIAVAGTGY YGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP
CSRSTSESTA

ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS
SSLGKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP
REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
SLGK,

SEQ ID NO: 9 para la secuencia de aminoácidos de RAM0hc:

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS WYAMDWVRQA PGKGLEWVSG IYPSGGRTKY ADSVKGRFTI
SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN VIAVAGTGY YGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP
SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS
SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT
CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK,

5

SEQ ID NO: 10 para la secuencia de aminoácidos de RAM0lc:

DIQMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQGV SSSLAWYQK PGQAPRLLIY GTSSRATGIP DRFSGSASGT
DFTLTISRLQ PEDFAVYQCQ QYGRSLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY
PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN
RGEK,

SEQ ID NO: 11 para la secuencia de aminoácidos de RAM9hc:

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYSMNWVRQA PGKGLEWVSS IGSSGGTTY ADSVKGRFTI
SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAGSQ WLYGMDVWGQ GTTVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT
AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVTVP SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNT KVDKRVKPS CDKHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH
DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA
KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK,

10

SEQ ID NO: 12 para la secuencia de aminoácidos de RAM9lc:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQIRM TYLNWYQKPK GKAPKLLIFV ASHSQSGVPS RFRGSGSETD
FTLTISGLQP EDSATYYCQ SFWTPLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY
PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN
RGEK,

15

SEQ ID NO: 13 para la secuencia de aminoácidos de RAM4hc:

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYAMDWVRQA PGKGLEWVSG IVPSGGFTKY ADSVKGRFTI
 SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN VIAVAGTGY YYGMDVWQGG TTVTVSSAST KGPSVFLAP
 SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKHTCPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK
 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD SGGFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
 ALHNHYTQKS LSLSPGK,

SEQ ID NO: 14 para la secuencia de aminoácidos de RAM4lc:

DIQMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQGV SSSLAWYQK PGQAPRLLIY GTSSRATGIP DRFSGSASGT
 DFTLTISRLQ PEDFAVYYCQ QYGRSLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY
 PREAQVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN
 RGEC.

El anticuerpo anti-MIF de la invención es preferiblemente un anticuerpo monoclonal aislado. El anticuerpo anti-MIF puede ser una molécula IgG, IgM, IgE, IgA o IgD. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-MIF es una subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En otras realizaciones, el anticuerpo es la subclase IgG1 o IgG4. En otras realizaciones, el anticuerpo es la subclase IgG4. En algunas realizaciones, el anticuerpo IgG4 tiene una única mutación que cambia la serina (serina 228) a prolina. En consecuencia, la subsecuencia CPSC en la región Fc de IgG4 se convierte en CPPC, que es una subsecuencia en IgG1 (Angal *et al.* Mol Immunol. 1993, 30, 105-108).

Además, la producción de anticuerpos anti-(ox)MIF puede incluir cualquier método conocido en la técnica para la purificación de un anticuerpo, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de afinidad. En una realización, el anticuerpo anti-(ox)MIF puede purificarse por cromatografía de exclusión molecular.

Los términos “región central” y “región C-terminal” de MIF se refieren a la región de MIF humano que comprende los aminoácidos 35-68 y aa 86-115, respectivamente, preferiblemente aa 50-68 y aa 86 a 102 de MIF humano, respectivamente.

Los anticuerpos particularmente preferidos de la presente invención se unen o bien a la región de aa 50-68 o bien a la región de aa 86-102 de MIF humano. Esto también se refleja en la unión del epítipo de los anticuerpos preferidos RAB0, RAB4 RAB2 y RAB9, así como RAM4, RAM0 y RAM9 que se unen de la siguiente manera:

RAB4 y RAM4:	aa 86-102
RAB9 y RAM9:	aa 50-68
RAB0 y RAM0:	aa 86-102
RAB2:	aa 86-102

Por tanto, RAM4 y RAB4 tienen la misma especificidad que RAM9 y RAB9. Lo mismo es cierto para RAM0 y RAB0. Esto también se refleja en los ejemplos llevados a cabo que muestran que se obtendrán resultados similares con estos anticuerpos.

El término “epítipo” incluye cualquier determinante de proteína capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o un fragmento de anticuerpo. Los determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas como tales aminoácidos expuestos, amino azúcares u otras cadenas laterales de hidratos de carbono y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

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

El término “célula huésped” se refiere a una línea celular, que es capaz de producir una proteína recombinante después de introducir un vector de expresión. El término “línea celular recombinante” se refiere a una línea celular en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que “línea celular recombinante” significa no sólo la línea celular particular sino también la progenie de dicha línea celular. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en las generaciones siguientes debido a mutaciones o influencias

ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula madre, pero aun así se incluyen dentro del alcance del término "línea celular recombinante" tal como se usa en el presente documento.

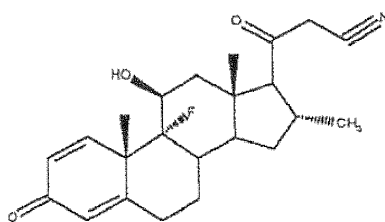
El tipo de célula huésped según la presente invención es, por ejemplo, una célula COS, una célula CHO o, por ejemplo, una célula HEK293, o cualquier otra célula huésped conocida por un experto en la técnica, por lo que también incluye, por ejemplo, células bacterianas, como por ejemplo células de *E. coli*. En una realización, el anticuerpo anti-MIF se expresa en una línea de células CHO deficiente en DHFR, por ejemplo, DXB11, y con la adición de G418 como marcador de selección. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican para genes de anticuerpos se introducen en células huésped CHO, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en que se hacen crecer las células huésped.

Los anticuerpos anti-(ox)MIF pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos convencionales de purificación de proteínas.

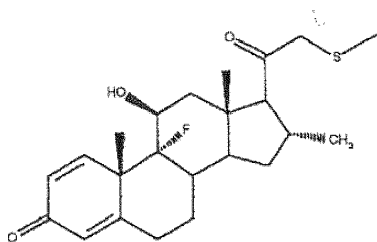
El segundo principio activo de la terapia de combinación proporcionada por la presente invención es un glucocorticoide. Los glucocorticoides, a veces también denominados glucocorticosteroides, son una clase de hormonas esteroideas que se unen al receptor de glucocorticoides (receptor de glucocorticoides α), que está presente en casi todos los animales vertebrados.

Los glucocorticoides forman parte del mecanismo de retroalimentación del sistema inmunitario que reduce la actividad inmunitaria, es decir, la inflamación. En medicina, se usan para tratar enfermedades que están provocadas por un sistema inmunitario hiperactivo, por lo que son ejemplos de tales enfermedades las alergias, el asma, las enfermedades autoinmunitarias y la septicemia. También interfieren con algunos de los mecanismos anómalos en las células cancerosas, por lo que también se usan para tratar el cáncer. Al unirse al receptor de glucocorticoides, el complejo del receptor de glucocorticoides activado regula la expresión de proteínas antiinflamatorias en el núcleo mediante un proceso conocido como transactivación y reprime la expresión de proteínas proinflamatorias en el citosol. En principio, los glucocorticoides se definen como un subgrupo de corticoesteroides. Además, se conoce una nueva clase de compuestos con actividad glucocorticoide (SEGRA, agonistas selectivos del receptor de glucocorticoides).

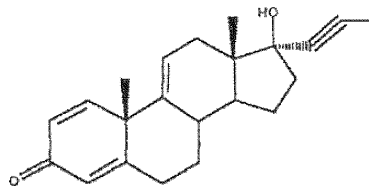
Estos compuestos ejercen sólo algunas de las acciones de los glucocorticoides agonistas completos, es decir, no logran obtener el espectro completo de transactivación, transrepresión y acciones indirectas sobre la inducción génica (a través de NF- κ B, AP1, homodímeros jun-jun, etc.). Por analogía con moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM = tamoxifeno, raloxifeno, toremifeno), estos compuestos también se denominan moduladores selectivos del receptor de glucocorticoides (SEGRM). Los ejemplos de SEGRA/SEGRM incluyen mapracorat (= BOL303242X = ZK245186), compuesto A, RU24856, RU24782, RU40066, ZK 216348. Todos estos compuestos se han descrito en la técnica y ya los conoce bien el experto en la técnica. Véase en particular el artículo de revisión De Bosscher *et al*, 2010, Curr Opin Pharmacol 10: 497-504 para una visión general. Los documentos RU 24856, RU 40066 y RU 24782 se describen, por ejemplo, en Vayssiere *et al*, 1997, Mol Endocrinol 11: 1245-1255. Estas son las fórmulas químicas respectivas:



RU 24858



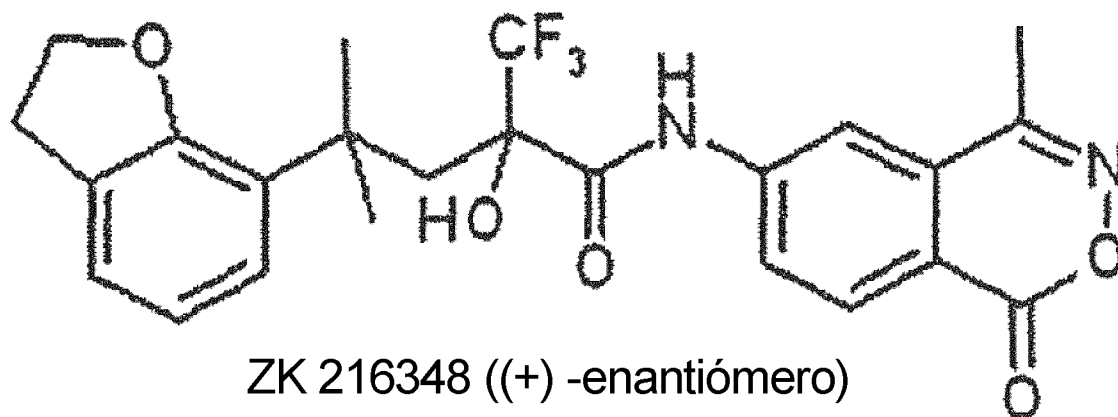
RU 24782



RU 40066

ZK245186 se describe en Proksch *et al*, 2011, Drug Metab Dispos 39: 1181-1187 y en Schäcke *et al*, 2009, Br J Pharmacol, 158 (4): 1088-103. Tiene la siguiente fórmula: (R)-1,1,1-trifluoro-4-(5-fluoro-2,3-dihidrobenzofuran-7-il)-4-

metil-2-[[[(2-metil-5-quinolil)amino]metil]pentan-2-ol. ZK 216348 se conoce de Schäcke *et al.*, 2004, PNAS USA 101: 227-232. Tiene la siguiente fórmula química:



El compuesto A se divulga en Rauner *et al.*, 2011, Endocrinology 152: 103-112 así como en De Bosscher K, Vanden Berghe W, Beck IM, Van Molle W, Hennuyer N, Hapgood J, Libert C, Staels B, Louw A, Haegeman G, 2005, A fully dissociated compound of plant origin for inflammatory gene repression. Proc Natl Acad Sci USA 102: 15827-15832. El compuesto A tiene la fórmula cloruro de 2-(4-acetoxifenil)-2-cloro-N-metil-etilamonio.

Un ejemplo importante de un glucocorticoide es el cortisol (o hidrocortisona), que es esencial para la vida y regula o apoya una variedad de funciones cardiovasculares, metabólicas, inmunológicas y homeostáticas importantes. También hay varios glucocorticoides sintéticos disponibles.

Los glucocorticoides actúan en tres campos principales, es decir, el campo de desarrollo inmunológico, metabólico y fetal. En el campo inmunitario, regulan por incremento la expresión de proteínas antiinflamatorias y regulan por disminución la expresión de proteínas proinflamatorias. Los efectos metabólicos pueden resumirse de la siguiente manera:

- Estimulación de la gluconeogénesis, particularmente en el hígado: esta ruta da como resultado la síntesis de glucosa a partir de sustratos no hexosa tales como aminoácidos y glicerol a partir de la descomposición de triglicéridos y es particularmente importante en carnívoros y determinados herbívoros. Potenciar la expresión de enzimas implicadas en la gluconeogénesis es probablemente la función metabólica mejor conocida de los glucocorticoides.
- Movilización de aminoácidos de tejidos extrahepáticos: sirven como sustratos para la gluconeogénesis.
- Inhibición de la captación de glucosa en tejido muscular y adiposo: los ácidos grasos liberados por la lipólisis se usan para la producción de energía en tejidos como el músculo, y el glicerol liberado proporciona otro sustrato para la gluconeogénesis.

En el desarrollo fetal, los glucocorticoides promueven la maduración del pulmón y la producción del tensioactivo que es necesario para la función pulmonar extrauterina. Son otras sustancias clave para el desarrollo normal del cerebro. Se ha creado una variedad de glucocorticoides sintéticos, algunos mucho más potentes que el cortisol, para uso terapéutico.

Se diferencian en farmacocinética (factor de absorción, semivida, volumen de distribución, aclaramiento) y en farmacodinámica.

En el contexto de la presente invención, "glucocorticoides" significará todos los glucocorticoides que actúan en el receptor alfa de glucocorticoides. En particular, esto abarca los agonistas de receptor de glucocorticoides "clásicos", así como los SEGRA descritos anteriormente. En una realización preferida, se abarcan todos esos glucocorticoides que actúan a través de la ruta NF- κ B y/o la ruta AP-1. En una realización preferida adicional, los glucocorticoides de la invención son todos glucocorticoides ("clásicos").

Teóricamente, en algún momento en el futuro puede haber, aunque sea poco probable, glucocorticoides que sólo actúen, por ejemplo, por medio de transactivación o transrepresión, pero no actúen por medio de la ruta NF- κ B. En una realización preferida, estos compuestos no estarían abarcados por la presente invención.

NF- κ B es el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. Es un factor de transcripción específico, que existe en prácticamente todos los tipos de células y tejidos. Al unirse a regiones

reguladoras particulares del ADN, puede influir en la transcripción de genes diana, como los genes antiapoptóticos, la familia de genes de la caspasa y, en particular, la ciclooxigenasa-2 (Cox-2), IL-6 y TNF-alfa.

La potencia de los glucocorticoides, la duración del efecto y la superposición de la potencia de los mineralocorticoides varían. El cortisol (hidrocortisona) es la comparación convencional para la potencia de los glucocorticoides. La hidrocortisona es el nombre usado para las preparaciones farmacéuticas de cortisol. La potencia oral puede ser menor que la potencia parenteral ya que cantidades significativas (hasta el 50% en algunos casos) pueden no absorberse en el intestino.

Ejemplos de glucocorticoides preferidos de la presente invención son:

hidrocortisona, acetato de cortisona, cortisona/cortisol, fluorocortolona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona (particularmente para administración sistémica), triamcinolona, dexametasona, betametasona, parametasona, budesonida (particularmente para administración local), SEGRA (agonistas selectivos del receptores de glucocorticoides).

Además, hay compuestos que sólo imitan algunas pero no todas las acciones de los glucocorticoides; estos compuestos se denominan SEGRA (agonistas selectivos del receptor de glucocorticoides). Los ejemplos de SEGRA/SEGRM incluyen mapracorat (= BOL303242X = ZK245186), compuesto A, RU24856, RU24782, RU40066, ZK 216348. Los SEGRA normalmente ejercen sus efectos por medio de la ruta NFκ-B.

Esteroides principalmente para aplicación local (por ejemplo, pulverizador-pulmón, supositorio-colon, crema-piel): hidrocortisona, beclometasona, budesonida, fluticasona, flunisolida, mometasona, ciclesonida, clobetasona, más preferiblemente budesonida.

En una realización preferida adicional, el glucocorticoide se selecciona del grupo que consiste en hidrocortisona, acetato de cortisona, budesonida, fludrocortisona, dexametasona, prednisolona y/o metilprednisolona.

Se prefieren particularmente (metil)prednisolona, hidrocortisona y dexametasona, incluso más preferiblemente (metil)prednisolona para administración sistémica. La hidrocortisona puede preferirse para una aplicación tópica en una realización de la invención. En una realización preferida adicional, se prefiere la budesonida para administración local.

Las sales, los ésteres y/o los isómeros de los glucocorticoides están comprendidos en el alcance de la presente invención y se entenderán comprendidos dentro del término "glucocorticoides". Todos se conocen bien o pueden prepararse mediante métodos bien conocidos.

Fue muy sorprendente encontrar que la producción de MIF de macrófagos y células T fue inducida en lugar de inhibida por glucocorticoides en roedores (Calandra T, Bernhagen J, Metz CN *et al.*, (1995) MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377: 68-71; y Bacher M, Metz CN, Calandra T, *et al.*, (1996) An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *PNAS* 93: 7849-7854).

Como se conocía que el MIF tiene propiedades proinflamatorias, estos resultados parecieron al principio paradójicos y difíciles de conciliar. Posteriormente, sin embargo, se descubrió que el MIF anula en efecto los hechos inmunosupresores antiinflamatorios de los glucocorticoides.

Cualquier glucocorticoide dado conocido por un experto en la técnica puede usarse en el contexto de la presente invención; estos pueden ser los glucocorticoides a modo de ejemplo mencionados anteriormente. Además, la síntesis de un glucocorticoide se conoce de nuevo bien en la técnica.

Se ha demostrado que los glucocorticoides tienen éxito en el alivio y el tratamiento de varias enfermedades. Sin embargo, la mayoría de los glucocorticoides están asociados con una variedad de efectos secundarios, tal como, por ejemplo, se describió anteriormente, que en algunos casos son extremos, en la medida en que el tratamiento debe derogarse. En cualquier caso, los efectos secundarios suponen una carga adicional para la salud física y mental de un paciente y, por tanto, deben evitarse en la medida de lo posible.

Con la presente invención, al combinar un glucocorticoide con un anticuerpo anti-MIF, ahora es posible reducir la cantidad del glucocorticoide, que es necesaria para un tratamiento dado en comparación con una situación en la que el glucocorticoide se administra como único principio activo. Una posibilidad adicional habilitada por la presente invención es mantener la dosis del glucocorticoide en comparación con el glucocorticoide administrado solo y tener una respuesta al tratamiento mucho mayor en el paciente.

Los presentes inventores demostraron de manera bastante sorprendente que el efecto obtenido al combinar un glucocorticoide con un anticuerpo anti-MIF permitió una clara reducción de la dosis de glucocorticoide, mientras que todavía se podía mantener la misma respuesta al tratamiento.

Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una respuesta al tratamiento y se refiere a disminuir o mejorar o aliviar un estado dado. Los ensayos para determinar esto se conocen bien y pueden ser, por ejemplo, la determinación de la probabilidad o la duración de la supervivencia de un sujeto que tiene una enfermedad con la probabilidad o la duración de la supervivencia en otros sujetos que tienen la misma enfermedad o mediante la determinación del cambio de síntomas dentro de uno y el mismo paciente durante un período de tiempo.

Un ensayo adecuado es, por ejemplo, el ensayo de sedimentación globular; ensayos adicionales son aquellos tal como se describen en los presentes ejemplos. Glucocorticoides preferidos según la presente invención son acetato de cortisona, hidrocortisona, fludrocortisona, dexametasona, budesonida, prednisolona y/o metilprednisolona.

Particularmente preferidos son metilprednisolona, hidrocortisona y budesonida y dexametasona. Incluso más preferidos son (metil)prednisolona y dexametasona para administración sistémica y budesonida para administración tópica.

Las combinaciones particularmente preferidas son

- RAM9 en combinación con dexametasona,
- RAM9 en combinación con budesonida,
- RAM9 en combinación con hidrocortisona,
- RAM9 en combinación con prednisolona o metilprednisolona,
- RAM0 en combinación con dexametasona,
- RAM4 en combinación con dexametasona,
- RAM0 en combinación con budesonida,
- RAM4 en combinación con budesonida,
- RAM0 en combinación con prednisolona o metilprednisolona,
- RAM4 en combinación con prednisolona o metilprednisolona,
- RAM4 en combinación con hidrocortisona,
- RAM0 en combinación con hidrocortisona.

En una realización preferida particular, se usa hidrocortisona y budesonida para aplicación tópica/local.

Se señala explícitamente que, en el contexto de la presente invención, se abarca cada glucocorticoide adecuado que se conoce para el tratamiento de un estado patológico particular. Por tanto, en la realización más preferida, el glucocorticoide de la invención es un glucocorticoide que es el tratamiento de referencia respectivo para una enfermedad dada.

Las combinaciones preferidas anteriores se usan preferiblemente para el tratamiento de una enfermedad receptiva a glucocorticoides tal como se define a continuación en el presente documento.

La presente terapia de combinación es particularmente adecuada para el tratamiento de una enfermedad receptiva a glucocorticoides. La "enfermedad receptiva a los glucocorticoides" en el presente contexto se define como una enfermedad que responde a la terapia con glucocorticoides. Las enfermedades que se sabe que responden a la terapia con glucocorticoides se enumeran a continuación. Un experto en la técnica que considere la presente terapia de combinación consideraría esa terapia tan pronto como se enfrentara a un estado patológico para el cual habría considerado un tratamiento con un glucocorticoide.

Se sabe que tanto las enfermedades inflamatorias como determinados tipos de cáncer son enfermedades receptivas a los glucocorticoides.

Para ambos tipos de enfermedades existen terapias de referencia con glucocorticoides. El propósito de la presente invención es combinar la terapia anti-MIF con estas terapias de referencia con glucocorticoides. En algunos casos, también es posible reducir la dosificación de referencia de glucocorticoides, si es necesario debido a los efectos secundarios.

En una realización preferida, la enfermedad receptiva a los glucocorticoides es una enfermedad en la que se observa una mejora significativa de los valores de sedimentación en el ensayo de sedimentación globular. Una mejora significativa es una mejora considerada significativa por un experto en la técnica.

Las enfermedades particularmente preferidas que podrían tratarse con la presente terapia de combinación serían, por tanto: enfermedades inflamatorias, incluso más preferidas, las enfermedades inflamatorias serían aquellas enfermedades que actúan a través del sistema inmunitario adaptativo (es decir, a través de células B y T).

Incluso más preferida, la enfermedad receptiva a los glucocorticoides sería una enfermedad alérgica, incluso más preferida un trastorno autoinmunitario.

Se sabe que todas estas enfermedades responden a la terapia con glucocorticoides.

Enfermedades particularmente preferidas en el contexto de la presente invención son:

- nefritis, en particular glomerulonefritis, glomerulonefritis rápidamente progresiva (tipo I, II, III o IV), vasculitis sistémicas (por ejemplo, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, púrpura de Schoenlein Henoch, glomerulonefritis proliferativa aguda)
- nefritis lúpica, nefritis por ANCA, nefritis anti-GBM (por ejemplo, enfermedad de Goodpasture), nefropatía por IgA, nefropatía por IgM,
- lupus eritematoso
- respuestas inmunitarias mediadas por células T, por ejemplo, inflamación cutánea, como psoriasis o hipersensibilidad de contacto.
- EII, como colitis ulcerosa y Morbus Crohn
- esclerosis múltiple
- artritis reumatoide
- uveítis
- diabetes mellitus tipo 2
- asma bronquial
- dermatitis de contacto
- psoriasis
- dermatitis atópica
- pancreatitis
- pénfigo
- enfermedad de Sjögren
- enfermedad de Behcet
- enfermedad de Horton
- esclerodermia
- polimiositis

El efecto sinérgico se ha demostrado para las enfermedades receptivas a los glucocorticoides en los ejemplos a continuación. Los modelos seleccionados son particularmente adecuados ya que el efecto se muestra para una reacción antígeno-anticuerpo que sería mecánicamente igual para todas las enfermedades enumeradas

anteriormente.

Las posibles formas de dosificación previstas por la presente solicitud son comprimidos, cápsulas, sobres o píldoras. Los gránulos pueden usarse como tal como forma de dosificación preferida, pueden rellenarse en cápsulas o sobres o pueden comprimirse adicionalmente para dar comprimidos o píldoras.

Otras formas de dosificación que también se incluyen en la presente solicitud son bebidas o jarabes, elixires, tinturas, suspensiones, disoluciones, hidrogeles, películas, pastillas, chicles, comprimidos bucodispersables, enjuagues bucales, pasta de dientes, bálsamos labiales, champús medicados, suspensiones de nanoesferas y comprimidos de microesferas, así como pulverizadores, inhaladores, nebulizadores, formas para fumar o en polvo de base libre y formas de dosificación para aplicación tópica como cremas, geles, linimentos o bálsamos, lociones, pomadas, gotas para los oídos, gotas para los ojos y parches para la piel.

Además se abarcan supositorios que pueden usarse, por ejemplo, por vía rectal o vaginal. Todas estas formas de dosificación las conoce bien un experto en la técnica.

Formas de dosificación preferidas según la presente invención son formas orales como gránulos, gránulos recubiertos, comprimidos, comprimidos con recubrimiento entérico, gránulos, supositorios y emulsiones. Incluso más preferidos son los gránulos y comprimidos. Otras formas de dosificación preferidas son formas de dosificación parenteral o tópica. Una vía de administración preferida particular para el anticuerpo anti-MIF es una aplicación subcutánea o intravenosa. Una vía de administración preferida para el glucocorticoide es la aplicación oral (por ejemplo, un gránulo, líquido, sobre o comprimido). Una forma de aplicación preferida adicional para el glucocorticoide es la aplicación tópica, en la que una aplicación tópica puede abarcar una aplicación a la piel y/o un pulverizador, como un pulverizador nasal o inhalador. Una vía de administración preferida adicional para un glucocorticoide es una aplicación intravenosa.

Varios glucocorticoides que se comercializan como antiinflamatorios son a menudo formulaciones tópicas, tales como pulverizadores nasales para la rinitis o inhaladores para el asma. Estas preparaciones tienen la ventaja de afectar solo al área objetivo, reduciendo así los efectos secundarios o posibles interacciones. Los compuestos típicos son beclometasona, budesonida, fluticasona, flunisolida, clobetasona, mometasona y ciclesonida. Para el asma, los glucocorticoides se administran como medicamentos inhalatorios con un inhalador dosificador o de polvo seco. Por tanto, tales formulaciones también son realizaciones preferidas de la presente invención.

La administración puede ser mediante todas las vías conocidas.

Los términos “combinación” o “terapia de combinación” se usan de manera intercambiable en el presente documento. Se refieren a un régimen de dosificación en el que el anticuerpo anti-MIF se administra junto con el glucocorticoide o viceversa. El régimen de dosificación sería normalmente diario para los glucocorticoides y cada 2 semanas para el anticuerpo anti-MIF. Los regímenes de dosificación preferidos son:

Tal como se explicó anteriormente, es posible administrar el anticuerpo anti-MIF junto con el glucocorticoide o de manera secuencial. “Junto con” en este contexto significa que no hay más de 10 minutos entre la administración del anticuerpo anti-MIF y la administración del glucocorticoide. “De manera secuencial” significa que han pasado más de 10 minutos entre la administración del anticuerpo anti-MIF y la administración del glucocorticoide. El período de tiempo puede ser de más de 10 minutos, más de 30 minutos, más de 1 hora, más de 3 horas, más de 6 horas o más de 12 horas.

El anticuerpo anti-MIF y el esteroide se dosifican principalmente para garantizar que ambos compuestos estén presentes en el cuerpo durante el mismo período de tiempo (durante un período de tiempo determinado). Un anticuerpo anti-MIF tiene una semivida de normalmente 2 - 4 semanas, los esteroides una semivida de 6-24 horas,

Por tanto, la terapia de combinación anterior también abarca explícitamente un régimen de dosificación secuencial en el que el experto tiene en cuenta la semivida bien conocida del glucocorticoide respectivo en cuestión y el anticuerpo en cuestión. En vista del hecho de que los anticuerpos tienen generalmente una semivida de 2 - 4 semanas, la administración del anticuerpo en cuestión podría ser sólo cada 2 semanas, cada 3 semanas o una vez al mes. El glucocorticoide que va a administrarse en la terapia de combinación de la invención con un anticuerpo de este tipo tiene, en una realización típica, una semivida de 6 - 24 h; por tanto, la administración del glucocorticoide podría ser cada 5 horas, cada 6 horas, tres veces al día, dos veces al día o una vez al día en una realización típica.

Tabla 1: dosificación de dexametasona - comparación rata/ratón/humano

Esteroides	dosificación en ratas mg/kg/día	dosificación correspondiente en ratones mg/kg/día	dosificación humana correspondiente mg/kg/día (mg/adulto/día)
Dexametasona	0,025	0,05	0,0041 (0,25-0,5)

	0,075	0,15	0,012 (0,7-1,5)
	0,25	0,5	0,041 (2,5-5,0)

“La regla de los cinco”, que la conoce bien un experto en la técnica de los esteroides, puede usarse para calcular los programas de dosificación entre diferentes glucocorticoides, tal como sigue: 1 mg de dexametasona equivale a aproximadamente 5 mg de prednisolona, que a su vez equivale a aproximadamente 25 mg de cortisona.

5 La “dosis alta” mencionada anteriormente se administraría normalmente en un caso en el que un trastorno agudo deba tratarse de la manera más eficaz posible. Normalmente no se administra para un programa de dosificación más duradero de mayor duración.

10 Sin embargo, la dosificación de glucocorticoides, así como la dosificación combinada con anticuerpos, según la presente invención, deberá determinarse por el médico caso por caso según el trastorno específico a tratarse y los detalles del sujeto afectado.

15 Sólo como ejemplo, que de ninguna manera debe interpretarse como limitativo de la presente invención, normalmente habría dos opciones para el tratamiento de la nefritis:

1) 500 mg de metilprednisolona/día durante 3 días (dosis alta); seguido de prednisolona administrada por vía oral máx. 30 mg/día (dosis baja), o

20 2) prednisolona administrada por vía oral, máx. 60 mg/día (dosis media), que luego se reduce con el tiempo (que puede tardar hasta 6 meses).

De nuevo, la invención está dirigida al experto en la técnica que determinará la dosificación necesaria tanto de glucocorticoides como de anticuerpos anti-MIF basándose en su conocimiento, por ejemplo, según las pautas de tratamiento respectivas, por ejemplo, las pautas de los NIH.

En una realización particularmente preferida, el principio activo sería un principio que debería administrarse con una liberación controlada, por ejemplo, una liberación retardada. Es decir, las formas de dosificación que pueden administrarse por vía oral de la presente invención que comprenden un principio activo de este tipo, podrían dotarse de un recubrimiento. Por tanto, en una realización preferida, la presente invención se refiere a gránulos con recubrimientos y, en particular, a gránulos que comprenden principios activos que se liberarán de manera controlada, por lo que estos gránulos tienen un recubrimiento.

Más preferido, este recubrimiento es un recubrimiento farmacológicamente aceptable y particularmente preferido es un recubrimiento entérico, un recubrimiento de liberación prolongada o un recubrimiento de liberación retardada; todos estos recubrimientos los conoce bien un experto en la técnica.

Un subconjunto de AcM anti-MIF protectores *in vivo* (por ejemplo, RAB9, RAB4, RAB0, RAM9, RAM4, RAM0), que se dirigen contra el MIF de citocinas proinflamatorias (factor inhibidor de la migración de macrófagos) no se unen al MIF no modificado en su estado reducido. Por el contrario, se demostró que estos AcM son altamente selectivos para una isoforma de MIF dependiente de redox.

Un anticuerpo particularmente preferido es el anticuerpo RAB9.

Otro anticuerpo particularmente preferido es el anticuerpo RAB4.

Aún otro anticuerpo particularmente preferido es el anticuerpo RAB0.

Un anticuerpo particularmente preferido es el anticuerpo RAM9.

Otro anticuerpo particularmente preferido es el anticuerpo RAM4.

Aún otro anticuerpo particularmente preferido es el anticuerpo RAM0.

Tal como se muestra en la presente invención, la terapia de combinación propuesta en el presente documento es ventajosa porque da como resultado el sorprendente efecto sinérgico de ambos componentes. En vista de los enormes efectos secundarios encontrados por el tratamiento con glucocorticoides, la presente invención es muy adecuada para proporcionar un tratamiento alternativo que mejorará la situación del paciente bajo tratamiento. Simultáneamente, la reducción de los efectos secundarios también mejorará el cumplimiento del paciente, lo cual es de gran importancia en particular en las enfermedades crónicas. Finalmente, la presente invención permite al médico aumentar los resultados obtenidos con altas dosis de glucocorticoides aún más, lo que puede salvar inmediatamente la vida en estados patológicos particulares y en circunstancias particulares.

La presente invención se describirá a continuación a modo de ejemplos, por lo que los ejemplos no se considerarán limitativos de la presente invención.

Ejemplos de referencia

A) Ensayo de GCO para la detección de anticuerpos:

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

B) Ensayo para la determinación de valores de CI_{50}

El procedimiento experimental se lleva a cabo tal como se describe para el ensayo de detección con la excepción de que se usan cantidades crecientes de anticuerpos (normalmente de 1 a 125 nM). La curva de respuesta a la dosis resultante se expresa como % de inhibición en comparación con un anticuerpo de control negativo. Esta curva se usa para calcular el efecto inhibitor máximo del anticuerpo (% inh. máx.) y la concentración de anticuerpo que muestra el 50% del efecto inhibitor máximo (CI_{50}).

C) Inhibición de la proliferación celular

El suero estimula la secreción de MIF en NIH/3T3 latentes y MIF a su vez estimula la proliferación celular. Los anticuerpos que inhiben este MIF endógeno, por tanto, disminuyen la proliferación de células NIH/3T3 latentes. La reducción de la proliferación se determina mediante la incorporación de 3H -timidina.

Se incuban 1000 células NIH/3T3 por pocillo en una placa de 96 pocillos durante el fin de semana a 37°C en medio que contenía suero al 10%. Se mataron de hambre células durante la noche a 37°C por incubación en medio que contenía suero al 0,5%. Se retira el medio al 0,5% y se reemplaza por medio nuevo que contiene suero al 10%, anticuerpo 75 μ g/ml y 3H -timidina 5 μ Ci/ml. Después de 16 horas de incubación en una incubadora de CO_2 a 37°C, las células se lavan dos veces con 150 μ l de PBS frío por pocillo. Usando una pipeta multicanal, se añaden 150 μ l de una disolución de TCA al 5% (p/v) por pocillo y se incuban durante 30 minutos a 4°C. Las placas se lavan con 150 μ l de PBS. Por pocillo, se añaden 75 μ l de una disolución de NaOH 0,5 M con SDS al 0,5%, se mezclan y se almacenan a temperatura ambiente. Se miden las muestras en un contador β mezclando 5 ml de Ultima Gold (Packard) y 75 μ l de disolución de muestra. Cada determinación se realiza por triplicado y los valores se comparan con los valores del anticuerpo de control mediante una prueba de la t. Los anticuerpos que reducen significativamente la proliferación ($P < 0,05$) se evalúan como positivos.

D) Estudios de unión: determinación del epítipo de anticuerpos anti-MIF

Cada péptido se diluye en tampón de acoplamiento para dar una concentración de péptido de normalmente 1 μ g/ml añadido a las microplacas (NUNC Immobilizer™ Amino Plate F96 Clear) y se incuba durante la noche a 4°C (100 μ l/pocillo). Como controles se usan MIF y PBS recombinantes de longitud completa. La placa se lava 3 veces con 200 μ l de PBST y se añaden anticuerpos (2-4 μ g/ml en PBS) (100 μ l/pocillo) y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. La placa se lava 3 veces con 200 μ l de PBST y se añade anticuerpo de detección (por ejemplo, anticuerpo anti-IgG humana marcado con HRP específico de Fc, Sigma) (100 μ l/pocillo). Después de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave, la placa se lava 3 veces con 200 μ l de PBST. Cada pocillo se incuba con 100 μ l de disolución de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) (T-0440, Sigma) durante 30 minutos en la oscuridad. La reacción de tinción se detiene añadiendo 100 μ l de disolución de H_2SO_4 1,8 M por pozo. Las muestras se miden a 450 nm.

E) Determinación de afinidad de fragmentos Fab de anticuerpos anti-MIF mediante Biacore

Normalmente, se inmovilizan 40 unidades RU de MIF recombinante humano en un chip sensor con una matriz de CM5 (= dextrano carboximetilado) (Biacore). Se inyectan fragmentos Fab a un intervalo de concentración normalmente de 6 a 100 nM diluido en HBS-EP. Después de cada ciclo, el chip se regenera con NaOH 50 mM + NaCl 1 M. Las afinidades se calculan según el modelo de Langmuir 1:1.

Ejemplos

Introducción:

La terapia de enfermedades que usa fármacos glucocorticoides a menudo se ve obstaculizada por efectos secundarios graves o un aumento requerido de la dosificación. En esta invención, se describe que la efectividad de los compuestos de glucocorticoides (por ejemplo, dexametasona, hidrocortisona o prednisolona) puede aumentarse mediante la combinación con un anticuerpo anti-oxMIF. Una combinación de este tipo tiene el potencial de dar como resultado una terapia mejorada de tales trastornos en comparación con la monoterapia respectiva e incluso prolongar significativamente la esperanza de vida de los pacientes.

En particular, con la presente invención se logra lo siguiente:

- pueden administrarse dosis más bajas de glucocorticoides para lograr el mismo efecto con una dosificación anteriormente más alta, lo que da como resultado menos efectos secundarios
- se encontrará una mayor eficacia con una dosificación idéntica de glucocorticoides
- pueden administrarse dosificaciones altas de glucocorticoides si se desea y tendrán un efecto terapéutico potenciado.

NEFRITIS

Ejemplo 1: modelo animal para glomerulonefritis con semilunas:

Este modelo se reconoce en la técnica como predecible para mostrar los efectos de la invención. Es adecuado para mostrar los efectos de la terapia de combinación en toda la gama de enfermedades que pueden incluirse bajo la definición anterior de "enfermedades relacionadas con MIF" en particular, este modelo es adecuado para las siguientes enfermedades: nefritis lúpica, nefritis anti-GBM, nefritis por ANCA, nefropatía por IgA. La dexametasona se reconoce en la técnica como predictiva de un glucocorticoide respectivo en el tratamiento de un humano. Por ejemplo, un glucocorticoide preferido para el tratamiento de la nefritis lúpica en un humano sería la metilprednisolona.

El efecto del anticuerpo monoclonal anti-MIF (AcM) y su combinación con dexametasona se examina en la nefritis nefrotóxica mediada por inmunidad (NTN) en ratas Wistar Kyoto (WKY). Este modelo tiene un inicio rápido de la enfermedad con infiltración de macrófagos, deposición de fibrina y destrucción de tejido. Se induce NTN en ratas WKY macho mediante inyección intravenosa única de 0,1 ml de suero de conejo anti-membrana basal glomerular de rata (día 0). El AcM y la dexametasona se inyectan por vía intraperitoneal en los puntos de tiempo y las dosificaciones que se describen a continuación. Se recogen muestras de orina de 24 horas usando jaulas metabólicas antes de la inducción de la glomerulonefritis y en diversos intervalos de tiempo después de la inducción de nefritis para la cuantificación de la proteinuria. Se congelan secciones de tejidos renales para su posterior análisis mediante inmunohistología. La morfología de la lesión renal se evalúa en secciones de tejido renal teñido con hematoxilina/eosina (H&E) y ácido peryódico de Schiff. El macrófago se detecta mediante la técnica de inmunoperoxidasa y usando el anticuerpo monoclonal de ratón ED1 (Serotec, UC). El modelo animal se describió en detalle (Tam FWK, Smith J, Morel D, Karkar AM, Thompson EM, Cook HT, Pusey CD: Development of scarring and renal failure in a rat model of crescentic glomerulonephritis. Nephrol Dial Transplant 14: 1658-1666, 1999).

Dosificación de anticuerpos anti-MIF

Intervalo de dosis de anticuerpo anti-MIF para terapia humana:

0,2 - 25 mg/kg

Intervalo de dosis preferido para terapia humana: 1-10 mg/kg

Los anticuerpos anti-MIF son 10 veces más potentes en la inhibición de MIF humano que MIF de ratón o rata basándose en ensayos *in vitro* (ensayo de quimiocinesis) y mediciones de afinidad. Por tanto, el intervalo de dosis del experimento de nefritis (experimento 1c) de 2-120 mg/kg en la rata corresponde a 0,2 - 12 mg/kg en el ámbito humano.

El efecto terapéutico potenciado mediante la combinación de un antagonista de MIF con esteroides se demuestra en un modelo de rata para la glomerulonefritis con semilunas. Se usan diferentes concentraciones de dexametasona en un experimento preliminar para encontrar una dosis de esteroides subóptima (ejemplo 1a; en la figura 1 se representa un diagrama esquemático del experimento; los resultados se muestran en las figuras 2-4). En un segundo experimento preliminar, se confirma la efectividad de un antagonista de MIF (anticuerpo anti-MIF RAM9) (ejemplo 1b). Finalmente, se combina una dosis subóptima de dexametasona con dicho anticuerpo (ejemplo 1c) y esta combinación da como resultado una reducción notablemente mejorada de los parámetros de la enfermedad. El

efecto beneficioso observado en esta terapia de combinación corresponde al efecto que se logra con una dosis de esteroides más de 10 veces mayor.

Ejemplo 1a:

Resumen (véase también la figura 1)

- El tratamiento se administra 4 días después de la inducción de glomerulonefritis en ratas WKY
 - la gravedad de la lesión renal se evalúa después de la recogida de orina durante la noche (día 7 a día 8) y después del sacrificio selectivo de los animales el día 8 (véase la figura 1)
 - la inyección intraperitoneal única de dexametasona 0,25 mg/kg reduce la proteinuria en aproximadamente un 50% (figura 2), la infiltración de macrófagos glomerulares en aproximadamente un 53% (figura 3) y los recuentos de semilunas en aproximadamente un 25% (figura 5).
- 0,025 mg/kg se determina como concentración subóptima de dexametasona
- 0,025 mg/kg se considera apropiado para estudiar un posible efecto del anticuerpo RAM9

Ejemplo 1b:

Resumen (véase también la figura 4)

- El tratamiento se administra 4 y 6 días después de la inducción de glomerulonefritis en ratas WKY
- la gravedad de la lesión renal se evalúa después de la recogida de orina durante la noche (día 7 a día 8) y después del sacrificio selectivo de los animales el día 8 (figura 5)
- la inyección intraperitoneal del anticuerpo RAM9 reduce
 - albuminuria (figura 6 y figura 10): 60 mg/kg: aprox. el 22%, 120 mg/kg: aprox. el 25%
 - infiltración de macrófagos (figura 7 y figura 11): 60 mg/kg: aproximadamente el 26%, 120 mg/kg: aproximadamente el 38%
 - Recuentos de semilunas (figura 8 y figura 12): 60 mg/kg: aproximadamente el 10%, 120 mg/kg: aproximadamente el 12%
- además, MIF, $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ se reducen en la orina.

Ejemplo 1c:

Resumen (véase la figura 9)

- El tratamiento se administra 4 días (dexametasona + anticuerpo) y 6 días (anticuerpo solo) después de la inducción de glomerulonefritis en ratas WKY
- la gravedad de la lesión renal se evalúa después de la recogida de orina durante la noche (día 7 a día 8) y después del sacrificio selectivo de los animales el día 8 (figura 9)
- la combinación del anticuerpo RAM9 y la dexametasona muestra fuertes efectos sinérgicos, véanse las figuras 10-12:
 - aparentemente, el efecto de la dexametasona se potencia > 10 veces

El modelo animal descrito ejemplifica el efecto beneficioso de una terapia de combinación de antagonistas y esteroides del MIF. El tratamiento con esteroides tiene una amplia gama de aplicaciones terapéuticas, pero muestra limitaciones generalizadas (efectos secundarios a dosis altas, resistencia a los esteroides, etc.). Una terapia de combinación de esteroides y anticuerpos de MIF tiene el potencial de abrir una nueva oportunidad de tratamiento general en pacientes con, por ejemplo, enfermedades inflamatorias, enfermedades infecciosas o cáncer.

Ejemplo 2

El siguiente modelo usa ratones NZB/NZW F1 que se reconocen en la técnica como un modelo experimental para el lupus eritematoso sistémico y la nefritis lúpica. Se reconoce que el tratamiento de estos ratones es predecible para el tratamiento de la nefritis lúpica y el lupus eritematoso sistémico.

El efecto terapéutico potenciado mediante la combinación de un antagonista de MIF con esteroides se demuestra en un modelo de ratón para nefritis lúpica. Se usan diferentes concentraciones de dexametasona en un experimento preliminar para encontrar una dosis de esteroides subóptima (experimento 2a). Finalmente, una dosis subóptima de dexametasona se combina con dicho anticuerpo (experimento 2b) y esta combinación da como resultado una reducción notablemente mejorada de los parámetros de la enfermedad.

Para estos experimentos se usan ratones híbridos NZB/NZW F1 adultos. Estos ratones desarrollan un trastorno inmunológico que se asemeja mucho al lupus eritematoso sistémico (LES) en el hombre. En ratones hembra, la enfermedad se manifiesta en aproximadamente 32-38 semanas de edad con proteinuria persistente y anticuerpos circulantes contra ácidos nucleicos.

Ejemplo 2a:

"Hallazgo de dosis de dexametasona en ratones híbridos NZB/NZW F1"

El objetivo es determinar una dosis subóptima de dexametasona para estudios de sinergia adicionales entre la terapia con esteroides y anticuerpos anti-MIF.

El establecimiento de la enfermedad en los ratones NZB/NZW F1 se controla y confirma midiendo proteinuria. Cuando los ratones muestran proteinuria, los animales se tratan i.p. con diferentes dosis de dexametasona o vehículo. Al final del experimento, los animales se sacrifican y los parámetros de lectura son proteinuria, número de macrófagos glomerulares e histología renal.

Grupo 1: Vehículo

Grupo 2: dexametasona 0,5 mg/kg

Grupo 3: dexametasona 1,0 mg/kg

Grupo 4: dexametasona 2,0 mg/kg

Grupo 5: control histológico

Ejemplo 2b:

"Sinergia entre el anticuerpo anti-MIF RAM9 y la dosis subóptima de dexametasona en ratones híbridos NZB/NZW F1"

Con este experimento se investiga el efecto sinérgico entre el anticuerpo RAM9 candidato a fármaco y una dosis subóptima de dexametasona. El establecimiento de la enfermedad en los ratones NZB/NZW F1 se monitoriza y confirma midiendo proteinuria. Cuando los ratones muestran proteinuria, los animales se tratan con esteroides y anticuerpo. Al final del experimento, los animales se sacrifican y los parámetros de lectura son proteinuria, número de macrófagos glomerulares e histología renal.

"Grupos de animales"

Grupo 1: control histológico

Grupo 2: anticuerpo de control BAX C3

Grupo 3: anti-MIF RAM9

Grupo 4: dexametasona + anticuerpo de control BAX C3

Grupo 5: dexametasona + anti-MIF RAM9

Tabla 2: resumen del experimento 2

Experimento 2	Anticuerpo	Esteroides
Nefritis lúpica	-	Valoración de dosis de dexametasona

Nefritis lúpica	RAM9	Dexametasona
-----------------	------	--------------

Enfermedades mediadas por células T

Ejemplo 3a

El modelo animal usado se refiere a una inducción de respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) a DNFB (2,4-dinitrofluorbenzol): los ratones C57Bl/6 se sensibilizan mediante la aplicación tópica de DNFB en el abdomen. Los ratones se exponen al pintar las orejas del ratón con disolución de DNFB. La gravedad de las respuestas inflamatorias se juzga mediante mediciones de calibre del grosor de la oreja a las 24 horas después de la exposición. Al mismo tiempo, se sacrifican los animales y se cortan las orejas y se conservan para análisis histológicos posteriores.

Este modelo animal se reconoce en la técnica como predictivo de enfermedades relacionadas con respuestas inmunitarias mediadas por células T, por ejemplo, inflamación cutánea, como psoriasis.

El programa de tratamiento es tal como sigue:

T = 0d: sensibilizar ratones

T = 5d: administrar terapia antiinflamatoria y exponer ratones.

T = 6d: cuantificar la hinchazón de las orejas, sacrificar ratones, recoger orejas para análisis histológicos adicionales

Los experimentos se llevan a cabo con el modelo descrito anteriormente para realizar una valoración de la dosis de dexametasona (de manera similar a la explicada en los ejemplos 1 y 2) y para determinar los efectos de una combinación de anticuerpo RAM9 e hidrocortisona (aplicación temática).

Todos los experimentos muestran un efecto sinérgico de la combinación.

Ejemplo 3b-d: hipersensibilidad de contacto

Material y métodos

Se determinó la respuesta de hipersensibilidad de contacto (CHS) a 2,4-dinitrofluorobenceno (DNFB) usando una modificación de un modelo anterior descrito (véase Ludwig, *et al.*, 2010, Am J Pathol 176, 1339-1345). Los ratones C57BL/6 se sensibilizaron tratando la piel de la espalda del ratón rasurada con 75 µl de disolución de DNFB (Sigma, St. Louis, MO) (el 0,5% en acetona/aceite de oliva, 4/1). En el día 5, los ratones se trataron con aplicación tópica de hidrocortisona (en orejas expuestas) o vehículo (en orejas no expuestas) e inyección intravenosa de anticuerpo anti-MIF RAM9 o anticuerpo de control de isotipo. 30 minutos después, las orejas derechas de los ratones se expusieron con 20 µl de DNFB al 0,3% para provocar una respuesta inflamatoria local. El aceite del vehículo (acetona/aceite de oliva) se aplicó a las orejas izquierdas como control. La respuesta de hinchazón a DNFB, especificada como la diferencia entre las orejas derecha e izquierda, se midió 24 h después de la prueba usando un micrómetro (Mitutoyo Co., Tokio, Japón). Se usaron 8 ratones por grupo.

Resultados

Ejemplo 3b: valoración de la dosis de hidrocortisona

En un primer experimento, se aplicaron tres dosis diferentes de hidrocortisona (al 0,3%, al 1% y al 3% en pomada de crema base DAC) sin aplicación de anticuerpo. El vehículo sin hidrocortisona sirvió como control negativo. Se encontró que la hidrocortisona al 1% es una concentración que produce efectos antiinflamatorios subóptimos en el modelo de dermatitis de contacto, tal como se determina midiendo el grosor de la oreja.

Ejemplo 3c: valoración de la dosis de anticuerpo anti-MIF RAM9:

En un segundo experimento, se aplicó anticuerpo anti-MIF RAM9 20 mg/kg sin hidrocortisona y se usó un anticuerpo de control de isotipo como control negativo. La hinchazón de la oreja, la medida principal en estos experimentos, se redujo significativamente en ratones tratados con anticuerpo anti-MIF en comparación con los ratones tratados con un anticuerpo de control de isotipo o solución salina. Como 20 mg/kg era una dosis altamente eficaz, se usó RAM9 10 mg/kg como dosis subóptima para el experimento posterior.

Ejemplo 3d: aplicación combinada de RAM9 (i.v.) e hidrocortisona (tópica)

Finalmente, los ratones se trataron con anticuerpo de control de isotipo 10 mg/kg o RAM9 solo o en combinación con

hidrocortisona (al 1% en crema base DAC). Los resultados se muestran en la figura 13. Los ratones tratados con anticuerpo de control de isotipo mostraron hinchazón de la oreja de aproximadamente 100 μ m. La aplicación tópica de una dosis subóptima de hidrocortisona en combinación con el anticuerpo de control de isotipo no redujo la hinchazón de la oreja. RAM9 10 mg/kg como monoterapia también dio un resultado similar al anticuerpo de control de isotipo. Sin embargo, el grosor de las orejas se redujo notablemente en el grupo que recibió ambos, RAM9 e hidrocortisona, y puede concluirse un efecto sinérgico de ambos fármacos para minimizar la hinchazón de la oreja.

Conclusión

En resumen, estos experimentos muestran evidencia de una sinergia terapéutica de dosis subóptimas de RAM9 e hidrocortisona en un modelo de ratón para dermatitis de contacto.

Lista de secuencias

<110> Baxter Healthcare S.A.
Baxter International Inc.

<120> TERAPIA DE COMBINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-MIF Y GLUCOCORTICOIDES

<130> 163 258

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de RAB9

<400> 1

ES 2 779 036 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Arg Ile Met Thr Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Val Ala Ser His Ser Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Trp Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

5 <210> 2
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cadena ligera de RAB4
 <400> 2

ES 2 779 036 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Ala Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

- 5 <210> 3
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Cadena ligera de RAB0
- <400> 3

ES 2 779 036 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ala Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

5 <210> 4
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cadena ligera de RAB2

<400> 4

ES 2 779 036 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Val Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Thr Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

- 5 <210> 5
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cadena pesada de RAB9
 <400> 5

ES 2 779 036 T3

Glu	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	Ile	Tyr	
			20					25					30			
Ser	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Ser	Ser	Ile	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	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	Gly	Ser	Gln	Trp	Leu	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			100					105					110			

ES 2 779 036 T3

Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	115	120	125
Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	130	135	140
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	145	150	155
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	165	170	175
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	180	185	190
Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	195	200	205
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	210	215	220
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	225	230	235
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	245	250	255
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	260	265	270
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	275	280	285
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	290	295	300
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	305	310	315
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	325	330	335
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	340	345	350
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	355	360	365

ES 2 779 036 T3

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 6

<211> 454

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cadena pesada de RAB4

<400> 6

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr
20 25 30

Ala Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Val Pro Ser Gly Gly Phe Thr Lys 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 Val Asn Val Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

ES 2 779 036 T3

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
 130 135 140

Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
 195 200 205

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 210 215 220

Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240

Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 325 330 335

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380

ES 2 779 036 T3

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
450

<210> 7

<211> 454

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cadena pesada de RAB0

<400> 7

Glu 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 Trp Tyr
20 25 30

Ala Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Arg Thr Lys 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 Val Asn Val Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

ES 2 779 036 T3

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
 130 135 140
 Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
 195 200 205
 Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 210 215 220
 Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 325 330 335
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380

ES 2 779 036 T3

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
450

<210> 8

<211> 454

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cadena pesada de RAB2

<400> 8

Glu 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 Ile Tyr
20 25 30

Ala Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Val Pro Ser Gly Gly Phe Thr Lys 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 Val Asn Val Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

ES 2 779 036 T3

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
 130 135 140
 Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
 195 200 205
 Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 210 215 220
 Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 325 330 335
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380

ES 2 779 036 T3

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
450

<210> 9

<211> 457

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> RAM0hc

10

<400> 9

Glu 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 Trp Tyr
20 25 30

Ala Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Arg Thr Lys 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 Val Asn Val Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

ES 2 779 036 T3

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 130 135 140

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 195 200 205

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 210 215 220

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 225 230 235 240

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 245 250 255

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 260 265 270

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 275 280 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 325 330 335

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 340 345 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 370 375 380

ES 2 779 036 T3

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
385 390 395 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
405 410 415

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 10

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> RAM0lc

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ala Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

ES 2 779 036 T3

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 11

<211> 448

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> RAM9hc

10

<400> 11

Glu 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 Ile Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly 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 Gly Ser Gln Trp Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

ES 2 779 036 T3

115					120					125					
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
130						135					140				
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145					150					155					160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
			165					170						175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
			180					185					190		
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
		195					200					205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
210						215					220				
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245					250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
			260					265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
		275					280					285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
		290				295					300				
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310					315					320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				325					330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
			340					345					350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			

ES 2 779 036 T3

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> RAM91c

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Arg Ile Met Thr Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Phe Val Ala Ser His Ser Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Trp Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

ES 2 779 036 T3

130

135

140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13

<211> 457

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> RAM4hc

<400> 13

Glu 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 Ile Tyr
20 25 30

Ala Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Val Pro Ser Gly Gly Phe Thr Lys 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 Val Asn Val Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

ES 2 779 036 T3

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 130 135 140

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 195 200 205

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 210 215 220

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 225 230 235 240

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 245 250 255

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 260 265 270

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 275 280 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 325 330 335

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 340 345 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

ES 2 779 036 T3

370

375

380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
385 390 395 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
405 410 415

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 14

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> RAM41c

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ala Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

ES 2 779 036 T3

Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
130						135					140				
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145					150					155					160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165					170					175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
			180					185					190		
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
	195						200					205			
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
210															

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-MIF en combinación con un glucocorticoide para su uso en el tratamiento de inflamación, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-oxMIF, y en el que el anticuerpo anti-MIF se selecciona del siguiente grupo: anticuerpo anti-MIF RAB9, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25111 y una cadena pesada depositada como DSM 25113, RAB4, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25110 y una cadena pesada depositada como DSM 25112 y/o RAB0, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25114 y una cadena pesada depositada como DSM 25115, o RAM9, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25859 y una cadena pesada depositada como DSM 25860, RAM4, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25861 y una cadena pesada depositada como DSM 25862 o RAM0, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25863 y una cadena pesada depositada como DSM 25864.
2. Combinación para su uso según la reivindicación 1, en la que el glucocorticoide se selecciona del grupo que consiste en metilprednisolona, prednisolona, trimacinolona, dexametasona, parametasona, fluorcortolona, budenosida, fluticasona, flunisolida, ciclesonida, mometasona, clobetasona, cortisona e hidrocortisona, y SEGRA/SEGRM antiinflamatorios.
3. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que el anticuerpo anti-MIF se selecciona del grupo de anticuerpo RAB9, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25111 y una cadena pesada depositada como DSM 25113, anticuerpo RAB4, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25110 y una cadena pesada depositada como DSM 25112 y anticuerpo RAB0, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25114 y una cadena pesada depositada como DSM 25115, o RAM9, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25859 y una cadena pesada depositada como DSM 25860, RAM4, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25861 y una cadena pesada depositada como DSM 25862 o RAM0, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25863 y una cadena pesada depositada como DSM 25864, preferiblemente anticuerpo RAM9, el glucocorticoide se selecciona del grupo de (metil)prednisolona y dexametasona en el caso de administración sistémica y budenosida en el caso de administración local y la inflamación se selecciona del grupo de nefritis, inflamación cutánea, enfermedad intestinal inflamatoria (EII) y esclerosis múltiple.
4. Combinación para su uso según la reivindicación 3, en la que la nefritis se selecciona de nefritis lúpica, glomerulonefritis, nefropatía por IgA o IgM, nefritis anti-GBM con vasculitis sistémica y glomerulonefritis rápidamente progresiva.
5. Combinación para su uso según la reivindicación 4, en la que la vasculitis sistémica se selecciona de poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener y púrpura de Schoenlein Henoch.
6. Combinación para su uso según la reivindicación 4, en la que la glomerulonefritis se selecciona de tipo I, tipo II, tipo III o tipo IV, y nefritis por ANCA (anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos).
7. Combinación para su uso según la reivindicación 4, en la que el anticuerpo anti-MIF es RAM9, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25859 y una cadena pesada depositada como DSM 25860, el glucocorticoide se selecciona del grupo de (metil)prednisolona y dexametasona en el caso de administración sistémica y budenosida en el caso de administración local y la nefritis es nefritis lúpica.
8. Combinación para su uso según la reivindicación 4, en la que el anticuerpo anti-MIF es RAM9, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25859 y una cadena pesada depositada como DSM 25860, el glucocorticoide se selecciona del grupo de (metil)prednisolona y dexametasona en el caso de administración sistémica y budenosida en el caso de administración local y la nefritis es lupus eritematoso sistémico.
9. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el anticuerpo anti-MIF se selecciona del grupo de anticuerpo RAB9, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25111 y una cadena pesada depositada como DSM 25113, anticuerpo RAB4, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25110 y una cadena pesada depositada como DSM 25112 y anticuerpo RAB0, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25114 y una cadena pesada depositada como DSM 25115, o RAM9, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25859 y una cadena pesada depositada como DSM 25860, RAM4, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25861 y una cadena pesada depositada como DSM 25862 o RAM0, es decir, un anticuerpo con una cadena ligera depositada como DSM 25863 y una cadena pesada depositada como DSM 25864, preferiblemente RAM9, el glucocorticoide se selecciona del grupo de dexametasona y (metil)prednisolona en el caso de administración sistémica y budenosida o hidrocortisona en el caso de administración local y la inflamación está provocada por una respuesta

inmunitaria mediada por células T.

10. Combinación para su uso según la reivindicación 9, en la que la respuesta inmunitaria mediada por células T es inflamación cutánea.
11. Combinación para su uso según la reivindicación 10, en la que la inflamación cutánea es psoriasis o hipersensibilidad de contacto.
12. Combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que el glucocorticoide es budenosida y en la que la budenosida se formula para aplicación tópica.
13. Combinación para su uso según la reivindicación 3, en la que la EII se selecciona de colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.
14. Kit que comprende un anticuerpo anti-MIF en combinación con un glucocorticoide, ambos según la reivindicación 1, e instrucciones de uso.
15. Kit según la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento de inflamación.

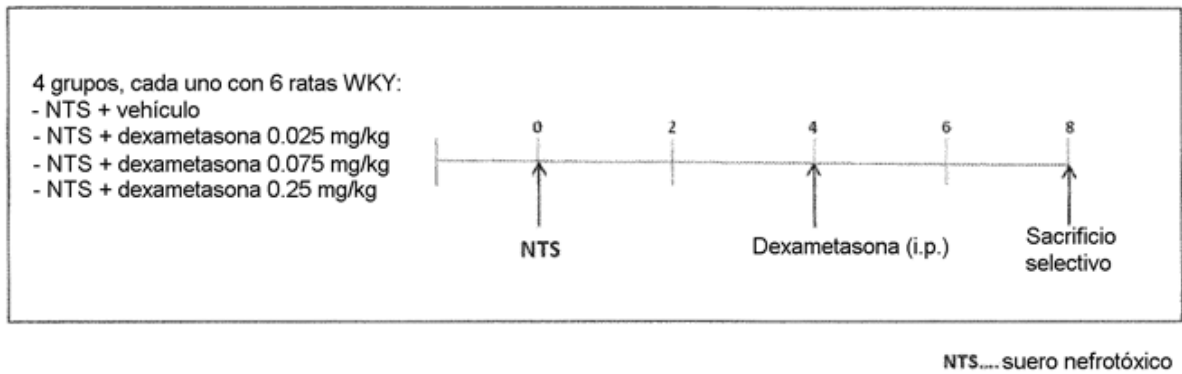


Figura 1

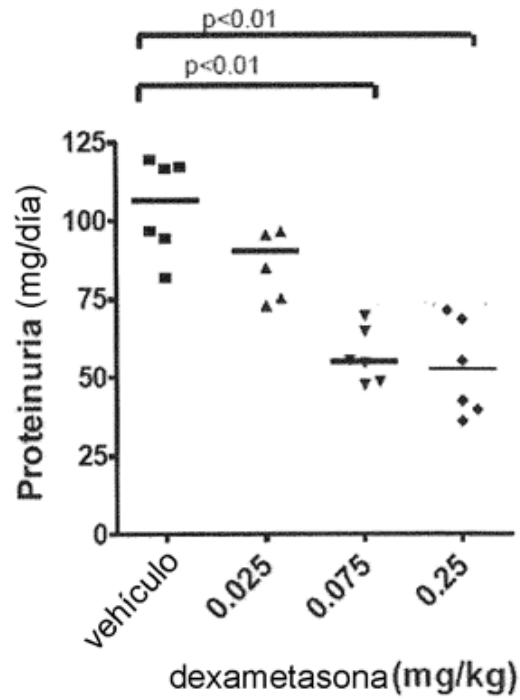


Figura 2

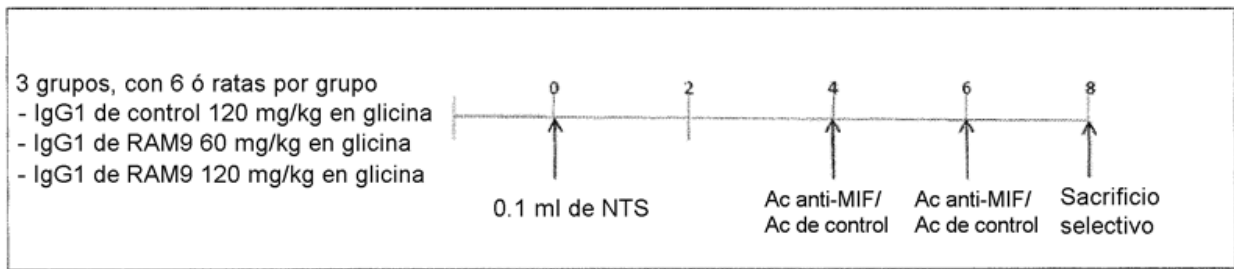


Figura 5

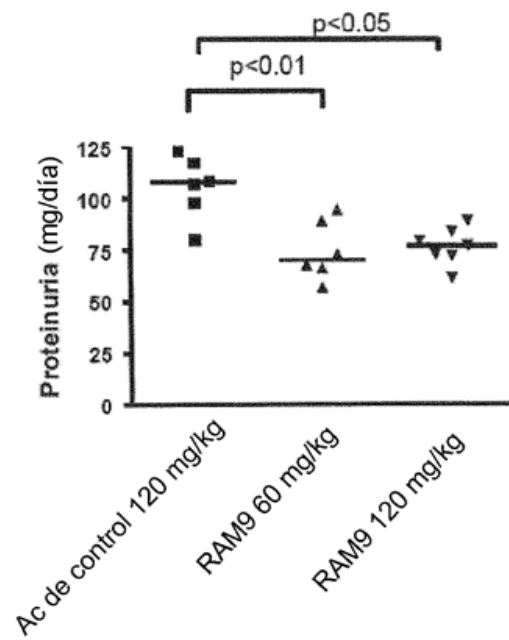


Figura 6

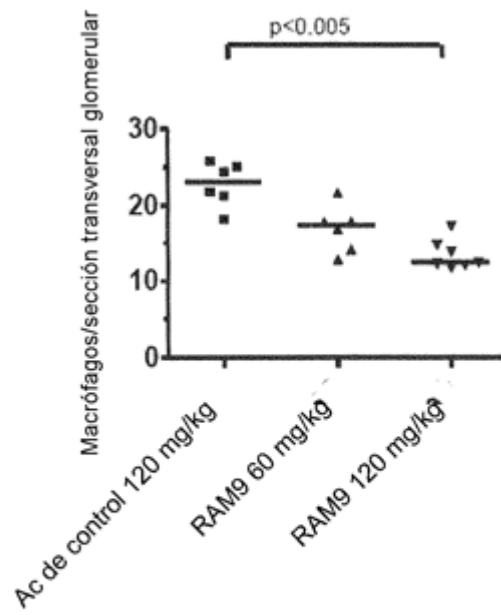


Figura 7

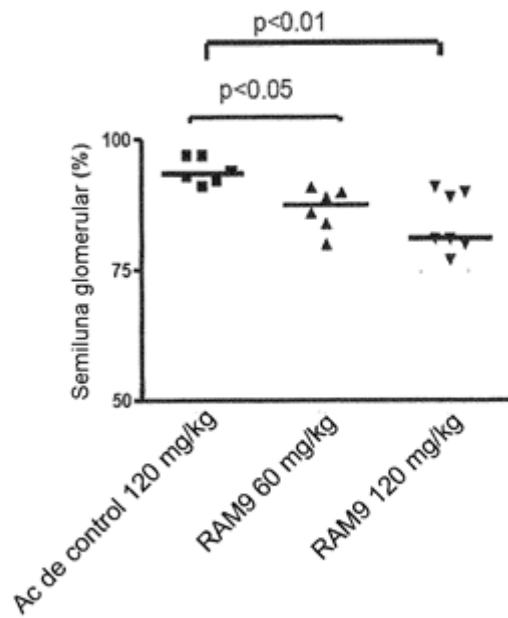


Figura 8

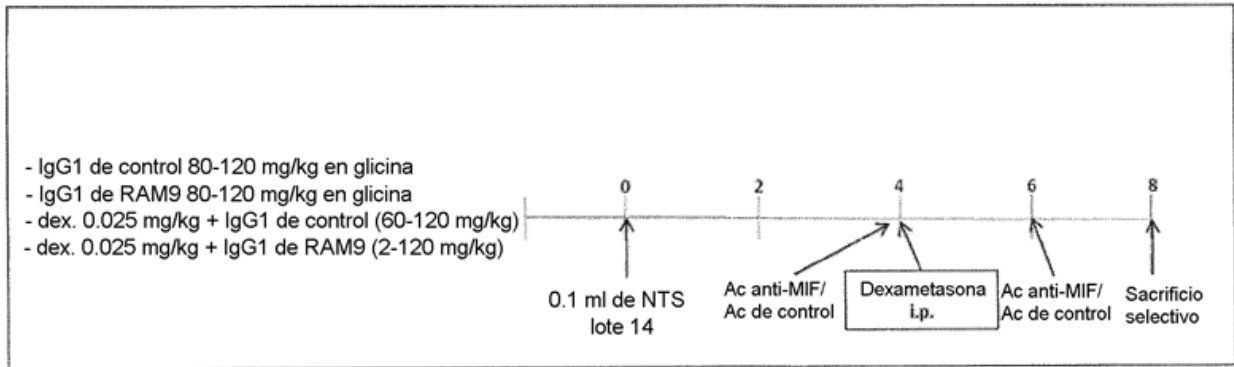


Figura 9

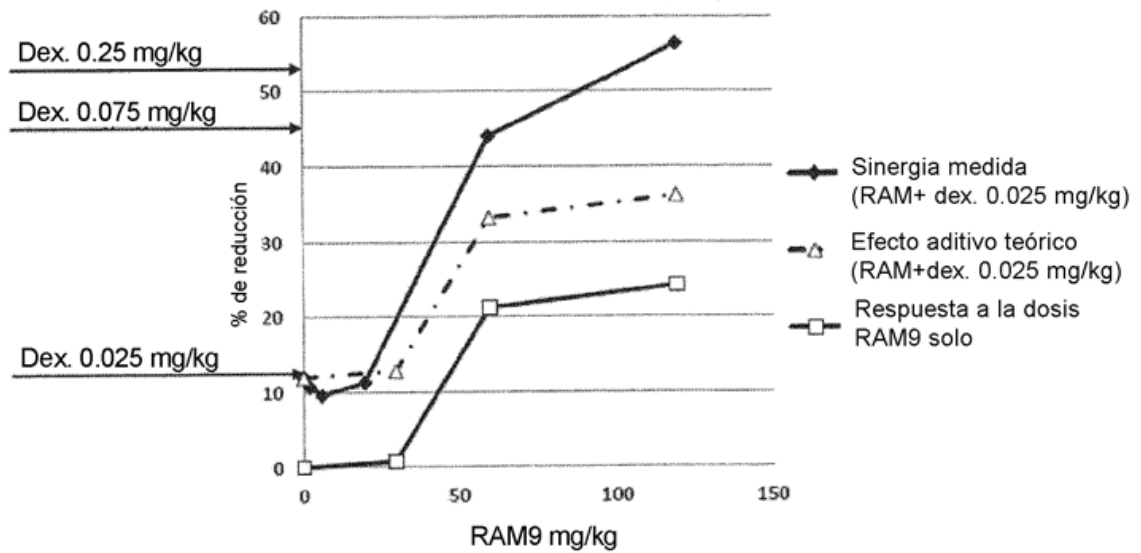


Figura 10

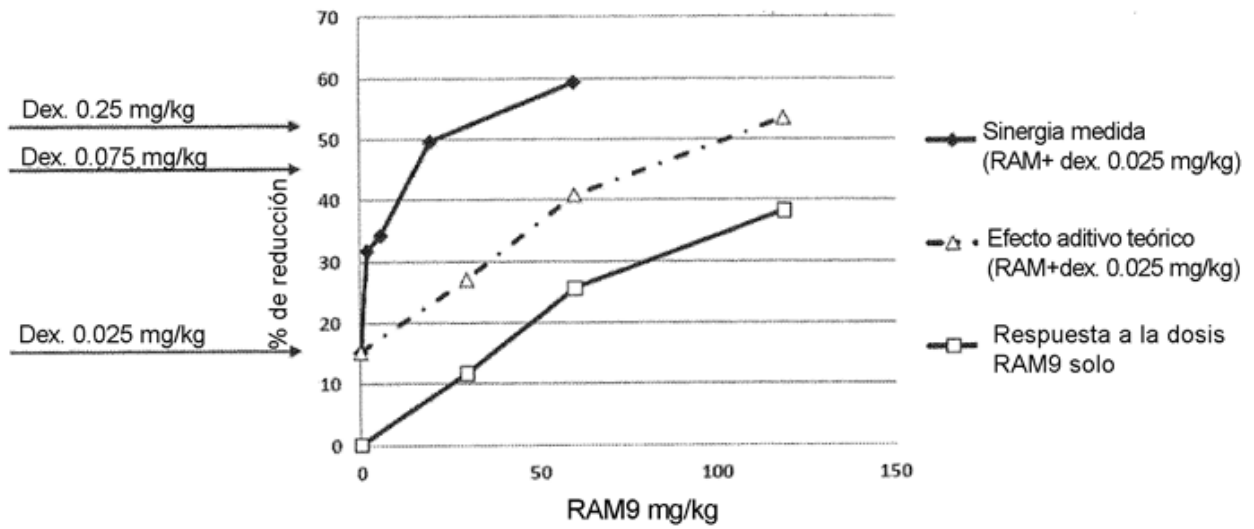


Figura 11

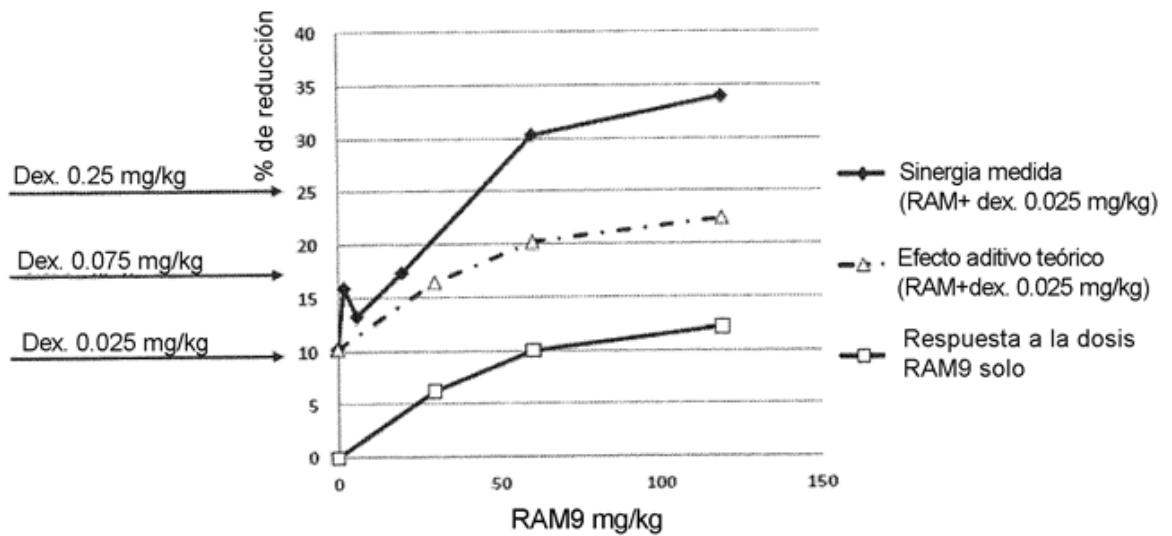


Figura 12

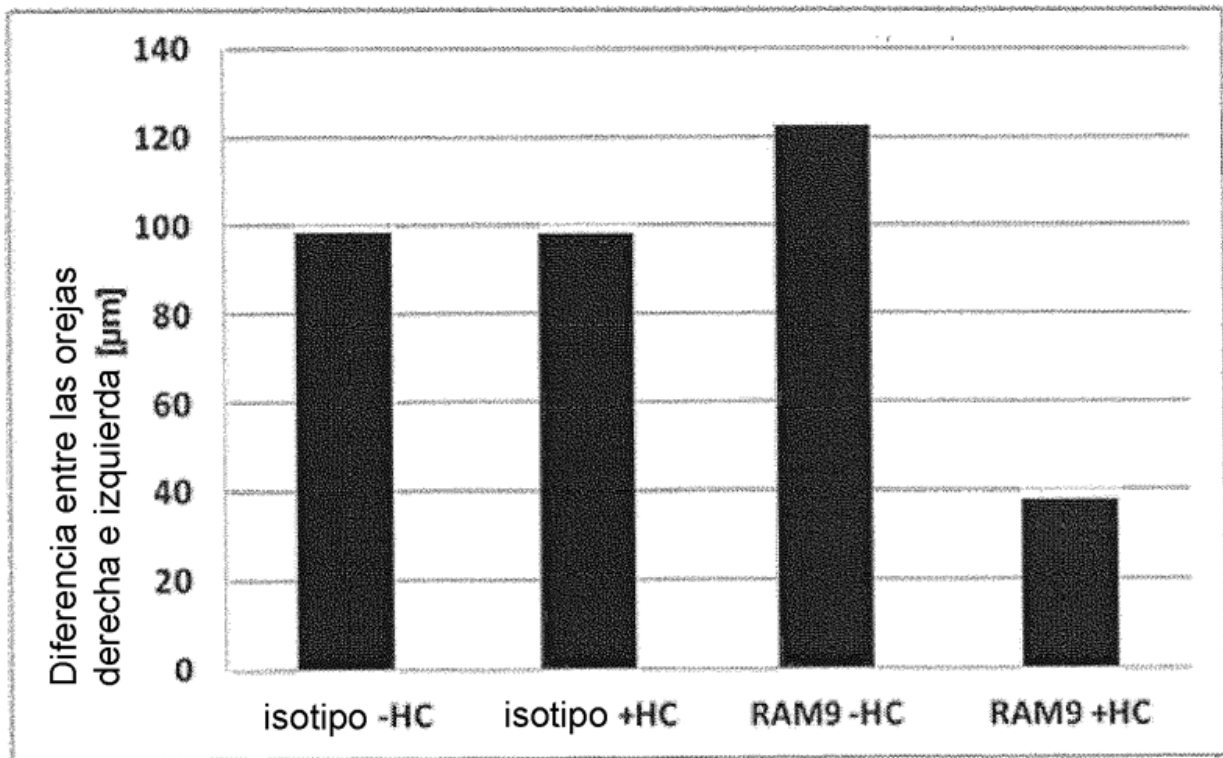


Figura 13