

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
8 de junio de 2017 (08.06.2017)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2017/093589 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C07K 16/22 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 5/12 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2016/070852

(22) Fecha de presentación internacional:

30 de noviembre de 2016 (30.11.2016)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201531761

3 de diciembre de 2015 (03.12.2015)

ES

(71) Solicitantes: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, 28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD DE CANTABRIA** [ES/ES]; Avenida de los Castros, s/n, 39005 Santander (Cantabria) (ES).

(72) Inventores: **MERINO PÉREZ, Jesús**; UNIVERSIDAD DE CANTABRIA, Immunopatología, Dpto de Biología Molecular, Avenida de los Castros, s/n, 39005 Santander (Cantabria) (ES). **MERINO PÉREZ, Ramón**; INSTITUTO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGIA DE CANTABRIA (IBBTEC), C/ Albert Einstein, 22, Parque Científico y Tecnológico de Cantabria, 39011 Santander (Cantabria) (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST BAMBI AND USE FOR THE TREATMENT OF INFLAMMATORY DISEASES

(54) Título : ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A BAMBI Y USO PARA TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

(57) Abstract: The invention relates to monoclonal antibodies, in particular against a peptide of the BAMBI protein, as well as the uses thereof and methods comprising same. Preferably, the antibodies are used for the treatment of autoimmune diseases.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales específicos frente a un péptido de la proteína BAMBI, así como a sus usos y métodos que los comprenden. Preferiblemente los anticuerpos se utilizan para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.



WO 2017/093589 A1

**ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A BAMBI Y USO PARA
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS**

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere a anticuerpos frente a la proteína BAMBI (*BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor*) y a su uso para el tratamiento y prevención de enfermedades inflamatorias. Por lo tanto, la presente invención se puede encuadrar en el ámbito de la Medicina.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

15

Bajo la denominación de enfermedad "autoinmune o inflamatoria crónica" se engloban actualmente más de 100 entidades nosológicas que globalmente afectan a un 10% de la población mundial (Shoenfeld Y *et al.* 2008 J Autoimmun 31:325). Las enfermedades autoinmunes son el resultado de la acción de múltiples agentes ambientales sobre un fondo genético y/o epigenético particular. La acumulación en un mismo individuo de todos estos factores altera la regulación de la respuesta inmune, provocando respuestas aberrantes frente a agentes externos o la reacción del sistema frente a lo propio. La consecuencia es el desarrollo de enfermedades autoinflamatorias y/o autoinmunes.

20

25

Entre las enfermedades autoinmunes se engloban tanto la artritis reumatoide (AR), la psoriasis, la enfermedad inflamatoria intestinal, la espondiloartritis o el lupus eritematoso sistémico, comparten una serie de mecanismos etiopatogénicos y también comparten su respuesta a tratamientos inmunomoduladores o inmunosupresores similares o iguales. La AR es la enfermedad reumática autoinmune más común.

30

35

En las enfermedades de base autoinmune están especialmente implicados los linfocitos T CD4+, denominación que engloba múltiples subpoblaciones efectoras (linfocitos TH1, TH2, TH17, TFH) o reguladoras (Treg, Tr1), definidas básicamente por el patrón de citocinas que secretan (Zhu J *et al.* 2010 Annu Rev Immunol 28:445; Zygmunt B *et al.* 2011 Adv Immunol 109:159). Alteraciones en el control de los mecanismos que regulan la diferenciación y activación de las diferentes subpoblaciones funcionales de linfocitos T CD4+ se han implicado en el desarrollo de

patologías de base inmunitaria. En este sentido, algunas enfermedades autoinmunes severas se han asociado al incremento incontrolado en la diferenciación y/o funcionalidad de los linfocitos TH17 (Röhn TA *et al.* 2006 Eur J Immunol 36:2857; Kebir H *et al.* 2007 Nat Med 13:1173; esclerosis múltiple o artritis reumatoide entre otras) o TFH (Tangye SG *et al.* 2013 Nat Rev Immunol 13:412; lupus eritematoso sistémico). Por el contrario, la disminución en el número y/o actividad supresora de las células Tregs es crítica en el síndrome IPEX, observado en pacientes con mutaciones en el gen *foxp3* (Bennett CL *et al.* 2001 Nat Genet 27:20) o en ratones “scurfy” deficientes en este gen (Khatti R *et al.* 2003 Nat. Immunol 4:337).

10

Para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes se han utilizado fármacos inmunosupresores poco específicos y que por lo tanto presentan múltiples efectos adversos. Más recientemente se han comenzado a utilizar anticuerpos monoclonales específicos de citocinas o receptores solubles de dichos factores (denominados globalmente como fármacos biológicos). Estos compuestos presentan como ventaja su gran especificidad y los resultados obtenidos con ellos han sido muy positivos. Sin embargo, la utilización de los fármacos biológicos no está exenta de efectos secundarios graves y además es frecuente la aparición de resistencias a los mismos, que obligan a la suspensión de los tratamientos. Por todo ello, es fundamental el desarrollo de terapias altamente específicas utilizando anticuerpos monoclonales contra nuevas dianas biológicas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se demuestra el uso de anticuerpos monoclonales frente a BAMBI para el tratamiento y prevención de enfermedades autoinmunes, ejemplificadas éstas con modelos reconocidos de artritis, psoriasis y colitis.

En un primer aspecto la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente una secuencia de aminoácidos que comprende un péptido con al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1, preferiblemente un 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100%, donde el tamaño de dicha secuencia de aminoácidos es de entre 15 y 30 aminoácidos (15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos), preferiblemente de 25 aminoácidos.

35

El término “anticuerpo”, tal como aquí se utiliza en la presente invención, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones (o fragmentos) inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas. Es decir, moléculas que se unen específicamente (inmunorreaccionan) con un antígeno, tal como, por ejemplo, un péptido o una proteína (un inmunógeno o epítipo). El término “anticuerpo” comprende anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales, en la presente invención el anticuerpo es monoclonal, y se refiere a un anticuerpo intacto o a fragmentos inmunológicamente activos de él, e incluye anticuerpos humanos, humanizados y de origen no humano, recombinantes, quiméricos y sintéticos. En el contexto de esta invención el término anticuerpo se refiere a la inmunoglobulina que el animal o una célula híbrida ha sintetizado de forma específica frente a la secuencia descrita en el primer aspecto de la presente invención.

Ejemplos de porciones o fragmentos de inmunoglobulinas inmunológicamente activas incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂, los cuales pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima, por ejemplo pepsina.

Los “anticuerpos monoclonales” son poblaciones homogéneas de anticuerpos idénticos, producidos por un hibridoma, es decir, una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral, que están dirigidos contra un único sitio o determinante antigénico. El procedimiento de obtención de los anticuerpos monoclonales de la invención puede realizarse según métodos convencionales, conocidos en el estado de la técnica. Opcionalmente, dichos anticuerpos pueden purificarse por medios convencionales, tales como cromatografía de afinidad, proteína *A-Sepharosa*, cromatografía con hidroxapatito, electroforesis en gel o diálisis.

Tal y como es conocido por el experto en la materia, hay cinco isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG) (que a su vez presenta los siguientes subtipos en el ratón: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina E (IgE). Los anticuerpos monoclonales incluidos en la presente invención son: clon B101-37 (IgG1) y clon B143-14 (IgM).

Una realización preferida del primer aspecto de la invención el anticuerpo reconoce específicamente la secuencia SEQ ID NO: 1: Péptido BAMBI(109-133) murino: LHDVLSPSKSEASGQGNRYQHDSR o SEQ ID NO: 2: Péptido BAMBI(109-133) humano: LHDVLSPPRGEASGQGNRYQHDGSR.

5

Una realización más preferida del primer aspecto de la invención se refiere al anticuerpo donde dicho anticuerpo está expresado a partir de la línea celular (hibridoma) depositada en una autoridad internacional.

10

En una realización particular el anticuerpo puede comprender una etiqueta detectable. Una realización aún más preferida del primer aspecto de la invención se refiere al anticuerpo donde dicho anticuerpo está conjugado con un fluorocromo, una enzima, una partícula de oro, una nanopartícula, un péptido u otra proteína de interés, por ejemplo una proteína o péptido ligando de un receptor.

15

El término "etiqueta detectable" o "marcaje" en la presente invención hace referencia a una etiqueta molecular que permite la detección, localización y/o identificación de la molécula a la que está unido, mediante procedimientos y equipamiento adecuados para la detección, bien mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Ejemplos de etiquetas detectables para el marcaje de compuestos incluyen, aunque no se limitan a isótopos radiactivos, sustratos enzimáticos, co-factores, ligandos, agentes quimioluminiscentes, fluoróforos, enzimas (por ejemplo peroxidasa), receptores y combinaciones de éstos. En una realización particular el anticuerpo está marcado con biotina, avidina, estreptoavidina, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano (HRP). Métodos para el marcaje y guía para la elección de marcajes adecuados para diferentes propósitos son conocidos por el experto en la materia.

20

25

30

El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética o puede ser sintético, puede también carecer de porciones.

En una realización más preferida del primer aspecto de la invención el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 y/o una cadena ligera que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4.

35

En otra realización más preferida del primer aspecto de la invención el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia SEQ ID NO: 5 y/o una cadena ligera que comprende la secuencia SEQ ID NO: 6.

- 5 En una realización preferida el anticuerpo es el anticuerpo denominado en la presente invención como clon B101-37 (IgG1, κ anti-BAMBI) y/o el clon B143-14 (IgM, κ anti-BAMBI).

10 En una realización particular la presente invención también se refiere a una construcción génica que es capaz de generar el anticuerpo del primer aspecto de la presente invención.

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos péptidos o proteínas que se comparan.

15 Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, ClustalW y FASTA. Podemos considerar, que péptidos o proteínas con porcentajes de identidad de, al menos, un 80% mantendrán las mismas propiedades que la secuencia SEQ ID NO: 1.

20 Se entiende por "reconocimiento específico" "unión específica" a la unión (reacción, interacción o unión específica) entre el anticuerpo de la invención y la secuencia descrita en el primer aspecto de la invención.

25 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un antisuero que comprende el anticuerpo del primer aspecto de la invención.

El término "antisuero" se refiere a un suero obtenido tras la inmunización de un animal con un inmunógeno. El antisuero comprende anticuerpos específicos de dicho

30 inmunógeno generados tras la respuesta inmune producida en el animal. En el contexto de la presente invención el inmunógeno es el péptido con al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1 (preferiblemente un 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100%), preferiblemente SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y el antisuero comprende anticuerpos monoclonales

35 específicos generados frente a dicha secuencia.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una célula que expresa el anticuerpo del primer aspecto de la invención (hibridoma).

- 5 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere al uso del anticuerpo del primer aspecto de la invención o del antisuero del segundo aspecto de la invención para la inhibición de *BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor* (BAMBI).

10 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso del anticuerpo del primer aspecto de la invención o del antisuero del segundo aspecto de la invención para la elaboración de un medicamento. Alternativamente, la presente invención se refiere también al anticuerpo del primer aspecto de la invención, o del antisuero del segundo aspecto de la invención, para su uso como medicamento.

15 Un sexto aspecto de la presente invención se refiere al uso del anticuerpo del primer aspecto de la invención o del antisuero del segundo aspecto de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades autoinmunes. Alternativamente, la presente invención se refiere también al anticuerpo del primer aspecto de la invención, o del antisuero del segundo aspecto de la
20 invención, para su uso como medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades autoinmunes.

25 Se entiende por "enfermedad autoinmune" en la presente invención aquella enfermedad en la que las células del sistema inmune desencadenan una respuesta inflamatoria crónica en uno o varios tejidos del individuo provocando su deterioro o incluso destrucción. En la presente invención los términos "enfermedad autoinmune" y "enfermedad inflamatoria crónica" se utilizan indistintamente.

30 La enfermedad autoinmune es preferiblemente artritis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis o lupus eritematoso sistémico. En una realización aún más preferida la artritis autoinmune es artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide.

35 Por este motivo, en una realización más preferida del sexto aspecto de la invención las enfermedades autoinmunes se seleccionan de la lista que consiste en: artritis

autoinmune, espondiloartritis, psoriasis, lupus eritematoso sistémico y enfermedad inflamatoria intestinal. Preferiblemente la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

- 5 En la presente invención el término “artritis autoinmune” engloba tanto los términos “Artritis Reumatoide” como “Artritis Indiferenciada” tanto si es de reciente comienzo como si está bien establecida.

10 Se entiende por “Artritis de Reciente Comienzo” (ARC) (o artritis de inicio) en la presente invención, aquella enfermedad consistente en inflamación de al menos una articulación, de menos de un año de evolución que cumple los criterios preestablecidos por el Colegio Americano de Reumatología (*American College of Rheumatology* o ACR) y EULAR de “Artritis reumatoide o AR” (Aletaha, Neogi *et al.* Ann Rheum Dis 2010;69:1580-1588) o, que sin cumplir dichos criterios, no cumple
15 criterios de otras enfermedades autoinmunes, degenerativas o metabólicas que puedan explicar los síntomas. Este último caso, viene siendo denominado “Artritis Indiferenciada” (AI) que, en muchos de los casos, dejados a su libre evolución, acaban desembocando en una AR. En esta invención los términos ARC, AR o AI hacen referencia a una enfermedad sistémica autoinmune crónica y progresiva, la cual
20 provoca la inflamación crónica fundamentalmente de las articulaciones, y que dada su naturaleza progresiva, produce la destrucción de las mismas, con su consecuente deformación y pérdida de capacidad funcional. Además, esta enfermedad puede provocar alteraciones extraarticulares en diversos órganos.

25 Se entiende por “espondiloartritis” en la presente invención como aquellas enfermedades autoinmunes con afectación axial y/o periférica que cumplen los criterios de clasificación de la *Assessment of SpondyloArthritis International Society* (ASAS o Sociedad Internacional de Evaluación de Espodiloartritis) (Rudwaleit *et al.* Ann Rheum Dis 2011;70:25-31).

30 Se entiende por “lupus eritematoso sistémico” en la presente invención aquella enfermedad autoinmune sistémica definida por los criterios del Colegio Americano de Reumatología (Tan *et al.* Arthritis Rheum 1982;25:1271-1277).

El término "enfermedad inflamatoria intestinal" o "EII" en la presente invención se refiere a la inflamación crónica del intestino en un individuo, donde dicha inflamación es debida al sistema inmune del propio individuo. Las dos formas más frecuentes corresponden a la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Por lo que en una
5 realización preferida la enfermedad autoinmune es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

En la presente invención se entiende por "psoriasis" aquella enfermedad cutánea la cual está caracterizada por un mal funcionamiento del sistema inmune, lo que provoca
10 un exceso de producción de células cutáneas. Esta enfermedad da lugar a la formación de abultamientos rojizos cubiertos de descamaciones. Además, el exceso de producción de células también produce la infiltración de glóbulos blancos en la piel. Las lesiones de forma general se localizan en regiones con un mayor rozamiento, como por ejemplo, aunque sin limitarse, los codos, las rodillas o ingles.

15 Un séptimo aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal del primer aspecto de la invención o del antisuero del segundo aspecto de la invención.

20 El término "composición farmacéutica" en esta memoria hace referencia a cualquier sustancia usada para diagnóstico, prevención, alivio, tratamiento o curación de una enfermedad en el ser humano o en los animales. La composición farmacéutica de la invención puede utilizarse tanto sola como en combinación con otras composiciones farmacéuticas. En una realización preferida, la composición farmacéutica además
25 comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de la composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo de la invención, la estabiliza o ayuda en su preparación en el sentido de darle una consistencia, forma, sabor o
30 cualquier otra característica funcional específica. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de

calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

5 Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” (o “farmacológicamente aceptable”) se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los compuestos de la presente invención y cuya función es facilitar la incorporación del fármaco así como
10 también de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente. El término “farmacológicamente aceptable” se refiere a que el compuesto al que hace referencia esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

15 La composición farmacéutica de esta invención puede ser facilitada por cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida.

20 Un octavo aspecto de la presente invención se refiere a uso *in vitro* del anticuerpo del primer aspecto de la invención o del antisuero del segundo aspecto de la invención para el cribado de fármacos, preferiblemente fármacos dirigidos al tratamiento y/o prevención de enfermedades autoinmunes. Preferiblemente las enfermedades autoinmunes se seleccionan de la lista que consiste en: artritis autoinmune,
25 espondiloartritis, psoriasis, lupus eritematoso sistémico y enfermedad inflamatoria intestinal. Más preferiblemente la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

El término “*in vitro*” se refiere a que el método de la invención se realiza fuera del
30 cuerpo del sujeto. Es decir, se realiza en una muestra biológica de un sujeto.

El término “muestra biológica” en la presente invención se refiere a cualquier muestra que permita el cribado de fármacos, e incluye, pero sin limitarnos, fluidos biológicos o tejidos de un individuo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto
35 en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica podría ser, por ejemplo, pero

sin limitarse, una muestra de fluido, como sangre, plasma, suero o tejido. La muestra biológica en la presente invención puede ser fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

- 5 En la presente invención los términos "sujeto" e "individuo" se usan indistintamente. Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" o "individuo" se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye pero no se limita a animales de granja y domésticos, primates y humanos, por ejemplo seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores.
- 10 Preferiblemente, el sujeto es un ser humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

Un noveno aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de un anticuerpo monoclonal que reconoce una secuencia de aminoácidos que comprende un péptido con al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID

15 NO: 1 que comprende:

- a. obtener el suero previamente extraído de un animal no-humano inmunizado con una proteína recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende un péptido con al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1,
- 20 b. obtener un hibridoma a partir de la etapa a) que genere anticuerpos monoclonales específicos frente a una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia con al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.

25 En una realización más preferida del noveno aspecto de la invención el método comprende además una etapa (c) de aislamiento del anticuerpo monoclonal a partir del hibridoma generado en la etapa (b).

En otra realización más preferida del noveno aspecto de la invención en la etapa (a) la

30 secuencia de aminoácidos es la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

En una realización aún más preferida del sexto aspecto de la invención el animal no-humano es un mamífero que se selecciona de la lista que consiste en cerdo, chimpancé, ratón, rata, conejo y cobaya.

Un décimo aspecto de la presente invención se refiere a un kit y/o dispositivo, de ahora en adelante "kit de la invención" o "dispositivo de la invención", que comprende el anticuerpo, el antisuero, la célula, según se describen en la invención, y/o cualquier combinación de los mismos.

5

El kit y/o dispositivo de la invención puede comprender además, sin ningún tipo de limitación, sondas, tampones, enzimas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. El kit puede contener además otras proteínas, incluyendo anticuerpos o antígenos, que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, este kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo la detección de la proteína BAMBI, preferiblemente mediante un ensayo inmunohistoquímico, más preferiblemente mediante ELISA, Western blot o inmunofluorescencia.

10

Opcionalmente, el anticuerpo de la invención en el kit está marcado o inmovilizado.

El término "marcado", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a que el anticuerpo está conjugado con una etiqueta. Son conocidos en el estado de la técnica un elevado número de etiquetas que pueden ser conjugadas a un anticuerpo. Ejemplos de etiquetas que pueden ser empleadas para marcar un anticuerpo son, pero sin limitarnos, radioisótopos (por ejemplo, ³²P, ³⁵S o ³H), marcadores fluorescentes o luminiscentes [por ejemplo, fluoresceína (FITC), rodamina, texas red, ficoeritrina (PE), alofocianina, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), 5-carboxifluoresceína (5-FAM) o N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA)]; anticuerpos, fragmentos de anticuerpos [por ejemplo, fragmentos F(ab)₂], etiquetas de afinidad [por ejemplo, biotina, avidina, agarosa, proteína morfogenética del hueso (BMP), haptenos], enzimas o substratos de enzimas [por ejemplo, fosfatasa alcalina (AP) y peroxidasa de rábano picante (HRP)].

El término "inmovilizado", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a que el anticuerpo de la invención puede ser unido a un soporte sin perder su actividad. Preferiblemente, el soporte puede ser la superficie de una matriz, (por ejemplo, una matriz de nylon), una placa de microvaloración (por ejemplo, de 96 pocillos) o soporte

35

de plástico similar, o bien cuentas (esferas, por ejemplo, esferas de agarosa o microesferas pequeñas superparamagnéticas compuestas de matrices biodegradables).

- 5 Otro aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* del kit de la invención para la detección de un péptido con al menos un 80% de identidad con la SEQ ID NO: 1. En una realización más preferida, el kit se usa para la detección del péptido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 10 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso *in vitro* del kit y/o dispositivo de la invención el tratamiento y/o prevención de enfermedades autoinmunes. En una realización más particular de este aspecto, las enfermedades autoinmunes se seleccionan de la lista que consiste en: artritis autoinmune, espondiloartritis, psoriasis, lupus eritematoso sistémico y enfermedad inflamatoria intestinal, más específicamente
- 15 la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

Otro objeto de la invención lo constituye un método de tratamiento y/o prevención de enfermedades autoinmunes que comprende la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de la invención, del

20 antisuero de la invención, o de la composición de la invención.

A efectos de la presente invención el término "tratamiento" se refiere a una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o alterar la patología de un trastorno. Por consiguiente, "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento

25 terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Un "sujeto en necesidad de tratamiento" incluye aquellos casos que ya tienen el trastorno así como aquellos en los que el trastorno se va a prevenir. En el tratamiento de una enfermedad de tipo inmunológico, un agente terapéutico puede alterar directamente la magnitud de la respuesta de un componente de la respuesta inmune, o hacer la enfermedad más

30 susceptible al tratamiento por otros agentes terapéuticos, por ejemplo, antibióticos, antifúngicos, agentes antiinflamatorios, agentes quimioterapéuticos, etc. La administración puede llevarse a cabo "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

A efectos de la presente invención el término "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere la cantidad de anticuerpo, antisuero o composición de la invención, que se requiere para lograr una mejora apreciable en el estado, por ejemplo, una patología, de la enfermedad o condición objetivo del tratamiento.

En una realización preferida del método de tratamiento y/o prevención de la invención, este se caracteriza por que las enfermedades autoinmunes se seleccionan de la lista que consiste en: artritis autoinmune, espondiloartritis, psoriasis, lupus eritematoso sistémico y enfermedad inflamatoria intestinal, más específicamente la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1: Caracterización de los AcMs anti-BAMBI(109-133) murino B101-37 y B143-14. **A)** Especificidad de los AcMs anti-BAMBI B101-37 y B143-14 evaluada por *Western Blot* en lisados de membranas celulares de corazón de ratones B6 normales y B6.BAMBI-KO. **B)** Reconocimiento de BAMBI humano por el AcM B101-37 evaluado por *Western Blot* en lisados de membranas celulares de corazón humano. **C)** Secuencia de las CDR de las cadenas pesadas y ligeras de los AcMs B101-37 y B143-14. Se indica el reordenamiento VDJ y VJ de las cadenas pesadas y ligeras, respectivamente, de ambos AcMs.

FIG. 2: Inducción de la expresión de BAMBI en linfocitos T CD4+ murinos y humanos tras su activación. **A)** Análisis comparativo por citometría de flujo de la expresión de BAMBI en linfocitos T CD4+ de ratones B6 normales y B6.BAMBI-KO antes y 48 horas tras su activación *in vitro* con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o ausencia de TGF β o IL-2 (paneles superiores). En los paneles inferiores se compara la

tinción con B101-37 de los linfocitos T CD4+ activados de ratones B6.BAMBI-KO con la de un IgG1 control isotípico en linfocitos T CD4+ activados de ratones normales. **B)** Inducción de BAMBI en linfocitos T humanos estimulados *in vitro* durante 48 horas con AcMs anti-CD3 y anti-CD28. La expresión de BAMBI se analizó por *Western Blot* en lisados de membrana plasmática. Como control de carga se comparó la expresión de N-Ras en los mismos lisados.

FIG. 3: Efecto de la inhibición de BAMBI en la diferenciación *in vitro* de los linfocitos T CD4+ murinos y humanos a célula Treg y TH17. **A)** Células T CD4+CD25-CD62L+CD44- naïve de ratones B6 normales y BAMBI-KO fueron estimuladas durante 5 días con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en condiciones polarizantes Treg (paneles superiores) o TH17 (paneles inferiores) en presencia del AcM B143-14 (IgM anti-BAMBI) o una IgM de ratón policlonal (Sigma). **B)** Linfocitos T CD4+ naïve humanos, purificados por separación magnética, fueron activados *in vitro* durante 10 días con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 conjugados a bolas en condiciones de diferenciación TH0 o Treg y en presencia del AcM B143-14 (IgM anti-BAMBI) o una IgM de ratón policlonal. Se muestra los porcentajes de células CD4+FoxP3+ analizados mediante citometría de flujo en las condiciones de diferenciación TH0 (barras blancas) y Treg (barras negras). **C)** Linfocitos T CD4+ memoria humanos, purificados por separación magnética, fueron activados *in vitro* durante 10 días con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 conjugados a bolas en condiciones de diferenciación TH0 o TH17. Se muestra el efecto de la inhibición de BAMBI con el AcM B143-14 en la diferenciación a células TH17 productoras o no de IFN γ analizados mediante citometría de flujo. Las diferencias estadísticas se representan como: **p<0,01.

FIG. 4: El AcM B101-37 inhibe el desarrollo de artritis en el modelo de CIA. **A y B)** Para la inducción de CIA los ratones B10RIII normales fueron inmunizados con colágeno de tipo II bovino emulsionado en CFA. Los diferentes grupos experimentales recibieron tratamientos con 2 mg/ratón/semana, 0,3 mg/ratón/semana de B101-37 o con 2 mg/ratón/semana de una IgG1 murina irrelevante (IgG1-C) durante las primeras 4 semanas tras la inmunización. Se muestra el grado de severidad clínica de cada ratón **(A)** y de distintas lesiones radiológicas (media \pm SD) asociadas a destrucción articular a la 8ª semana tras la inmunización **(B)**. Como controles de los experimentos anteriores se comparó el desarrollo de CIA entre ratones B10RIII normales y BAMBI-KO. Se muestra la evolución de la severidad clínica de la artritis en estos animales

expresada como media \pm SD. (C) y de distintas lesiones radiológicas (media \pm SD) asociadas a destrucción articular a la 8ª semana tras la inmunización (D). Las diferencias estadísticas se representan como: *p<0,05, **p<0,01.

5 **FIG. 5:** Efecto del tratamiento con B101-37 en el desarrollo de artritis psoriásica inducida por inyección de manano. **A)** Ratones B10RIII normales o BAMBI-KO tratados o no desde el inicio del experimento con el AcM B101-37 (2 mg/ratón/semana) recibieron una inyección i.p. de 10 mg de Manano obtenido de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se representa la evolución en la severidad de la
10 artritis y en el porcentaje de incremento en el grosor de las orejas (media \pm SD) en los diferentes grupos experimentales. **B)** Fotografías representativas del aspecto macroscópico del pabellón auricular de los grupos experimentales descritos en (A). Las diferencias estadísticas se representan como: *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001.

15 **FIG. 6:** Efecto terapéutico del tratamiento con B101-37 en el desarrollo de artritis psoriásica crónica. Ratones B10RIII normales recibieron una inyección semanal de 10 mg de manano (flechas blancas) y fueron tratados con el AcM B101-37 (2 mg/ratón/semana) desde el momento de la primera inyección de manano (B101-37 preventivo) o desde la aparición de los primeros signos de enfermedad (B101-37 terapéutico) hasta el final del experimento (flechas negras). Como controles se
20 utilizaron ratones tratados con 2 mg/ratón/semana de una IgG1 murina irrelevante (IgG1-C). Se muestra la evolución de la severidad clínica de la artritis (panel superior) y del grosor de las orejas (panel inferior) como marcador de severidad de la psoriasis cutánea. Las diferencias estadísticas se representan como: *p<0.05, **p<0.01, ***
25 p<0.001.

FIG: 7: Efecto del tratamiento con B101-37 en el desarrollo de psoriasis inducida por imiquimod. Se aplicó 12.5 mg de imiquimod (Aldara \square) durante 6 días en las orejas derechas de los ratones B10RIII deficientes o no en BAMBI. Los distintos grupos
30 experimentales fueron tratados desde el momento de la primera aplicación de imiquimod con una única dosis de 2 mg de B101-37 o de una IgG1 murina irrelevante (IgG1-C). **A)** Evolución de la severidad clínica de las lesiones cutáneas valorando la aparición y severidad de eritema, descamación de la piel y grosor de la oreja tratada en comparación con el de la contralateral no tratada. **B)** Severidad histológica de las
35 lesiones cutáneas. Las fotografías superiores muestran ejemplos representativos (x10)

de cortes histológicos de las orejas teñidos con hematoxilina-eosina. Los paneles inferiores muestran los valores del grosor de la epidermis (panel izquierdo) y de la dermis (panel derecho) en los distintos animales de cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas se representan como: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

5

FIG. 8: Efecto del tratamiento con B101-37 en el desarrollo de colitis DSS. Ratones B6 normales o BAMBI-KO tratados o no desde el inicio del experimento con el AcM B101-37 (2 mg/ratón/semana) recibieron DSS disuelto al 3% en el agua del biberón durante 5 días. La severidad de la colitis fue evaluada mediante cuantificación del DAI **(A)** o analizando el acortamiento del colon **(B)**. **(C)** Mortalidad en los diferentes grupos experimentales. Las diferencias estadísticas se representan como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

10

EJEMPLOS

15

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

MATERIAL Y METODOS.

20

Obtención y caracterización de los anticuerpos monoclonales anti-BAMBI murinos.

25

Ratones B6.BAMBI-KO fueron inmunizados con el péptido BAMBI(109-133) murino conjugado a *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) y emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA). Los ratones fueron inmunizados en dos ocasiones más (con un mes de diferencia entre cada inmunización) con el mismo péptido emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (IFA). El péptido BAMBI(109-133) murino se localiza en la región extracelular de BAMBI y difiere con su homólogo humano en 4 aminoácidos (posiciones 8, 9, 10 y 23 de la SEQ ID NO: 1). La presencia de anticuerpos circulantes anti-BAMBI(109-133) murino en los ratones inmunizados fue evaluada 15 días tras cada inmunización mediante ELISA. Los ratones con títulos más altos de estos anticuerpos fueron utilizados para la obtención de los anticuerpos monoclonales (AcM) anti-BAMBI murino. Para ello, suspensiones celulares de bazo se fusionaron con la línea de mieloma no secretor SP2/O-Ag14 tal y como se ha descrito anteriormente (Yokoyama WM. *et al.* Curr Protoc Immunol. 2013, Unit 2.5). Los

35

hibridomas productores de AcM anti-BAMBI humano fueron seleccionados por inmunoensayo enzimático (ELISA). En la presente invención se han caracterizado dos de los AcM obtenidos; el clon B101-37 (IgG1, κ anti-BAMBI) y el clon B143-14 (IgM, κ anti-BAMBI). La especificidad de los AcM fue evaluada posteriormente mediante

5 *Western Blot* en lisados de membranas celulares de corazones procedentes de ratones B6 normales y B6.BAMBI-KO y de muestras de miocardio humano obtenidas de biopsias quirúrgicas.

El ácido ribonucleico (ARN) de los AcM B101-37 y B143-14 fue aislado mediante el kit

10 comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Para definir las secuencias codificantes para las regiones determinantes de complementariedad (CDR) en la cadena pesada y ligera de ambos AcMs se realizaron RT-PCRs a partir de los RNAs purificados, tal y como se ha descrito previamente (Wang Z. et al. J Immunol Methods. 2000, 233:167). Para definir el CDR de la cadena pesada de B101-37 se utilizaron los siguientes amplímeros:

15 amplímero 5' degenerado de la región FR1 de la cadena pesada: 5'-CTT CCG GAA TTC SAR GTN MAG CTG SAG SAG TC-3 (SEQ ID NO: 7); amplímero 3' de la región constante de IgG1: 5'-GGA AGA TCT ATA GAC AGA TGG GGG TGT CGT TTT GGC-3' (SEQ ID NO: 8). Para definir el CDR de la cadena pesada de B143-14 se utilizaron el amplímero degenerado de la región FR1 de la cadena pesada mencionado

20 anteriormente y el amplímero 3' de la región constante de IgM: 5'-GGA AGA TCT GAC ATT TGG GAA GGA CTG ACT CTC-3' (SEQ ID NO: 9). Para definir el CDR de la cadenas ligeras de B101-37 y B143-14 se utilizaron los siguientes amplímeros: amplímero degenerado de la región FR1 de la cadena ligera κ : 5'-GG GAG CTC GAT ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3' (SEQ ID NO: 10); amplímero 3' de la región

25 constante de la cadena ligera κ : 5'-GGT GCA TGC GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3' (SEQ ID NO: 11). Los productos de PCR fueron posteriormente secuenciados (STABVida, Caparica, Portugal) y las secuencias analizadas mediante el programa IgBLAST.

30 **Estudio de la expresión de BAMBI en linfocitos T CD4 murinos y humanos.**

Se estudió mediante citometría de flujo la expresión of BAMBI en linfocitos T CD4+ de ratones B6 normales tras su estimulación utilizando en AcM B101-37 biotinilado. Los linfocitos T CD4+ aislados del bazo de ratones B6 normales fueron estimulados *in vitro*

35 durante 48 horas con anticuerpos anti-CD3 (1 μ g/pocillo) y anti-CD28 (0,5 μ g/pocillo)

5 unidos a la placa en presencia o ausencia de 2 ng/ml of TGF β murino recombinante y/o 1 ng/ml of IL-2 murino recombinante (PeproTech, Londres). Como controles negativos se utilizaron células de bazo de ratones B6.BAMBI-KO estimuladas de igual forma y coloreadas con B101-37 biotinilado y de ratones B6 normales coloreadas con un control isotípico IgG1 biotinilado. Las células coloreadas fueron analizadas en un citómetro FACSCanto II equipado con el software FACSDiva (BD Biosciences).

10 La expresión de BAMBI en células T CD4+ humanas tras su estimulación *in vitro* se analizó mediante *Western Blot*. Dichos linfocitos fueron purificados a partir de 50 ml de *buffy-coats* procedentes de donantes sanos del Banco de Sangre y Tejidos de Cantabria (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander). Las células mononucleadas obtenidas tras gradiente de Ficoll se sometieron a una selección positiva tras marcaje con AcM específico de CD4 conjugado a micropartículas magnéticas (MACS) utilizando un separador magnético (AutoMACS, Miltenyi Biotec).

15 Los linfocitos T CD4+ fueron posteriormente estimulados *in vitro* durante 48 horas con anticuerpos anti-CD3 (1 μ g/pocillo) y anti-CD28 (0,5 μ g/pocillo) unidos a la placa de cultivo. Los lisados de las membranas celulares de los linfocitos activados se obtuvieron tal y como se ha descrito anteriormente.

20 **Cultivos de diferenciación *in vitro* de linfocitos T CD4+ murinos y humanos a células Treg y TH17.**

La capacidad inhibitoria de los AcM anti-BAMBI dirigidos contra el péptido BAMBI(109-133) se exploró *in vitro* en cultivos de linfocitos T CD4+ murinos y humanos diferenciados a células Treg y TH17. En estos experimentos se utilizó el AcM B143-14. En los experimentos con linfocitos murinos, se purificaron células CD4+ *naïve* (CD4+CD25-CD62L+CD44-) de los bazos de ratones B6 normales mediante *cell sorting* (FACSAria, BD Biosciences). 5×10^5 células CD4+ *naïve* se estimularon durante 5 días con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos al plástico de la placa de cultivo,

30 en condiciones polarizantes Treg (2 ng/ml de TGF β murino) o TH17 (1 ng/ml de TGF β murino y 10 ng/ml de IL-6 murino) en presencia de 20 μ g/ml B143-14 o 20 μ g/ml de IgM murina (Sigma, St Louis, Missouri) como control isotípico. Los porcentajes de linfocitos TCD4+FoxP3+ (Treg) y CD4+IL-17+ (TH17) al final del cultivo se analizaron mediante citometría de flujo, tal y como hemos descrito anteriormente (Iglesias M. *et al.* Arthritis Rheum 2013, 65:343).

35

Linfocitos T CD4+ humanos *naïve* (en la diferenciación Treg) o memoria CD45RO+ (en las diferenciación TH17), purificados por separación magnética, fueron activados *in vitro* durante 10 días con anticuerpos (Acs) anti-CD3 y anti-CD28 conjugados a bolas en condiciones de diferenciación Treg (5 ng/ml de TGF β) o TH17 (20 ng/ml de IL-1 β , 30 ng/ml de IL-6, 30 ng/ml de IL-23, 3 ng/ml de TGF β 1, 1 μ g/ml de anti-IFN γ y 2,5 μ g/ml de anti-IL-4), en presencia de 20 μ g/ml de B143-14 o 20 μ g/ml de IgM murina. Los porcentajes de linfocitos TCD4+FoxP3+ (Treg) y CD4+IL-17+ (TH17) al final del cultivo se analizaron mediante citometría de flujo.

10

15 **Modelo experimental de artritis tras inmunización con colágeno de tipo II bovino emulsionado en CFA (CIA).**

Grupos de 10 ratones B10RIII (MHC H-2r) deficientes o no en BAMBI fueron inmunizados antes de la 12^a semana de edad por vía intradérmica en la base de la cola con 150 μ g de colágeno de tipo II bovino (MD Biosciences, Zurich) emulsionado (vol. 1/1) en CFA conteniendo una concentración de *Mycobacterium tuberculosis* de 4 mg/ml (MD Biosciences), tal y como hemos descrito anteriormente (Iglesias M. *et al.* Arthritis Rheum 2013, 65:343). Para estudiar el efecto de la inhibición BAMBI en el desarrollo de CIA los ratones B10RIII normales inmunizados fueron tratados intraperitonealmente (i.p.) durante las primeras 4 semanas tras la inmunización con 2 o 25 0,3 mg/semana de B101-37 o con 2 mg/semana de una IgG1 anti-TNP usada como control isotópico (IgG1-C). La evolución de la artritis fue monitorizada semanalmente desde la 3^a (fecha de comienzo de la artritis) a la 8^a semana después de la inmunización. La severidad de la artritis se evaluó en cada una de las cuatro extremidades mediante el método descrito por Wooley y cols (Wooley PH. *et al.* J Immunol 1985, 135:2443). Así mismo, a las 8 semanas de la inmunización se evaluaron las lesiones articulares en las patas delanteras y traseras mediante radiología, tal y como hemos descrito anteriormente (Iglesias M. *et al.* Arthritis Rheum 2013, 65:343).

35 **Modelo experimental de colitis por sulfato de dextrano (colitis-DSS).**

Para la inducción de colitis, el DSS (MPbio.com) se disolvió en agua al 3%. Esta disolución (con cambios diarios del agua) se suministró en el biberón a los ratones de los diferentes grupos experimentales durante un periodo de tiempo variable [hasta que los ratones del grupo control alcancen un índice de actividad de la enfermedad (DAI) de entre 1,5-2 (aproximadamente 4-5 días)]. Diariamente se midió el agua consumida por cada grupo experimental y se valoró el DAI calculando el score clínico de los siguientes parámetros: A) pérdida de peso: 0= no hay pérdida de peso, 1= pérdida del 1-5 % de peso, 2=: pérdida del 5-10 % de peso, 3= pérdida del 10-20 % de peso y 4= pérdida de más del 20% de peso; B) consistencia de las heces (se otorga el mismo valor a todos los animales que estén en la misma caja): 0= heces de consistencia normal, 2= heces blandas y 4= diarrea; C) sangrado rectal (se otorga el mismo valor a todos los animales que estén en la misma caja): 0= no hay sangrado, 2= sangrado leve y 4= sangrado intenso. El valor de DAI final se calculó sumando los valores de los diferentes parámetros y dividiéndolo por 3.

Inducción de artritis psoriásica con manano.

Para la inducción de un cuadro agudo de artritis psoriásica grupos de ratones B10R111 deficientes o no en BAMBI recibieron una inyección i.p. de 10 mg de manano obtenido de la levadura *S. cerevisiae* (Sigma–Aldrich) disuelto in 200 µl de PBS (Khmaladze I. et al. Proc Natl Acad Sci USA 2014, 111:E3669). Adicionalmente, se indujo una forma crónica del proceso en ratones B10R111 no transgénicos mediante la inyección repetida de la misma dosis de manano una vez por semana. Para estudiar el efecto del tratamiento con B101-37 en la prevención de artritis psoriásica los ratones que recibieron una única inyección de manano fueron tratados desde el momento de la administración del manano (inducción de la enfermedad) con 2 mg/semana de B101-37 o con 2 mg/semana de una IgG1 anti-TNP usada como IgG1-C. Para valorar el efecto terapéutico del tratamiento con B101-37 los ratones B10R111 no transgénicos con la forma crónica de la enfermedad fueron tratados con 2 mg/semana de B101-37 (repartidos en 3 dosis iguales cada 2 días) desde el momento de la primera inyección con manano (tratamiento preventivo) o desde que se observaron los primeros signos clínicos del proceso (3 días tras la primera inyección de manano; tratamiento terapéutico) hasta el final del experimento. De nuevo, como controles se analizaron ratones B10R111 no transgénicos tratados con una IgG1 anti-TNP desde la aparición de

los primeros signos de la enfermedad. Las lesiones de psoriasis se valoraron a nivel de los pabellones auriculares cuantificando el grosor de los mismos con ayuda de un calibrador digital. La severidad de la artritis se evaluó en cada una de las cuatro patas, en una escala de 0-10 (rango total de 0-40) de la siguiente forma: inflamación severa de carpo/tarso= 5 puntos sumándose 1 punto adicional por cada dedo inflamado. Si la inflamación es leve= 3 puntos por carpo/tarso + 0,5 puntos por cada dedo inflamado.

Modelo experimental de psoriasis cutánea inducida por imiquimod.

10 Para la inducción de psoriasis cutánea se aplicó tópicamente 12.5 mg de imiquimod (Aldara[®]) durante 6 días en las orejas derechas de los ratones B10RIII deficientes o no en BAMBI. Los distintos grupos experimentales fueron tratados en el momento de la primera aplicación de imiquimod con una única dosis de 2 mg de B101-37 o de una IgG1 irrelevante. Se evaluó diariamente el eritema, la descamación y el aumento de

15 grosor de la oreja. El eritema y la descamación se valoraron utilizando un score clínico de 0 a 4 de la siguiente forma: ninguna= 0, leve= 1, moderada= 2, severa= 3, muy severa= 4. El aumento de grosor en la oreja tratada se calculó con la ayuda de un calibrador digital en comparación con el grosor de la oreja izquierda no tratada de la siguiente forma: ningún incremento= 0, incremento del 0.1-10%= 1, incremento del 10.1-20%= 2, incremento del 20.1-30%= 3, incremento del 30.1-40%= 4, incremento del 40.1-50%= 5. Los animales fueron sacrificados 24 hrs después de la última aplicación de imiquimod y se recogieron muestras de piel para estudio histológico. El grosor de la epidermis y de la dermis en las muestras histológicas procedentes de las orejas tratadas con imiquimod se cuantificó en cada animal utilizando el programa

20 ImageJ, en relación con los respectivos grosores de las muestras histológicas procedentes de las orejas contralaterales no tratadas.

Ejemplo 1: Caracterización molecular de los AcM anti-BAMBI.

30 La especificidad de los AcM anti-BAMBI B101-37 y B143-14 se determinó inicialmente mediante ELISA (durante el proceso de cribado de los hibridomas) y posteriormente mediante *Western Blot*. Ambos AcM reconocen una banda de aproximadamente 27-29 kDa y otra de aproximadamente 54 kDa, compatibles con monómeros de BAMBI y dímeros resistentes a dodecil sulfato sódico (SDS) y condiciones reductoras, tal y

como ha sido descrito previamente (Xavier S *et al.* 2010 PLoS One 5:e12995), en los lisados de los ratones B6 pero no en los de los ratones B6.BAMBI-KO (Figure 1A).

5 Aunque el péptido BAMBI(109-133) murino utilizado para el desarrollo de los AcM anti-BAMBI difiere de su homólogo humano en 4 aminoácidos, estudios de *Western Blot* en lisados de membrana plasmática de miocardio indican que B101-37 también reconoce a BAMBI humano (Figura 1B).

10 Posteriormente, caracterizamos las CDRs de las cadenas pesadas y ligeras de ambos AcM anti-BAMBI mediante secuenciación del ácido desoxirribonucleico (DNA) (SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO; 6). La comparación de las secuencias de DNA con la base de datos IgBLAST indica que las CDR de las cadenas pesada y ligera del AcM B101-37 son el resultado del reordenamiento de los segmentos V9-3/D1-3/J1 y V15-103/J5, respectivamente, mientras que las CDR de las
15 cadenas pesada y ligera del AcM B143-14 son el resultado del reordenamiento de los segmentos V1-55/D4-1/J2 y V5-43/J1, respectivamente.

Ejemplo 2: Expresión de BAMBI en los linfocitos T CD4+.

20 Los linfocitos T CD4+ desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de patologías inflamatorias y autoinmunes. Por este motivo se estudió la regulación de la expresión de BAMBI en esta población linfocitaria en ratones mediante citometría de flujo y posteriormente en humanos mediante *Western Blot*, utilizando en ambos casos el AcM B101-37. En linfocitos T CD4+ *naïve* murinos no se detectó la expresión de
25 BAMBI pero se indujo 48 horas tras su estimulación *in vitro* con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Figura 2A). Esta expresión se incrementó tras la adición de TGFβ, pero no de IL-2, a las células T CD4+ activadas (Figura 2A). Como controles de especificidad del AcM B101-37, no se detectó marcaje en citometría de flujo tanto en los linfocitos T CD4+ activados de los ratones BAMBI-KO coloreados B101-37 como en los de los
30 ratones B6 normales coloreados con un control isotópico IgG1, respectivamente (Figura 2A, paneles inferiores).

Al igual que en el ratón, la expresión de BAMBI fue muy baja en los linfocitos CD4+ *naïve* humanos, induciéndose tras su estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-
35 CD28 (Figura 2B).

Ejemplo 3: La inhibición de BAMBI con el AcM anti-BAMBI(109-133) murino B143-14 altera la diferenciación *in vitro* de los linfocitos T CD4+ de ratón y humanos a los subtipos Treg y TH17.

5

En estudios previos demostramos que la ausencia de BAMBI en los linfocitos T CD4+ de los ratones BAMBI-KO potenciaba e inhibía su diferenciación *in vitro* a las poblaciones Treg y TH17, respectivamente (Postigo J *et al.* Tesis doctoral defendida el 19 de abril de 2013, Universidad de Cantabria). Para valorar el efecto inhibitorio de los AcM anti-BAMBI dirigidos contra el epítipo BAMBI(109-133) murino, analizamos la capacidad de B143-14 para alterar la diferenciación funcional de los linfocitos T CD4+ de ratones normales en el mismo sentido que lo observado en los ratones BAMBI-KO. Para ello, linfocitos T CD4+ *naïve* de ratones B6 normales y BAMBI-KO fueron activados *in vitro* en condiciones de polarización a célula Treg o TH17, en presencia del AcM B143-14 o de una IgM murina usada como control isotípico. Al igual que lo observado con los linfocitos de los ratones BAMBI-KO, la inhibición de BAMBI tras la adición al cultivo de B143-14, pero no de la IgM control, incrementó y redujo la diferenciación Treg y TH17 *in vitro*, respectivamente, de linfocitos T CD4+ de ratones B6 normales (Figura 3A).

20

Finalmente, observamos que en presencia del AcM B143-14, pero no de la IgM control, la diferenciación *in vitro* de linfocitos T CD4+ *naïve* (a Treg) o de memoria (a Th17) humanos, activados en condiciones polarizantes hacia Treg (Figura 3B) o TH17 (Figura 3C) se altera en el mismo sentido que en el ratón: incremento de Treg y disminución de TH17.

25

Ejemplo 4: Efecto terapéutico del AcM B101-37 en el desarrollo de CIA, artritis psoriásica inducida por manano, psoriasis inducida por imiquimod y colitis-DSS.

Los resultados precedentes indican que: 1) disponemos de AcMs capaces de reconocer a BAMBI en el ratón y en humanos, 2) la expresión de BAMBI se induce en los linfocitos T CD4+ tras su activación tanto en el ratón como en humanos; y 3) en ambas especies la inhibición de BAMBI *in vitro* con un AcM anti-BAMBI(109-133) murino altera la diferenciación funcional los linfocitos T CD4+ en el mismo sentido que lo descrito en los ratones B6.BAMBI-KO (incremento de células Treg y disminución de

35

TH17). Estos hallazgos plantean la posibilidad de que la inhibición de BAMBI *in vivo* tenga un efecto terapéutico en patologías inflamatorias/autoinmunes.

5 En la presente invención hemos caracterizado el potencial terapéutico de B101-37 en el desarrollo de CIA (el modelo experimental de artritis reumatoide más empleado por la comunidad científica), artritis psoriásica inducida por manano, psoriasis inducida por imiquimod (el modelo experimental de psoriasis cutánea más empleado por la comunidad científica) y colitis-DSS.

10 Tanto desde el punto de vista clínico como radiológico, el tratamiento de los ratones B10RIII normales con 2 mg/semana de B101-37 durante las primeras 4 semanas tras la inmunización con colágeno de tipo II bovino inhibió el desarrollo de CIA en estos animales, a diferencia de lo observado en los ratones tratados con 0,3 mg/semana de B101-37 o con 2 mg/semana de IgG1-C (Figuras 4A y 4B). La inhibición de la CIA tras
15 el tratamiento con la dosis alta de B101-37 fue similar a la observada en los ratones B10RIII.BAMBI-KO inmunizados (Figuras 4C y 4D).

Al igual que en el modelo de CIA, el tratamiento con 2 mg/semana de B101-37 desde el momento de la administración de manano a los ratones B10RIII normales redujo de
20 forma muy significativa la severidad de las lesiones articulares y cutáneas en este modelo experimental de artritis psoriásica aguda inducido tras una inyección única de manano, de forma similar a lo observado en los B10RIII.BAMBI-KO (Figura 5).

Los resultados anteriores demuestran un efecto preventivo del tratamiento con B101-
25 37 sobre el desarrollo de las lesiones cutáneas y articulares agudas inducidas tras la administración de una única inyección de manano. Posteriormente, se analizó el potencial terapéutico de B101-37 en la variedad crónica de este modelo experimental. En la Figura 6 se muestra que la inyección semanal de manano a los ratones B10RIII provoca la aparición lesiones articulares y cutáneas que se mantienen en el tiempo. El
30 tratamiento preventivo con 2 mg/semana de B101-37 (iniciado desde el momento de la primera inyección de manano y mantenido hasta el final del experimento) redujo de forma significativa la severidad de dichas lesiones a lo largo el estudio (Figura 6). Así mismo, se observó una disminución significativa, y similar a la observada con el tratamiento preventivo, de las manifestaciones cutáneas y articulares tras el inicio del

tratamiento con B101-37 una vez que los primeros signos de la enfermedad ya eran evidentes (tres días después de la primera inyección de manano (Figura 6).

5 El potencial terapéutico de B101-37 en psoriasis se confirmó en el modelo experimental de psoriasis cutánea más utilizado en la comunidad científica, la psoriasis inducida por imiquimod. La aplicación tópica de imiquimod durante 6 días consecutivos a ratones B10RIII no transgénicos induce lesiones cutáneas con características histológicas de psoriasis (Figura 7). A diferencia del modelo anterior, la administración de imiquimod no provoca el desarrollo de artritis. El tratamiento de los
10 ratones B10RIII no transgénicos con B101-37, desde el momento de la primera aplicación de imiquimod y con la misma dosis usada en los modelos precedentes, redujo de forma significativa la severidad de la enfermedad desde el punto de vista clínico (Figura 7A) e histológico (Figura 7B), tal y como se observó en ratones B10RIII-BAMBI.KO.

15

Por último, valoramos el efecto terapéutico de B101-37 en el modelo experimental de colitis-DSS. Al igual que en los ratones B6.BAMBI-KO, los ratones B6 normales tratados con 2 mg/semana de B101-37 desde el momento de la administración de DSS desarrollaron una colitis significativamente menos severa que los controles no
20 tratados (Figura 8A). Sin embargo, el efecto protector del tratamiento con B101-37 en los ratones B6 no fue tan importante como el observado en los animales BAMBI-KO, sobre todo en lo que respecta al grado de acortamiento del colon (Figura 8A, panel derecho). Cabe destacar que tanto en los animales B6 tratados con B101-37 como en los ratones BAMBI-KO se previno completamente la mortalidad asociada a la
25 inducción de colitis-DSS (Figura 8B).

30

Por lo tanto, en la presente invención se demuestra el uso de anticuerpos frente a BAMBI para el tratamiento y prevención de enfermedades autoinmunes.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente una secuencia de aminoácidos que comprende un péptido con al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1, donde el tamaño de dicha secuencia de aminoácidos es de entre 15 y 30 aminoácidos.
5
2. Anticuerpo según la reivindicación 1 donde dicho anticuerpo reconoce específicamente la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
10
3. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 y/o una cadena ligera que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4.
4. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia SEQ ID NO: 5 y/o una cadena ligera que comprende la secuencia SEQ ID NO: 6.
15
5. Antisuero que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
20
6. Célula que expresa el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. Uso *in vitro* del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o del antisuero según la reivindicación 5 para la inhibición de *BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor* (BAMBI).
25
8. Uso del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o del antisuero según la reivindicación 5 para la elaboración de un medicamento.
30
9. Uso del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o del antisuero según la reivindicación 5 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades autoinmunes.

10. Uso según la reivindicación 9 donde las enfermedades autoinmunes se seleccionan de la lista que consiste en: artritis autoinmune, espondiloartritis, psoriasis, lupus eritematoso sistémico y enfermedad inflamatoria intestinal.
- 5 11. Uso según la reivindicación 10 donde la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.
12. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el antisuero según la reivindicación 5.
- 10 13. Uso *in vitro* del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o del antisuero según la reivindicación 5 para el cribado de fármacos.
14. Método de obtención de un anticuerpo monoclonal que reconoce una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia con al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1 que comprende:
- 15 a. obtener el suero previamente extraído de un animal no-humano inmunizado con una proteína recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende un péptido con al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1,
- 20 b. obtener un hibridoma a partir del suero de la etapa a) que genere anticuerpos monoclonales específicos frente a una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia con al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 25 15. Método según la reivindicación 14, que comprende además una etapa (c) de aislamiento del anticuerpo monoclonal a partir del hibridoma generado en la etapa (b).
- 30 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15 donde en la etapa (a) la secuencia de aminoácidos es la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 35 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, donde el animal no-humano es un mamífero que se selecciona de la lista que consiste en cerdo, chimpancé, ratón, rata, conejo y cobaya.

18. Kit y/o dispositivo que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el antisuero según la reivindicación 5 y/o cualquier combinación de los mismos.
- 5
19. Uso *in vitro* del kit y/o dispositivo según la reivindicación 18 para la detección de un péptido con al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1.
20. Uso *in vitro* del kit según la reivindicación 19 para la detección de la secuencia
10 SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
21. Uso *in vitro* del kit y/o dispositivo según la reivindicación 18 para el tratamiento y/o prevención de enfermedades autoinmunes.
- 15
22. Uso *in vitro* del kit y/o dispositivo según la reivindicación 21 donde las enfermedades autoinmunes se seleccionan de la lista que consiste en: artritis autoinmune, espondiloartritis, psoriasis, lupus eritematoso sistémico y enfermedad inflamatoria intestinal.
- 20
23. Uso *in vitro* del kit y/o dispositivo según la reivindicación 22 donde la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

Fig. 1 A

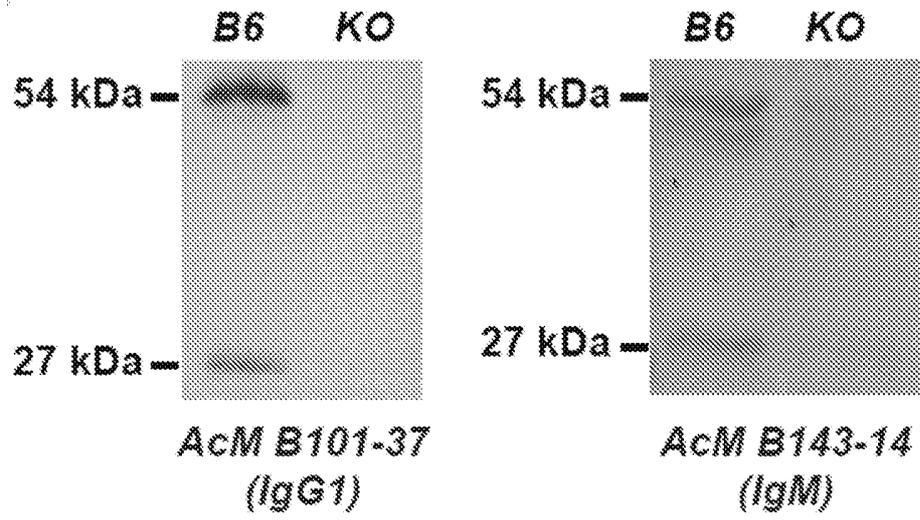


Fig. 1 B

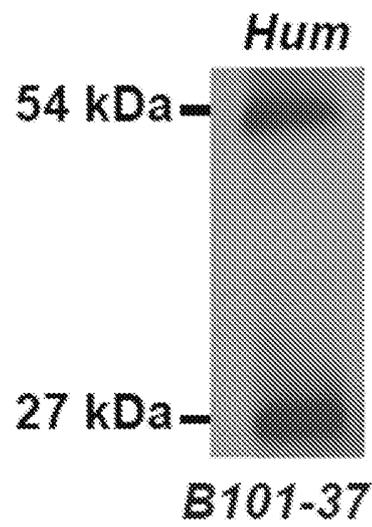


Fig. 1 C

AcM B101-37**Cadena Pesada: IgHV9-3/D1-3/J1**

CAGCTGGAGCAGTCAGGACCTGAGCTGAAGAGGCTGGAGAGACAGTCAAGTTCTCTGCAAGGCTTCTGGGT
 ATCCCTTCACAATACTATGGAATGCACIGGGTGAACACAGGCTCCAGGAAAGGTTTAAAGTGGATGGCTGGATAA
 ACACCCACACTGGAGAGCCAAACATAIGCTGATGACATCAGGGGACGGTTTGGCTTCCTTTGGAAACCCTCTGCCA
 GCACTGCCATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATAATTTCTGTGCAAGAGAGGGTTATAT
 AACTACGAAGGCTGGTACTTCGATGCTGGGGCCAGGGACCACGGTCAACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACC
 CCCATCTGTCTATAGATCTTCC

Cadena Ligera (κ): IgκV15-103/J5

GGGAGCTCGACATTTGCTGACCCAGTCTCCATCCAGTCTGCTGTCATCCCTGGAGACACAATTACCATCACTTG
 CCATGCCAGTCAGAAACATTTATTTTGGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGAATATTCCTAAACTATTGATCTAT
 AAGGCTTCCAACTTGCACACAGGGTCCCATCAAGGTTAGTGGCAGTGGATCTGGAAACAGGTTTCACATTAACCA
 TCAGCAGCTGCGAGCTGAAGACATTTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTCAAGTTATCCGCTCACGTTCCGGTGC
 TGGACCACAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCGCATGCACC

AcM B143-14**Cadena Pesada: IgHV1-55/D4-1/J2**

CTTCCGGAAATCCAAAGTTCAGCTGGAGGAGTCAAGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCC
 TGCAGGCTTCTGGCTACACCTTCCAGCTACTGGATAAAC TGGTGAAGCTGAGGCC TGGACAAGGCCCTTGAGT
 GGATGGAGATATTTATCTGGTAGTGGTAGTACTAACAATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAG
 ACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCACACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGGGGTCTATTACTGTGCAACT
 GGGTTGACTACTGGGGCCAAAGGCCACCCTCTCACAGTCTCCTCAGAGAGTCAAGTCTTCCCAAAATGTCAGATCTT
 CC

Cadena Ligera (κ): IgκV5-43/J1

GGGAGCTCGACATTTGCTCACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTGTGACTCCAGGAGATAGCGTTCAGTCTTTCCTG
 CAGGGCCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGIATCAACAAAATCACATGAGTCCCAAGGCTTCATCAAA
 GTATGCTTCCAGTCCATCTCTGGATCCCTCCAGGTTGAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACCTCAGTA
 TCAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGGAAATGTTTCTGTCAACAGAGTAAACAGCTGGTGGACCTTCCGGTGGAGGC
 ACCAAGCTGGAAATCAACAGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCGCATGCACC

Fig. 2 A

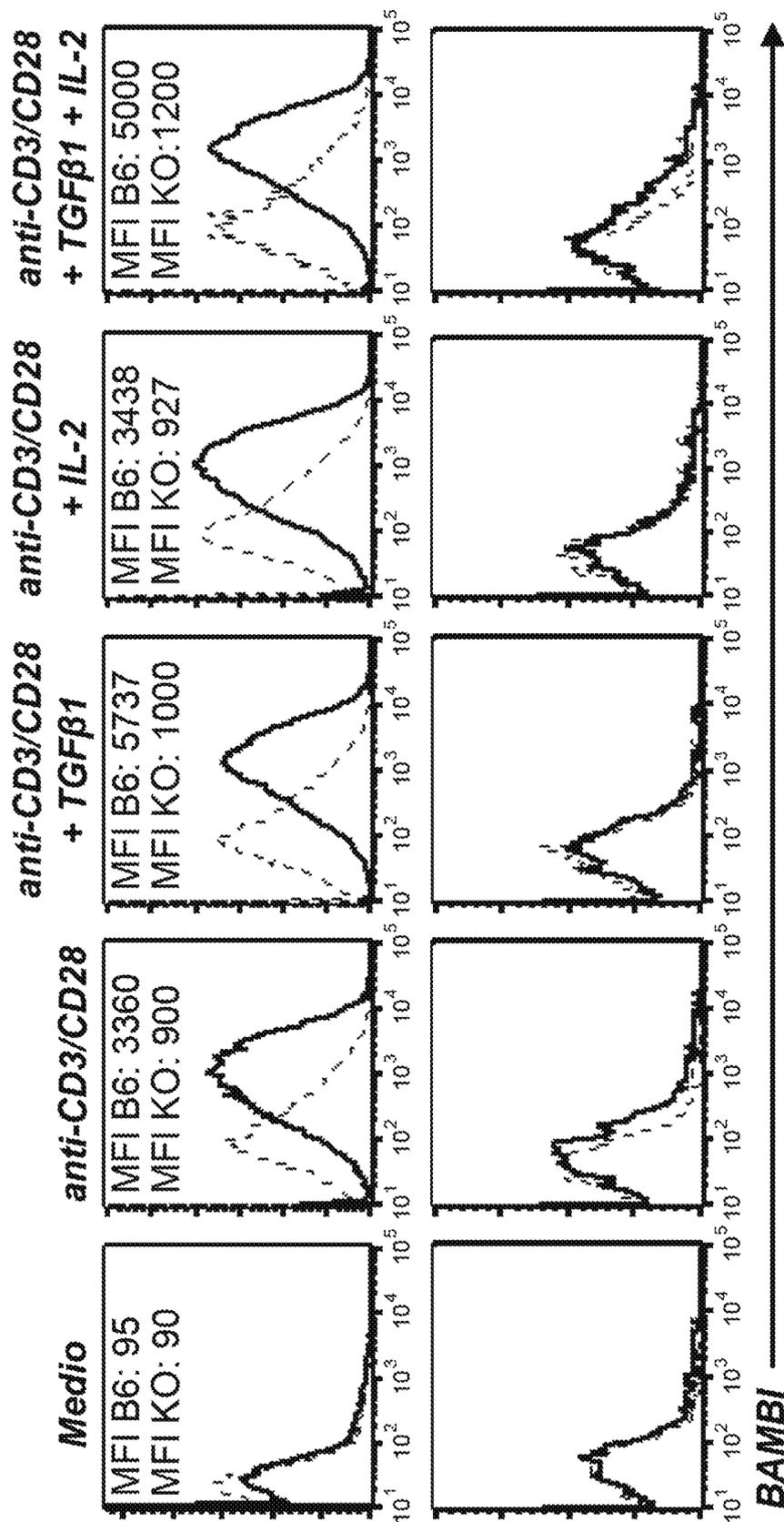


Fig. 2 B

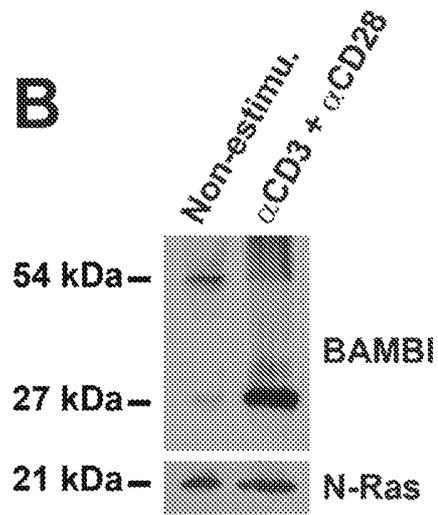


Fig. 3 A

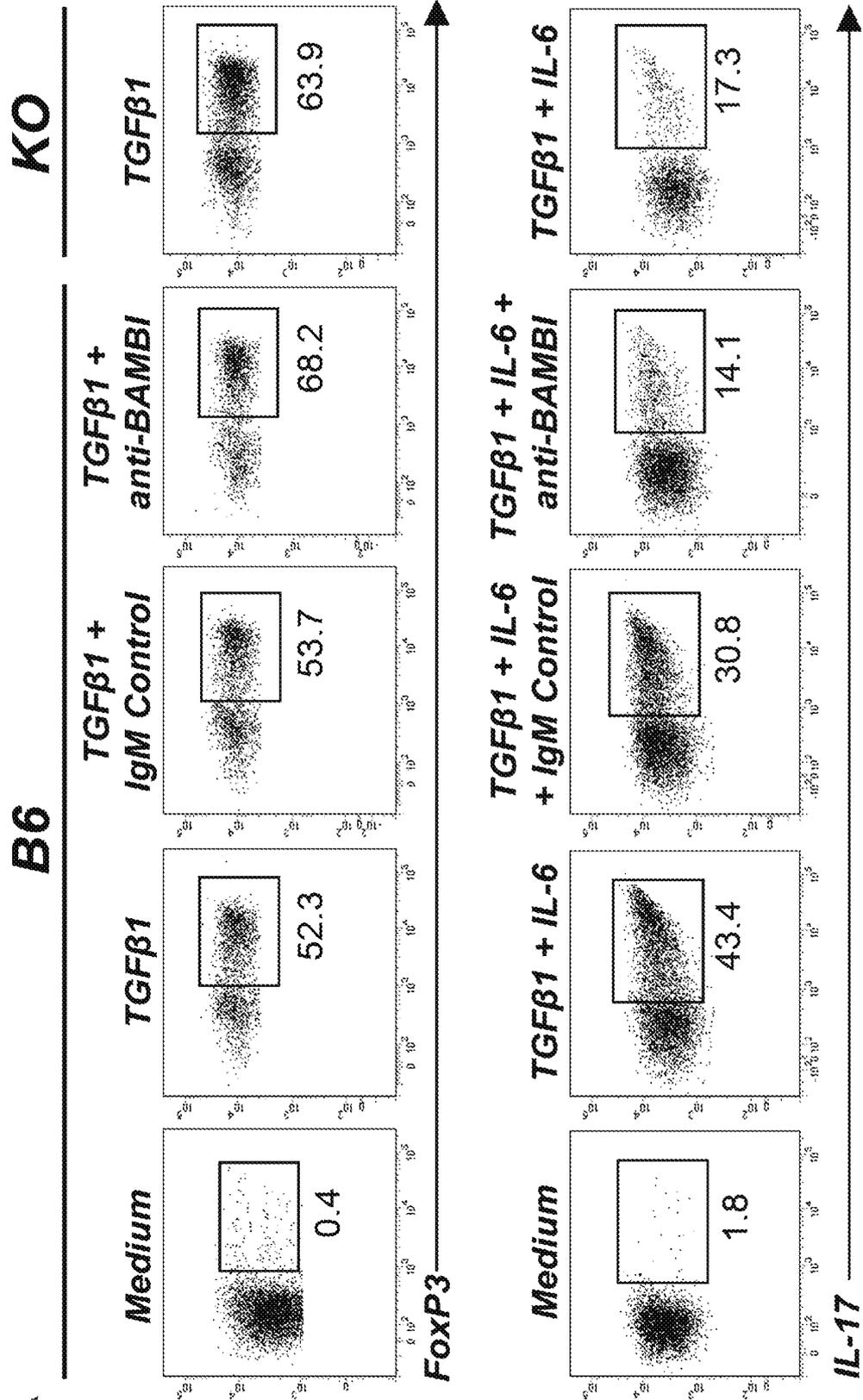


Fig. 3 B

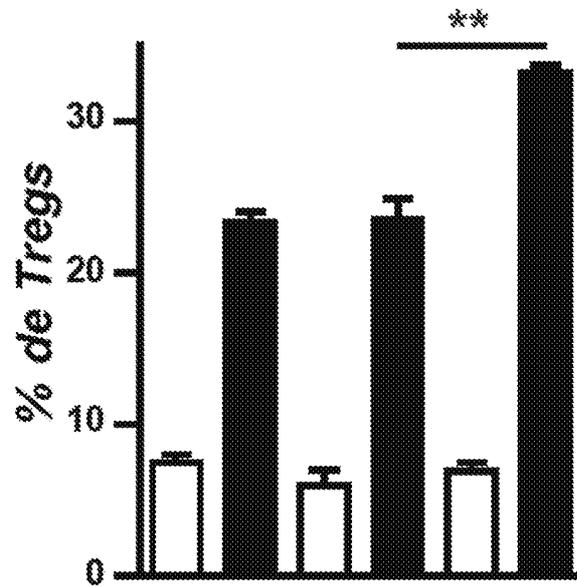


Fig. 3 C

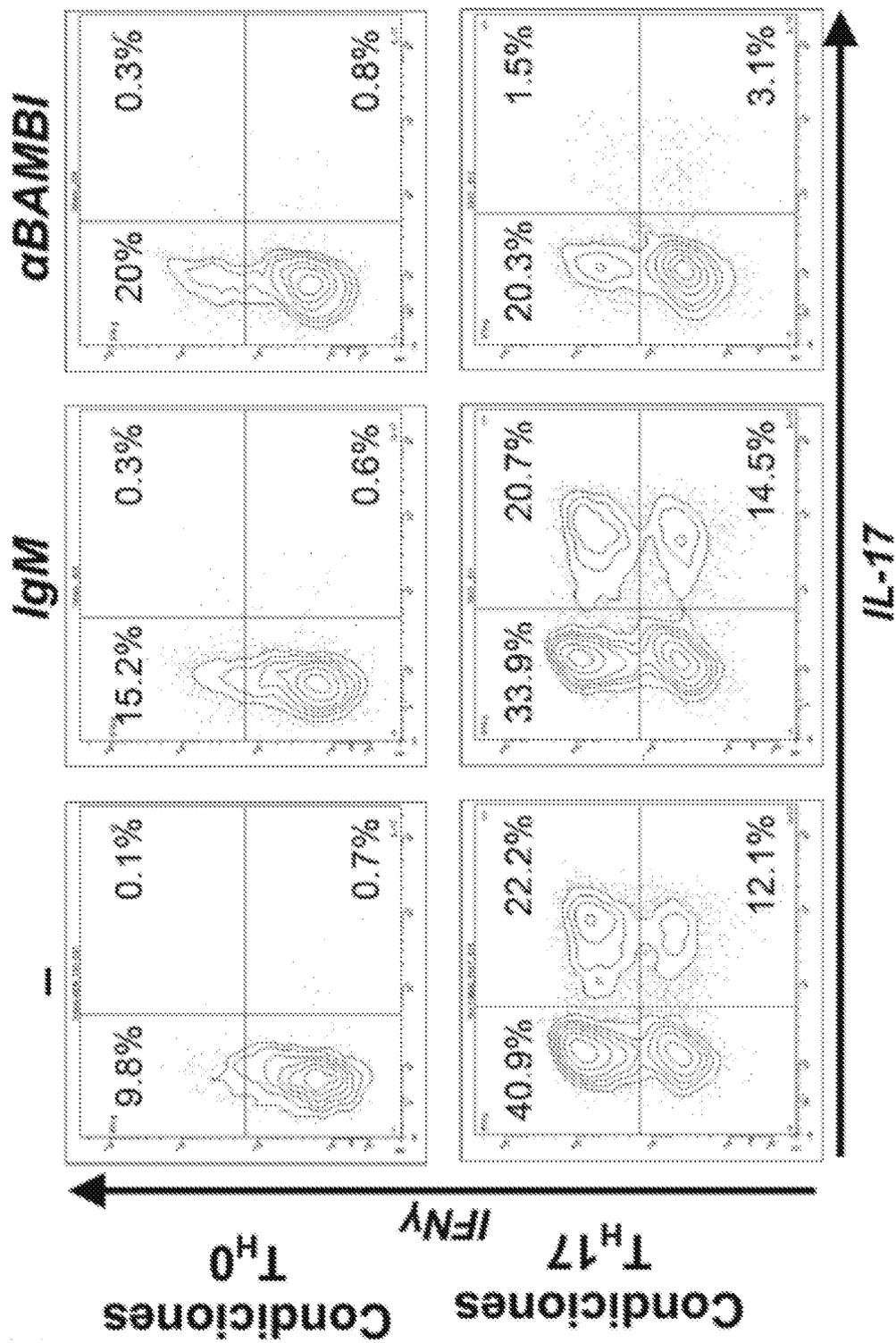


Fig. 4 A

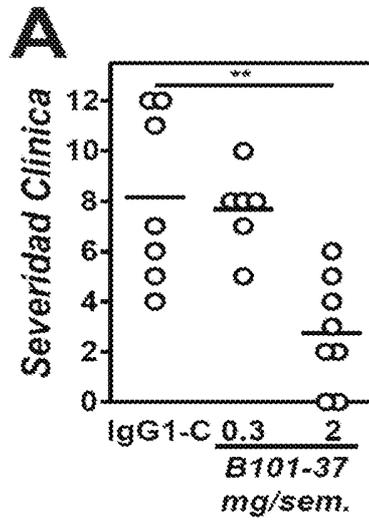


Fig. 4 B

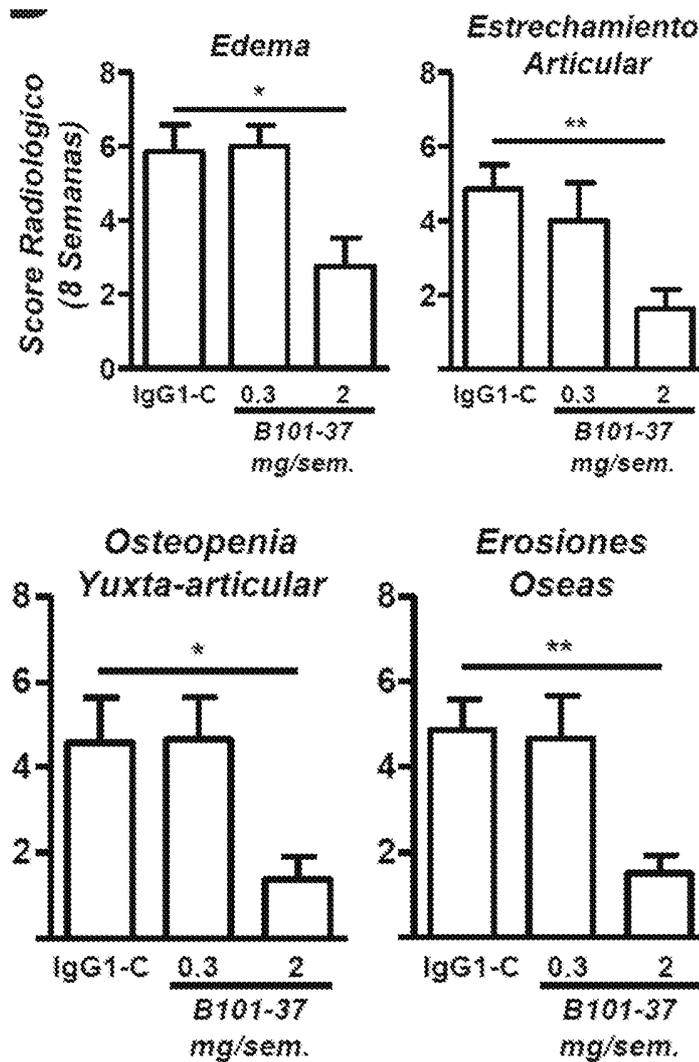


Fig. 4 C

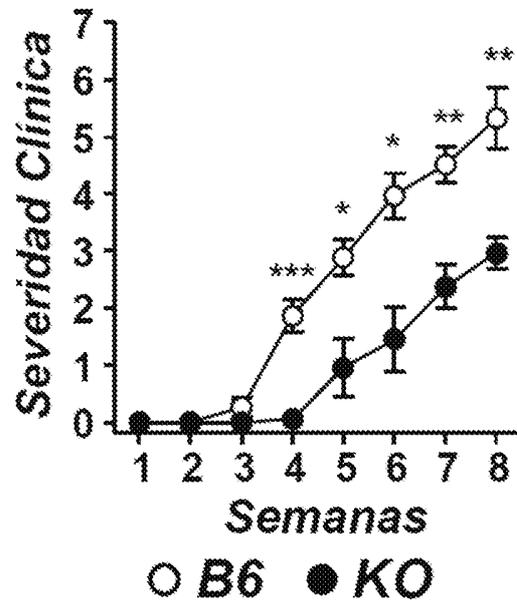


Fig. 4 D

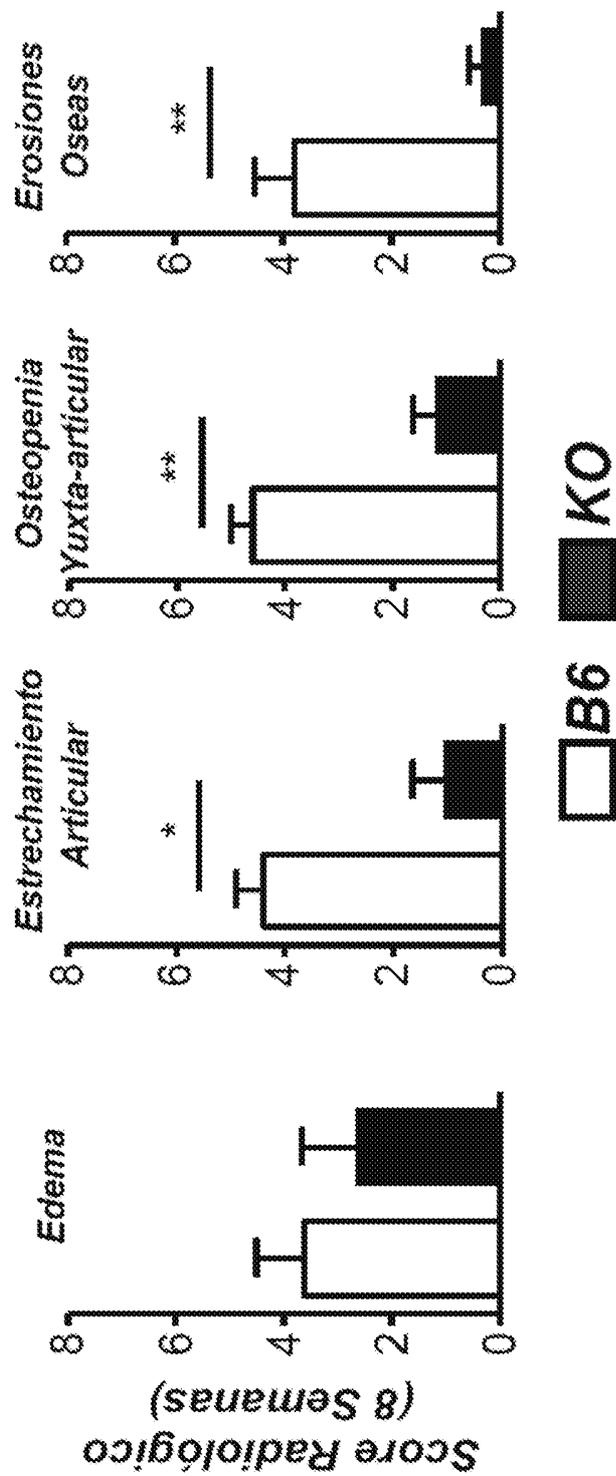


Fig. 5 A

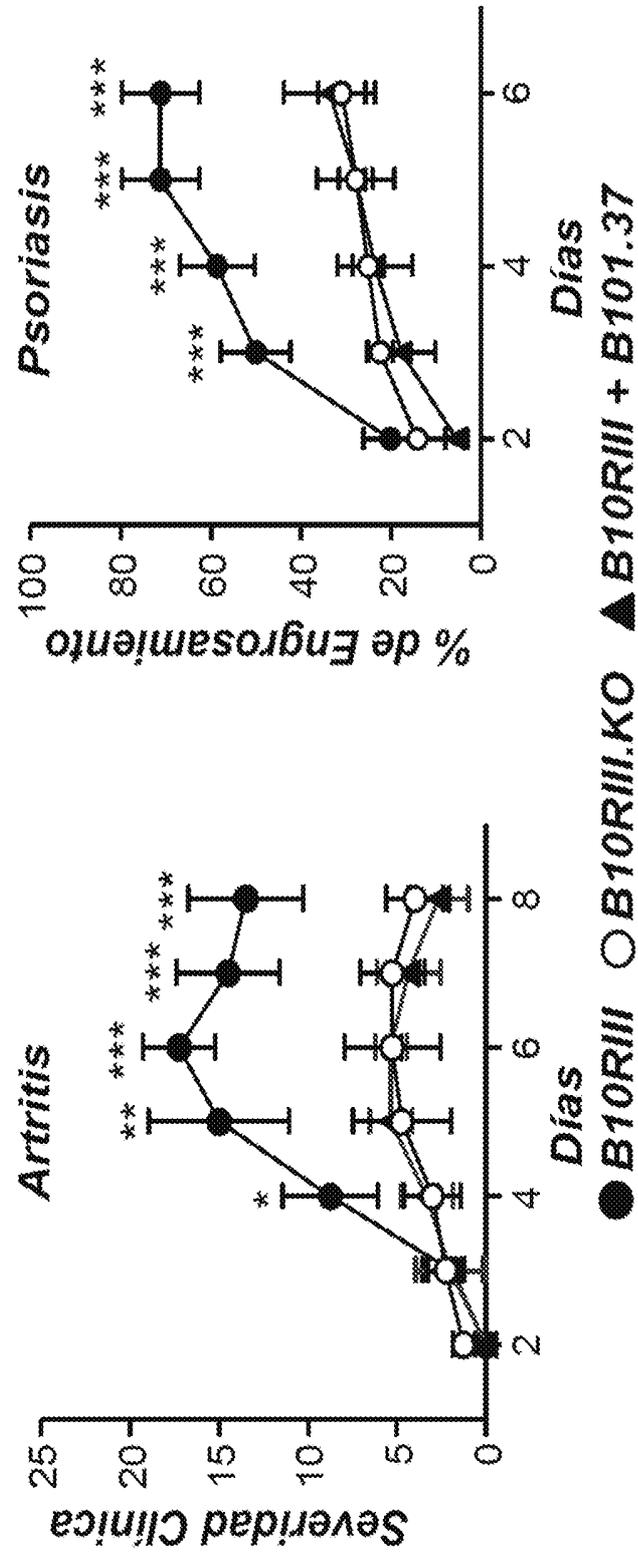


Fig. 5 B

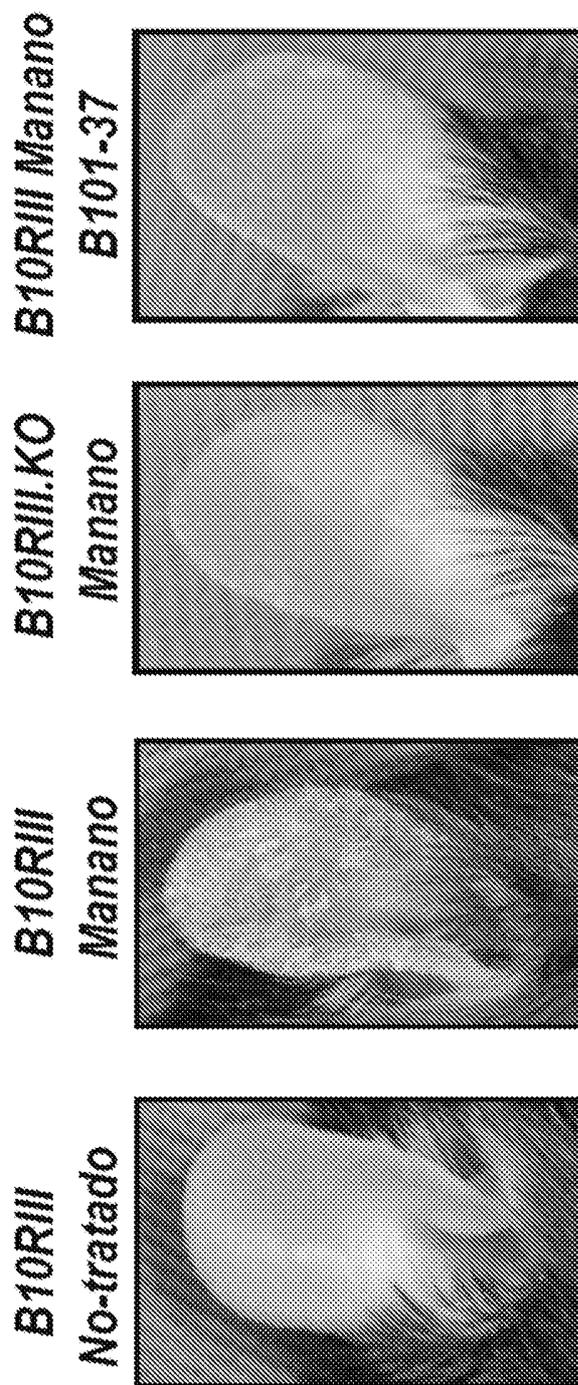


Fig. 6

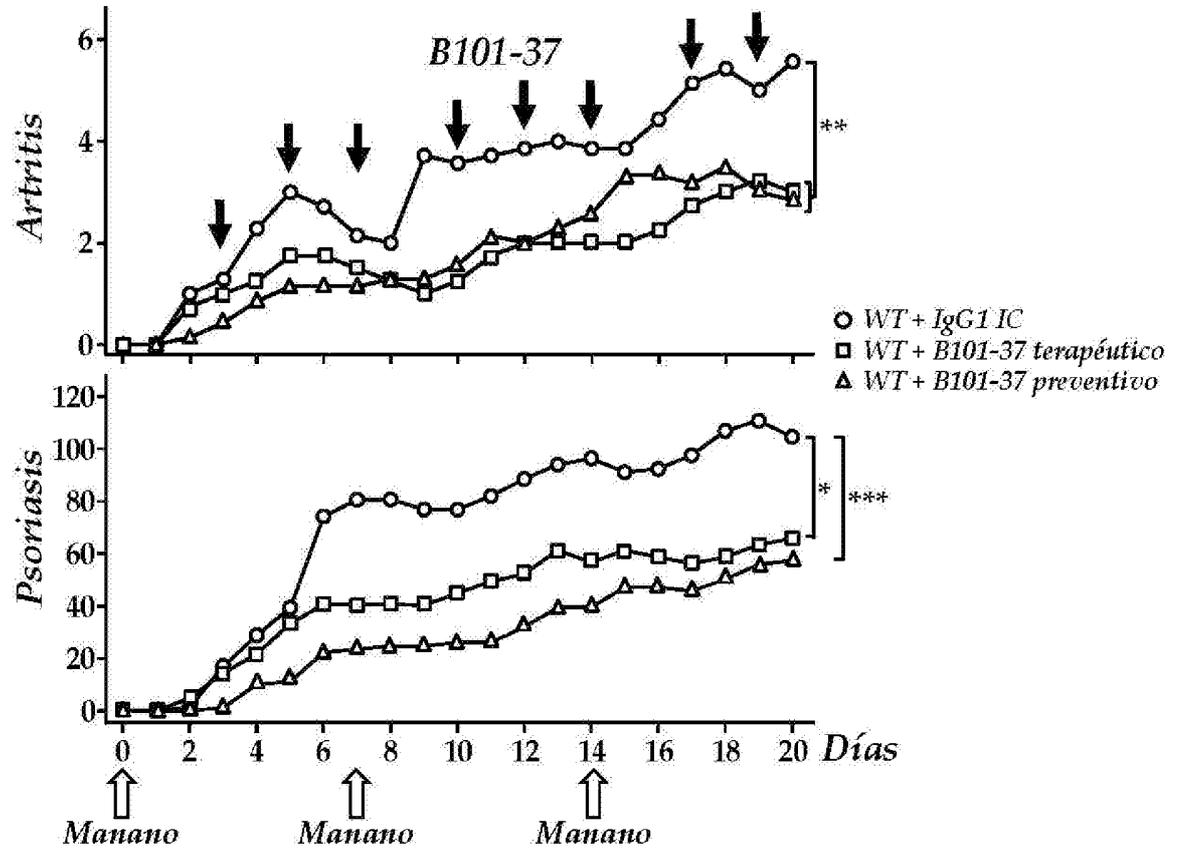


Fig. 7

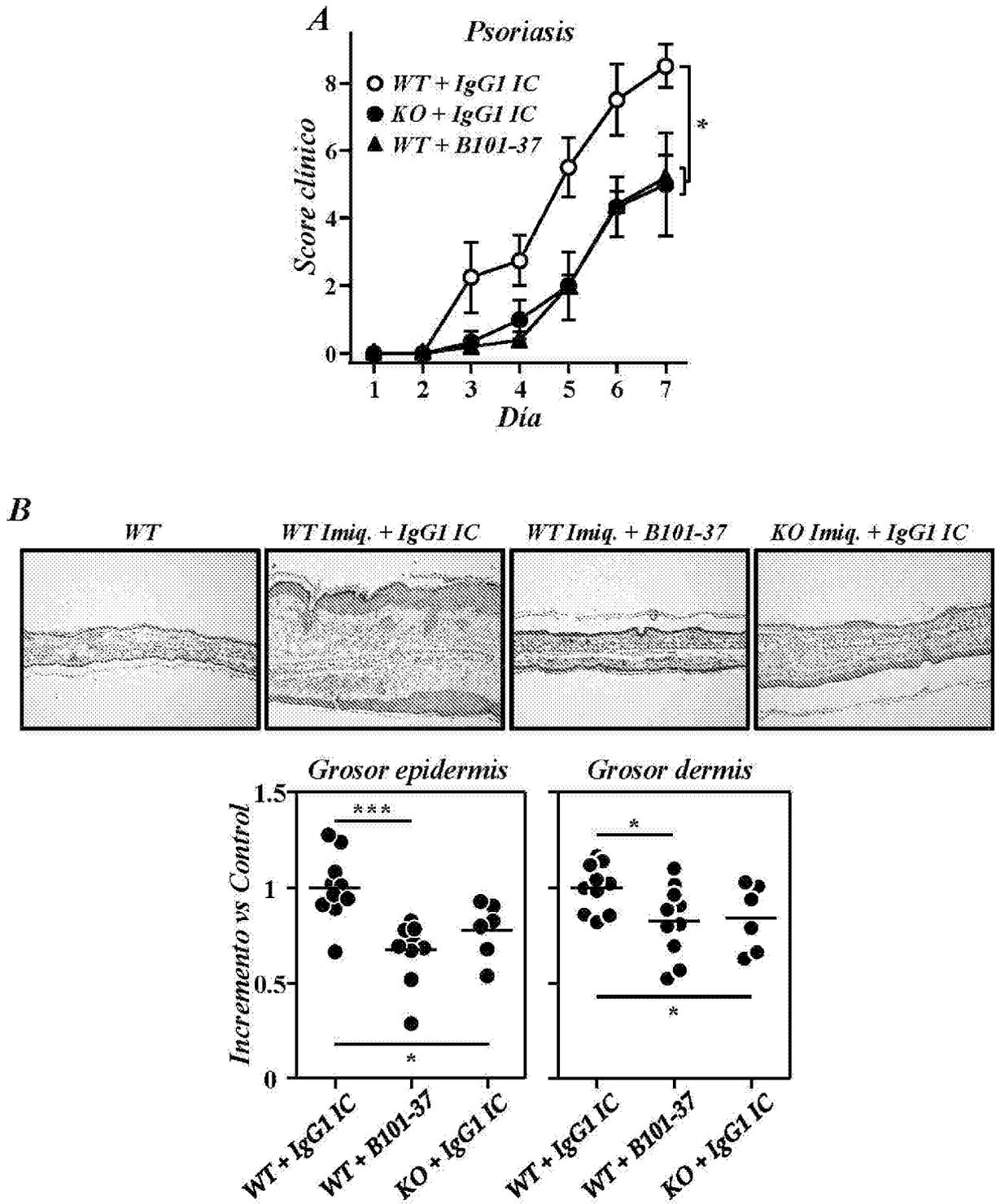


Fig. 8 A

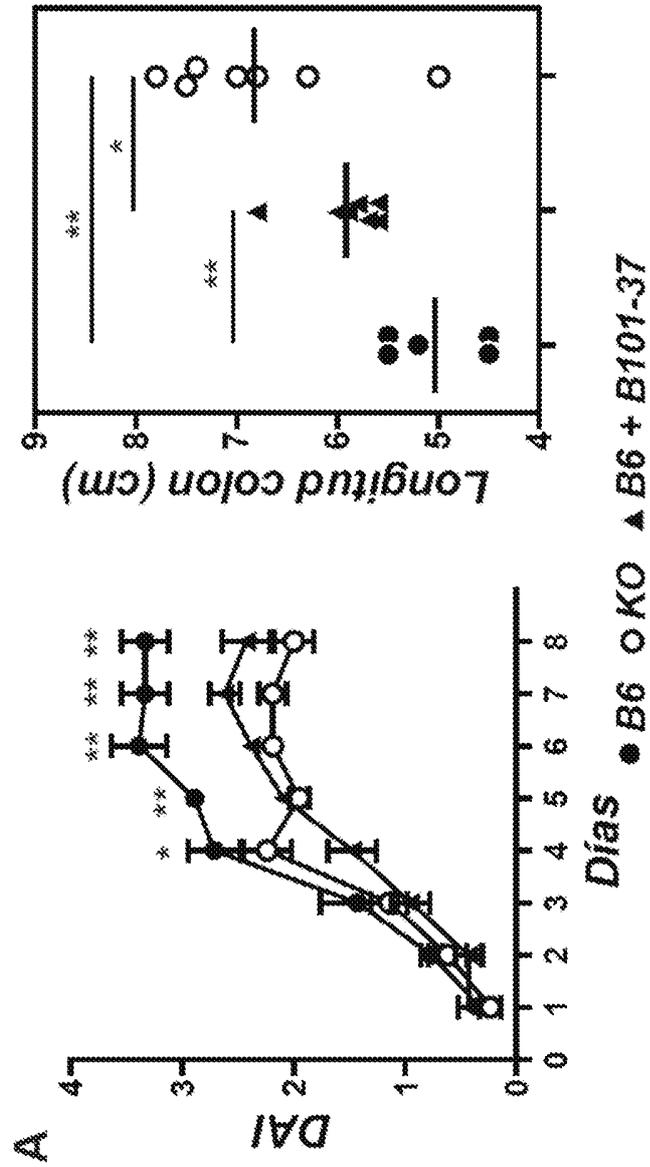
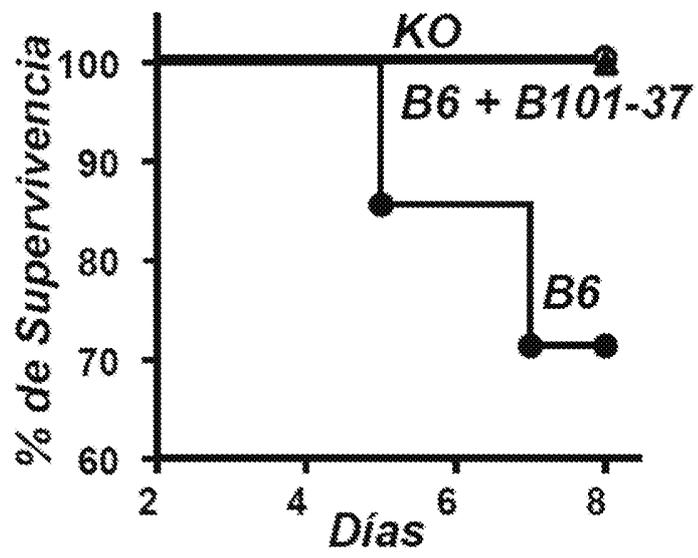


Fig. 8 B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2016/070852

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K, A61K, A61P, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, REGISTRY, CAPLUS, EBI NUCLEOTIDE DATABASES

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2007065446 A1 (AKIYAMA TETSU ET AL.) 22/03/2007, the whole document.	1-23
A	WO 2010108005 A2 (UNIV GEORGIA RES FOUND ET AL.) 23/09/2010, the whole document.	1-23
A	WO 2008094597 A2 (UNIV GEORGIA RES FOUND ET AL.) 07/08/2008, the whole document.	1-23
A	WO 2014107165 A1 (PHARM CJSC CLOSED JOINT STOCK COMPANY R ET AL.) 10/07/2014, the whole document.	1-23
A	WO 2007092939 A2 (MORPHOTEK INC ET AL.) 16/08/2007, the whole document.	1-23
A	WO 2005054273 A2 (ABMAXIS INC ET AL.) 16/06/2005, the whole document.	1-23

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
27/03/2017

Date of mailing of the international search report
(29/03/2017)

Name and mailing address of the ISA/
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
M. Hernandez Cuellar

Telephone No. 91 3498409

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2016/070852

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/22 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P19/02 (2006.01)

A61P29/00 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

C12N5/12 (2006.01)

C12N15/11 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2016/070852

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2007065446 A1	22.03.2007	JP4705469B B2 AT449842T T US7491802 B2 WO2004106515 A1 EP1627916 A1 EP1627916 A4	22.06.2011 15.12.2009 17.02.2009 09.12.2004 22.02.2006 30.08.2006
----- WO2014107165 A1 -----	----- 10.07.2014 -----	----- NONE -----	----- ----- -----
WO2007092939 A2	16.08.2007	HRP20170024T T1 LT1981909T T DK1981909T T3 US2016333089 A1 US2014086928 A1 US9422367 B2 KR20130124420 A KR101486183B B1 US2013058945 A1 US8623364 B2 US2010272730 A1 US8318168 B2 IL193011 A JP2009526082 A JP5210889B B2 CN101501070 A CN101501070B B KR20080099314 A KR101395515B B1 US2008292641 A1 US7741450 B2 CA2641169 A1 AU2007213716 A1 AU2007213716B B2 EP1981909 A2 EP1981909 B1	10.03.2017 10.01.2017 23.01.2017 17.11.2016 27.03.2014 23.08.2016 13.11.2013 28.01.2015 07.03.2013 07.01.2014 28.10.2010 27.11.2012 30.06.2015 16.07.2009 12.06.2013 05.08.2009 25.12.2013 12.11.2008 14.05.2014 27.11.2008 22.06.2010 16.08.2007 16.08.2007 06.12.2012 22.10.2008 12.10.2016
----- WO2005054273 A2 -----	----- 16.06.2005 -----	----- CN101899113 A CN101602806 A SG146696 A1 US2004133357 A1 US7667004 B2 KR20070036018 A JP2008504215 A CN1946422 A CA2547016 A1 AU2004295339 A1 EP1699484 A2 EP1699484 A4 -----	01.12.2010 16.12.2009 30.10.2008 08.07.2004 23.02.2010 02.04.2007 14.02.2008 11.04.2007 16.06.2005 16.06.2005 13.09.2006 29.10.2008 -----
----- WO2010108005 A2 -----	----- 23.09.2010 -----	----- NONE -----	----- ----- -----
----- WO2008094597 A2 -----	----- 07.08.2008 -----	----- CN103627671 A -----	----- 12.03.2014 -----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2016/070852

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US2010166713 A1	01.07.2010
		US9175260 B2	03.11.2015
		CN101641436 A	03.02.2010
		KR20090115142 A	04.11.2009
		CA2676044 A1	07.08.2008
		AU2008211103 A1	07.08.2008
		AU2008211103B B2	08.05.2014
		EP2126045 A2	02.12.2009
		EP2126045 A4	26.05.2010
<hr/>			

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2016/070852

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P, C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, REGISTRY, CAPLUS, EBI NUCLEOTIDE DATABASES

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	US 2007065446 A1 (AKIYAMA TETSU ET AL.) 22/03/2007, todo el documento.	1-23
A	WO 2010108005 A2 (UNIV GEORGIA RES FOUND ET AL.) 23/09/2010, todo el documento.	1-23
A	WO 2008094597 A2 (UNIV GEORGIA RES FOUND ET AL.) 07/08/2008, todo el documento.	1-23
A	WO 2014107165 A1 (PHARM CJSC CLOSED JOINT STOCK COMPANY R ET AL.) 10/07/2014, todo el documento.	1-23
A	WO 2007092939 A2 (MORPHOTEK INC ET AL.) 16/08/2007, todo el documento.	1-23
A	WO 2005054273 A2 (ABMAXIS INC ET AL.) 16/06/2005, todo el documento.	1-23

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
27/03/2017

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
29 de marzo de 2017 (29/03/2017)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Hernández Cuéllar
Nº de teléfono 91 3498409

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C07K16/22 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P19/02 (2006.01)

A61P29/00 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

C12N5/12 (2006.01)

C12N15/11 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2016/070852

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2007065446 A1	22.03.2007	JP4705469B B2 AT449842T T US7491802 B2 WO2004106515 A1 EP1627916 A1 EP1627916 A4	22.06.2011 15.12.2009 17.02.2009 09.12.2004 22.02.2006 30.08.2006
----- WO2014107165 A1 -----	----- 10.07.2014 -----	----- NINGUNO -----	----- ----- -----
WO2007092939 A2	16.08.2007	HRP20170024T T1 LT1981909T T DK1981909T T3 US2016333089 A1 US2014086928 A1 US9422367 B2 KR20130124420 A KR101486183B B1 US2013058945 A1 US8623364 B2 US2010272730 A1 US8318168 B2 IL193011 A JP2009526082 A JP5210889B B2 CN101501070 A CN101501070B B KR20080099314 A KR101395515B B1 US2008292641 A1 US7741450 B2 CA2641169 A1 AU2007213716 A1 AU2007213716B B2 EP1981909 A2 EP1981909 B1	10.03.2017 10.01.2017 23.01.2017 17.11.2016 27.03.2014 23.08.2016 13.11.2013 28.01.2015 07.03.2013 07.01.2014 28.10.2010 27.11.2012 30.06.2015 16.07.2009 12.06.2013 05.08.2009 25.12.2013 12.11.2008 14.05.2014 27.11.2008 22.06.2010 16.08.2007 16.08.2007 06.12.2012 22.10.2008 12.10.2016
----- WO2005054273 A2 -----	----- 16.06.2005 -----	----- CN101899113 A CN101602806 A SG146696 A1 US2004133357 A1 US7667004 B2 KR20070036018 A JP2008504215 A CN1946422 A CA2547016 A1 AU2004295339 A1 EP1699484 A2 EP1699484 A4	----- 01.12.2010 16.12.2009 30.10.2008 08.07.2004 23.02.2010 02.04.2007 14.02.2008 11.04.2007 16.06.2005 16.06.2005 13.09.2006 29.10.2008
----- WO2010108005 A2 -----	----- 23.09.2010 -----	----- NINGUNO -----	----- ----- -----
----- WO2008094597 A2 -----	----- 07.08.2008 -----	----- CN103627671 A -----	----- 12.03.2014 -----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2016/070852

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
		US2010166713 A1	01.07.2010
		US9175260 B2	03.11.2015
		CN101641436 A	03.02.2010
		KR20090115142 A	04.11.2009
		CA2676044 A1	07.08.2008
		AU2008211103 A1	07.08.2008
		AU2008211103B B2	08.05.2014
		EP2126045 A2	02.12.2009
		EP2126045 A4	26.05.2010
<hr/>			