

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 491 617**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2010 E 10722160 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2406280**

54 Título: **Materiales biológicos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

13.03.2009 GB 0904355

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

08.09.2014

73 Titular/es:

**IMPERIAL INNOVATIONS LIMITED (100.0%)
52 Princes Gate, Exhibition Road South
Kensington
London SW7 2PG, GB**

72 Inventor/es:

**MIDWOOD, KIM SUZANNE y
FOXWELL, BRIAN MAURICE JOHN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 491 617 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

Materiales biológicos y usos de los mismos

5 La presente invención se refiere a tenascina C y su actividad en la inflamación crónica. También se proporcionan moduladores de tenascina C y su actividad biológica.

10 La inflamación es la respuesta biológica compleja de tejidos a estímulos perjudiciales, tales como patógenos, daño tisular o irritantes. Un intento protector del tejido es retirar los estímulos perjudiciales así como iniciar el proceso de curación para el tejido. Las anomalías asociadas a la inflamación comprenden un gran grupo no relacionado de trastornos que subyacen en diversas enfermedades humanas (trastornos inflamatorios). Los ejemplos de enfermedades con un aspecto inflamatorio incluyen (pero sin limitación) asma, enfermedad autoinmunitaria, glomerulonefritis, alergia (hipersensibilidades), enfermedades inflamatorias del intestino, lesión de reperfusión, artritis reumatoide y rechazo de transplantes.

15 En particular, la inflamación crónica es una afección debilitante y grave asociada a muchas de las enfermedades anteriores y se caracteriza por la inflamación persistente en un sitio de infección o lesión, o en relación con respuestas inmunitarias alteradas tales como en enfermedad autoinmunitaria.

20 La artritis reumatoide (AR) es un ejemplo típico, aunque en absoluto el único, de una afección inflamatoria crónica. La AR se caracteriza por inflamación sinovial y destrucción del cartílago y hueso de las articulaciones mediadas por síntesis persistente de citocinas proinflamatorias y metaloproteinasas de matriz (MMP). Los compuestos biológicos que suprimen la síntesis de las citocinas inflamatorias tales como $TNF\alpha$ e IL-6 tienen éxito en el tratamiento de AR a corto plazo. Sin embargo, se requieren tratamientos repetidos, lo que lo hace un enfoque terapéutico caro, y no proporciona remisión a largo plazo. Además, la supresión sistémica total de la función de citocinas tiene problemas inherentes tales como riesgo infeccioso aumentado. Por lo tanto, a pesar de los avances en los cuidados, sigue existiendo una necesidad no satisfecha de un modo económico de tratamiento de inflamación crónica que sea eficaz a largo plazo (Smolen (2006) y Williams (2007)).

30 Los mecanismos que respaldan la cronicidad de la enfermedad siguen sin estar claros y el factor o los factores que conducen la expresión prolongada de mediadores inflamatorios y destructivos se desconocen en la actualidad.

35 Los receptores de tipo toll (TLR) desempeñan un papel clave en la conducción de la producción de mediadores inflamatorios en AR y el bloqueo de la función de TLR puede tener beneficios clínicos significativos (revisado en Brentano (2005) y O'Neill (2002)). Esta familia de receptores forma una parte integral del sistema inmunitario. Los TLR median en la defensa del hospedador contra la infección y lesión reconociendo tanto patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) como patrones moleculares asociados a daño (DAMP) (Matzinger (2002)). Los DAMP son moléculas proinflamatorias endógenas generadas tras la lesión tisular e incluyen moléculas intracelulares liberadas de células dañadas o necróticas, moléculas de fragmentos de la matriz extracelular (ECM) o moléculas ECM reguladas positivas tras la lesión (revisado en Bianchi (2007) y Gordon (2002)).

45 Tras la activación, los TLR promueven respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas incluyendo la estimulación de la expresión de citocinas proinflamatorias y MMP (Medzhitov (2002)). Se expresan TLR a altos niveles en tejido sinovial de pacientes con AR (Radstake (2004), Roelofs (2005), Sacre (2007), y Sacre, manuscrito presentado en 2008) y se protegen ratones con deleciones dirigidas o mutaciones de pérdida de función en TLR4 de artritis experimental (Choe (2003) y Lee (2005)). Además, los inhibidores de TLR4 pueden reducir la artritis destructiva en ratones (Abdollahi-Roodsaz (2007)) y un inhibidor de TLR4 potencial mejoró los síntomas en 15 de 23 pacientes con AR de moderada a grave en un ensayo de fase I preliminar (Vanags (2006)). Sin embargo, no está claro que el ligando o ligandos de TLR están implicados en la patogénesis de enfermedad.

50 La tenascina C es una glucoproteína de ECM que está asociada con lesión tisular y reparación de heridas. La tenascina C se expresa específicamente durante la remodelación de tejido activo durante la embriogénesis, observándose en primer lugar durante la gastrulación y formación de somitas. En estadios posteriores del desarrollo la expresión se restringe a sitios de morfogénesis de ramificación de la glándula mamaria y el pulmón, en el esqueleto en desarrollo, el sistema cardiovascular y en tejidos conectivos en sitios de transformación de epitelio a mesénquima. La expresión se regula negativamente una vez que cesan estos procesos y antes de que se complete la embriogénesis (Jones (2000)).

60 La tenascina C normalmente no se expresa en tejido adulto sano pero, en adultos, está regulada positivamente de forma específica y transitoria durante la inflamación aguda y se expresa de forma persistente en inflamación crónica (revisado en Chiquet-Ehrismann (2003)). Los estudios inmunohistoquímicos muestran que se expresa poca tenascina C en articulaciones humanas normales pero los niveles aumentan en gran medida en sinovios de AR, en áreas de inflamación y fibrosis, específicamente por debajo del revestimiento sinovial, en el pannus invasor y en torno a vasos sanguíneos (Cutolo (1992), MacCachren (1992) y Salter (1993)). También hay un aumento significativo de los niveles de tenascina C en el líquido sinovial de pacientes con AR (Chevalier (1994) y Hasegawa (2007)) y en cartílago con AR (Salter (1993) y Chevalier (1994)).

La tenascina C es una proteína hexamérica grande de 1,5 millones de Da. Cada cadena comprende diferentes dominios, incluyendo un dominio de ensamblaje (TA), repeticiones de tipo EGF (EGF-L), repeticiones de tipo fibronectina tipo III (TNIII) y un globo de tipo fibrinógeno (FBG) (revisado en Orend (2005)). Las secuencias de tenascina C y sus dominios se muestran en la Figura 13.

Anteriormente, el papel de tenascina C en la inflamación ha sido dudoso, con pruebas que mostraban diversos efectos en diferentes células inmunitarias. Por ejemplo, se ha demostrado que la tenascina C apoya la adhesión y rodamiento de linfocitos de las amígdalas y sangre periférica humana primarios, sugiriendo de este modo un papel en la estimulación de la migración de linfocitos (Clark (1997)). Además, los ratones sin tenascina C muestran infiltración de linfocitos reducida y niveles menores de ARNm de IFN, TNF e IL-4 tras la lesión de hígado inducida por concanavalina A en ratones (El-Karef (2007)). Por lo tanto, las pruebas sugieren que la tenascina C está implicada en la promoción de la actividad de células inflamatorias agudas. Sin embargo, también se ha indicado que la tenascina C inhibe la quimiotaxis de monocitos *in vitro* (Loike (2001)) y los ratones sin tenascina C muestran migración aumentada de monocitos y macrófagos en estroma de tumor mamario (Talts (1999)). Estas pruebas sugieren por lo tanto que la tenascina C tiene un papel en la inhibición de células inflamatorias.

Los inventores han demostrado que la tenascina C es un ligando de TLR4 endógeno que se requiere para la inflamación de articulaciones destructiva observada en artritis.

Además, se ha demostrado ahora que la tenascina C no está implicada en la inducción de inflamación (respuesta inflamatoria aguda) sino que en su lugar está implicada en la prolongación de la respuesta inflamatoria que caracteriza la afección inflamatoria crónica. En particular, se ha demostrado ahora que la tenascina C es un activador endógeno de TLR4 y se ha demostrado que esta molécula se requiere para la inflamación de las articulaciones destructiva.

Se ha demostrado un papel de la tenascina C en la mediación de una respuesta inmunitaria en las articulaciones mediante inducción de inflamación de articulaciones tras la inyección intraarticular del dominio FBG de tenascina C en ratones *in vivo*. Además, la inflamación aguda de las articulaciones inducida por zimosano no fue tan prolongada en ratones deficientes en tenascina C. Los ratones tanto de tipo silvestre como sin tenascina C respondieron a inducción de inflamación aguda por zimosano igualmente, demostrando que la tenascina C no parece estar implicada en el inicio de la inflamación. Sin embargo, la sinovitis menos persistente mostrada por los ratones sin tenascina C indica un papel en el mantenimiento de la inflamación de articulaciones. La importancia de la tenascina C en la prolongación de la inflamación de articulaciones se subrayó por la observación de que la delección dirigida de tenascina C protegió a los ratones de inflamación sostenida erosiva de las articulaciones durante artritis inducida por inmunización con mBSA.

Se ha demostrado ahora que la tenascina C es capaz de activar células en la articulación y se ha mapeado el dominio activo primario de la tenascina C en el glóbulo de tipo fibrinógeno (FBG), un dominio globular de 227 aminoácidos (26,9 kDa) en el extremo C terminal de la molécula (Siri (1991)).

La adición de FBG a cultivos de membrana sinovial de pacientes con AR potenció la liberación espontánea de citocinas proinflamatorias. También estimuló la síntesis de TNF α , IL-6 e IL-8 en macrófagos humanos primarios e IL-6 en fibroblastos sinoviales de AR mediante activación de rutas de señalización dependientes de TLR4 y MyD88.

Se ha demostrado ahora que, como en el caso de LPS, la expresión de TLR4 es necesaria para la inducción de síntesis de citocinas por FBG. Sin embargo, a diferencia de LPS, ni CD14 ni MD-2 parecen requerirse para la activación de TLR-4. CD14 es dispensable para la activación de TLR4 por otros ligandos. No se requiere que TLR4 responda al lípido A de una manera dependiente de MyD88 (Jiang (2005)), la fibronectina EDA puede activar mastocitos incluso en ausencia de CD14 (Gondokaryono (2007)) y la activación por ácido hialurónico de células THP-1 monocíticas humanas requiere un complejo de TLR4, CD44 y MD-2, pero no CD14 (Taylor (2007)).

La formación de complejos receptores definidos por cada ligando de TLR4 puede facilitar el reclutamiento de diferentes moléculas de señalización/adaptadores intracelulares. Esto puede explicar las respuestas celulares diferenciales que se observan con FBG y LPS, por ejemplo falta de inducción de IL-8 por FBG en fibroblastos sinoviales con AR. De forma similar, la activación por ácido hialurónico del complejo de TLR4 y CD44 induce un patrón de expresión génica en líneas celulares de macrófagos alveolares de ratón que es diferente a LPS (Taylor (2007)). Que FBG induzca síntesis de IL-8 en macrófagos humanos sugiere que se produce reconocimiento y/o señalización de ligando específico de tipo celular.

El patrón estrechamente regulado de la expresión de tenascina C lo hace una diana atractiva para el tratamiento de la inflamación crónica. Está predominantemente ausente de adultos sanos, sin embargo la expresión se induce específicamente tras la lesión tisular. Durante la inflamación aguda, tenascina C se expresa de forma transitoria: la inducción con frecuencia precede a la inflamación y están ausentes tanto ARNm como proteína del tejido para cuando la inflamación se ha resuelto (revisado en Chiquet-Ehrismann (2003)).

Se ha demostrado ahora que la expresión persistente de tenascina C está asociada a inflamación crónica. Además de AR, se han observado niveles aumentados de tenascina C en otras enfermedades autoinmunitarias incluyendo esclerosis múltiple (Gutowski (1999)) y enfermedad de Sjogren (Amin (2001)), y en heridas que no se curan y úlceras diabéticas y venosas (Loots (1998)). La síntesis *de novo* de tenascina C se correlaciona bien con la intensidad de inflamación en enfermedades de la mucosa oral y los niveles en plasma de tenascina C son un indicador fiable de la actividad de enfermedades inflamatorias del intestino antes y después de la medicación o cirugía (revisado en Chiquet-Ehrismann (2003)).

En un primer aspecto de la invención se proporciona un agente para la modulación de una respuesta inflamatoria crónica en la que el agente modula la actividad biológica de tenascina C, siendo el agente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene especificidad por el dominio FBG de tenascina C.

El agente del primer aspecto de la invención puede modular la actividad biológica de tenascina C alterando las propiedades de unión de tenascina C.

También se describen en el presente documento agentes que pueden modular la actividad biológica de tenascina C alterando la transcripción y/o traducción de tenascina C.

Dichos agentes pueden identificarse usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como:

- (a) determinando el efecto de un agente de ensayo en los niveles de expresión de tenascina C, por ejemplo por transferencia de Southern o técnicas de hibridación relacionadas;
- (b) determinando el efecto de un agente de ensayo en los niveles de proteína tenascina C, por ejemplo por inmunoensayos usando anticuerpos anti tenascina C; y
- (c) determinando el efecto de un agente de ensayo en un marcador funcional o resultado de actividad de tenascina C, por ejemplo mediante los métodos de los ejemplos.

Los agentes desvelados en el presente documento pueden regular negativamente la actividad biológica de tenascina C.

Los agentes desvelados en el presente documento pueden regular positivamente la actividad biológica de tenascina C. La idoneidad de la regulación positiva de la actividad de moléculas y células inmunitarias e inflamatorias es relevante para la producción de terapias para pacientes inmunocomprometidos e inflamatorios y en el desarrollo de vacunas (véase Harandi (2009)).

El agente descrito en el presente documento puede ser un inhibidor de la transcripción de tenascina C.

El agente descrito en el presente documento puede ser un inhibidor de la traducción de tenascina C.

El agente del primer aspecto de la invención puede ser un inhibidor de las propiedades de unión de tenascina C. Por ejemplo, el agente puede alterar la conformación de tenascina C de modo que ya no sea capaz de unirse con su receptor.

El agente del primer aspecto de la invención puede ser un inhibidor de unión competitiva de tenascina C. Se apreciará por los expertos en la materia que el agente también puede inhibir la actividad biológica de tenascina C bloqueando la función del receptor de tenascina C directamente (actuando como un antagonista del receptor de tenascina C) o indirectamente (uniéndose con moléculas intermediarias o asistentes).

El agente del primer aspecto de la invención puede ser un antagonista del receptor de TLR-4.

Se apreciará por los expertos en la materia que la inhibición de la actividad biológica de tenascina C por un agente de la invención puede ser completa o parcial. Por ejemplo, el agente puede inhibir la actividad biológica de tenascina C en al menos el 10 %, preferentemente al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, y más preferentemente 100 % en comparación con la actividad biológica de tenascina C en células inflamatorias que no se han expuesto al agente.

El agente descrito en el presente documento puede seleccionarse del grupo que consiste en moléculas de ARN de interferencia corto (ARNip), moléculas de ARN en horquilla corto (ARNhp), oligonucleótidos antisentido, compuestos con afinidad de unión por tenascina C, anticuerpos (policlonales o monoclonales) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, compuestos inhibidores pequeños, polipéptidos y proteínas.

En un ejemplo el agente es un ARNip. La interferencia de ARN es un proceso de dos etapas. La primera etapa, que se denomina la etapa de inicio, se digiere ARNbc de entrada en ARN de interferencia pequeños (ARNip) de 21-23 nucleótidos (nt), probablemente por la acción de Dicer, un miembro de la familia de Rnasa III de ribonucleasas específicas de ARNbc, que procesa (escinde) ARNbc (introducido directamente o mediante un transgén o un virus) de una manera dependiente de ATP. Los acontecimientos de escisión sucesivos degradan el ARN a dobles cadenas

de 19-21 pb (ARNip) cada una con salientes 3' de 2 nucleótidos (Hutvagner y Zamore, 2002, *Curr. Opin. Genetics and Development* 12: 225-232; Bernstein, 2001, *Nature* 409: 363-366).

5 En la etapa efectora, las dobles cadenas de ARNip se unen con un complejo de nucleasa para formar el complejo silenciador inducido por ARN (RISC). Se requiere un desenrollamiento dependiente de ATP de la doble cadena de ARNip para la activación del RISC. El RISC activo se dirige después al transcrito homólogo por interacciones de formación de pares de bases y escinde el ARNm en fragmentos de 12 nucleótidos del extremo 3' terminal del ARNip (Hutvagner y Zamore, 2002, mencionado anteriormente.; Hammond *et al.*, 2001, *Nat. Rev. Gen.* 2: 110-119 (2001); Sharp, 2001, *Genes. Dev.* 15: 485-90). Aunque el mecanismo de escisión aún debe dilucidarse, la investigación
10 indica que cada RISC contiene un único ARNip y una RNasa (Hutvagner y Zamore, 2002, mencionado anteriormente.).

A la vista de la potencia notable de ARNi, se ha sugerido una etapa de amplificación dentro de la ruta de ARNi. Podría producirse amplificación copiando los ARNbc de entrada lo que generaría más ARNip, o por replicación de los ARNip formados. Como alternativa, o adicionalmente, la amplificación podía efectuarse por múltiples acontecimientos de renovación del RISC (Hammond *et al.*, 2001, mencionado anteriormente.; Hutvagner y Zamore, 2002, mencionado anteriormente.). Puede encontrarse información adicional sobre ARNi en las siguientes revisiones, Tuschl, 2001, *Chem. Biochem.* 2: 239-245, Cullen, 2002, *Nat. Immunol.* 3: 597-599 y Brantl, 2002, *Biochem. Biophys. Act.* 1575: 15-25.
15

20 Puede efectuarse la síntesis de moléculas de ARNi adecuadas para su uso con la presente invención de la siguiente manera. En primer lugar, se explora la secuencia de ARNm de tenascina C cadena abajo del codón de inicio de AUG con respecto a secuencias dinucleotídicas AA. La aparición de cada AA y los 19 nucleótidos adyacentes 3' se registra como sitios diana de ARNip potenciales. Preferentemente, los sitios diana de ARNip se seleccionan de la fase abierta de lectura, ya que las regiones no traducidas (UTR) son más ricas en sitios de unión a proteína reguladora. Las proteínas de unión a UTR y/o complejos de inicio de la traducción pueden interferir con la unión del complejo de endonucleasa de ARNip (Tuschl, *ChemBiochem.* 2: 239-245). Se apreciará, sin embargo, que los ARNip dirigidos a regiones no traducidas también pueden ser eficaces.
25

30 En segundo lugar, se comparan los sitios diana potenciales con una base de datos genómica apropiada (por ejemplo, humana, de ratón, de rata, etc.) usando software de alineamiento de secuencias, tal como BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Se separan por filtrado los sitios diana potenciales que muestran homología significativa con otras secuencias codificantes.

35 Se seleccionan secuencias diana clasificadas como molde para síntesis de ARNip. Son secuencias preferidas las que incluyen un bajo contenido de G/C ya que se ha demostrado que estas son más eficaces en la mediación del silenciamiento génico en comparación con las de contenido de G/C superior al 55 %. Se seleccionan preferentemente varios sitios diana a lo largo de la longitud del gen diana para evaluación. Para una mejor evaluación de los ARNip seleccionados, se usa conjuntamente preferentemente un control negativo. El ARNip de control negativo incluye preferentemente la misma composición de nucleótidos que los ARNip pero carece de homología significativa con el genoma. Por lo tanto, se usa preferentemente una secuencia de nucleótidos mezclada del ARNip, siempre que no presente ninguna homología significativa con cualquier otro gen.
40

45 Las moléculas de ARNip adecuadas pueden sintetizarse como se ha descrito anteriormente de modo que sean complementarias y por lo tanto se unan con la secuencia de nucleótidos completa de tenascina C o partes de la misma. La secuencia de nucleótidos de tenascina C se encuentra en la figura 14.

En un ejemplo el agente puede ser un ARN en horquilla corto (ARNhp).

50 Un ARN en horquilla pequeño o ARN en horquilla corto (ARNhp) es una secuencia de ARN que realiza una vuelta en horquilla estrecha que puede usarse para silenciar la expresión génica mediante interferencia de ARN. El ARNhp usa un vector (normalmente adenovirus o lentivirus) introducido en células y utiliza el promotor U6 para asegurar que se exprese siempre el ARNhp. Este vector se pasa habitualmente a las células descendientes, permitiendo que se herede el silenciamiento génico. La estructura en horquilla del ARNhp se escinde por la maquinaria celular en ARNip, que después se une al complejo silenciador inducido por ARN (RISC). Este complejo se une con y escinde los ARNm que coinciden con el ARNip al que se une. (McIntyre (2006) y Paddison (2002)).
55

60 El agente del primer aspecto de la invención puede ser un dominio de tenascina C o variante del mismo. Se ha demostrado que el dominio FBG está implicado predominantemente en la interacción de tenascina C con su diana en relación con la persistencia de inflamación crónica. En consecuencia el dominio preferido es el dominio FBG (secuencia mostrada en la figura 13) o variantes del mismo.

En un ejemplo alternativo, el agente es un oligonucleótido antisentido.

65 El diseño de moléculas antisentido que puede usarse para reducir eficazmente los niveles/actividad de tenascina C requiere la consideración de dos aspectos importantes para el enfoque antisentido. El primer aspecto es el

suministro del oligonucleótido en el citoplasma de las células cancerosas, mientras que el segundo aspecto es el diseño de un oligonucleótido que se une específicamente al ARNm designado dentro de células de tal manera que inhiba la traducción del mismo.

5 La técnica anterior enseña varias estrategias de suministro que pueden usarse para suministrar eficazmente oligonucleótidos a una amplia diversidad de tipos celulares (por ejemplo, véase Luft, 1998, *J Mol Med* 76: 75-6; Kronenwett *et al.*, 1998, *Blood* 91: 852-62; Rajur *et al.*, 1997, *Bioconjug Chem* 8: 935-40; Lavigne *et al.*, 1997, *Biochem Biophys Res Commun* 237: 566-71; Aoki *et al.*, 1997, *Biochem Biophys Res Commun* 231: 540-5).

10 Además, están disponibles algoritmos para identificar las secuencias con la mayor afinidad de unión predicha por su ARNm diana basándose en un ciclo termodinámico que explica la energía de las alternancias estructurales tanto en el ARNm diana como en el oligonucleótido (por ejemplo, véase Walton *et al.*, 1999, *Biotechnol Bioeng* 65: 1-9).

15 También se conocen varios enfoques para diseñar y predecir la eficacia de oligonucleótidos específicos usando un sistema *in vitro* (por ejemplo, véase Matveeva *et al.*, 1998, *Nature biotechnology* 16: 1374-1375).

Varios ensayos clínicos han demostrado seguridad, viabilidad y actividad de oligonucleótidos antisentido. Por ejemplo, se han usado con éxito oligonucleótidos antisentido adecuados para tratamiento de cáncer (Holmlund *et al.*, 1999, *Curr Opin Mol Ther* 1: 372-85; Gerwitz, 1999, *Curr Opin Mol Ther* 1: 297-306). Más recientemente, se ha indicado que la supresión mediada por antisentido de la expresión del gen de heparanasa humana inhibe la diseminación pleural de células cancerosas humanas en un modelo de ratón (Uno *et al.*, 2001, *Cancer Res* 61: 7855-60).

25 Por lo tanto, los expertos en la materia son fácilmente capaces de diseñar e implementar enfoques antisentido adecuados para modular la expresión de tenascina C.

Provechosamente, el oligonucleótido antisentido es de 15 a 35 bases de longitud. Por ejemplo, se ha demostrado que oligonucleótidos de 20 unidades inhiben la expresión del ARNm del receptor de factor de crecimiento epidérmico (Witters *et al.*, *Breast Cancer Res Treat* 53: 41-50 (1999)) y se ha demostrado que oligonucleótidos de 25 unidades reducen la expresión de hormona adrenocorticotrópica en más del 90 % (Frankel *et al.*, *J Neurosurg* 91: 261-7 (1999)). Sin embargo, se aprecia que puede ser deseable usar oligonucleótidos con longitudes fuera de este intervalo, por ejemplo 10, 11, 12, 13 o 14 bases, o 36, 37, 38, 39 o 40 bases.

35 Se apreciará además por los expertos en la materia que los oligonucleótidos están sujetos a degradación o inactivación por nucleasas endógenas celulares. Para contrarrestar este problema, es posible usar oligonucleótidos modificados, por ejemplo que tengan enlaces internucleotídicos alterados, en los que los enlaces fosfodiéster de origen natural se han reemplazado con otro enlace. Por ejemplo, Agrawal *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7079-7083 mostraron inhibición aumentada en cultivo tisular de VIH-1 usando oligonucleótido fosforamidatos y fosforotioatos. Sarin *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7448-7451 demostraron la inhibición aumentada de VIH-1 usando oligonucleótido metilfosfonatos. Agrawal *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7790-7794 mostraron la inhibición de la replicación de VIH-1 en cultivos celulares tanto infectados temprano como infectados de forma crónica, usando oligonucleótido fosforotioatos específicos de secuencia de nucleótidos. Leither *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3430-3434 indican la inhibición en cultivo tisular de replicación del virus de la gripe por oligonucleótidos fosforotioatos.

45 Se ha demostrado que los oligonucleótidos que tienen enlaces artificiales son resistentes a degradación *in vivo*. Por ejemplo, Shaw *et al.* (1991) en *Nucleic Acids Res.* 19, 747-750, indican que los oligonucleótidos no modificados de otro modo se hacen más resistentes a nucleasas *in vivo* cuando se bloquean en el extremo 3' por ciertas estructuras de protección y que los oligonucleótidos fosforotioatos no protegidos no se degradan *in vivo*.

50 Se proporciona una descripción detallada del enfoque de H-fosfonato a la síntesis de oligonucleósido fosforotioatos en Agrawal y Tang (1990) *Tetrahedron Letters* 31, 7541-7544, cuyas enseñanzas se incorporan por la presente en el presente documento por referencia. Se conocen en la técnica síntesis de oligonucleósido metilfosfonatos, fosforoditioatos, fosforoamidatos, ésteres de fosfato, fosforamidatos enlazados y fosforotioatos enlazados. Véase, por ejemplo, Agrawal y Goodchild (1987) *Tetrahedron Letters* 28, 3539; Nielsen *et al.* (1988) *Tetrahedron Letters* 29, 2911; Jager *et al.* (1988) *Biochemistry* 27, 7237; Uznanski *et al.* (1987) *Tetrahedron Letters* 28, 3401; Bannwarth (1988) *Helv. Chim. Acta.* 71, 1517; Crosstick y Vyle (1989) *Tetrahedron Letters* 30, 4693; Agrawal *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1401-1405, cuyas enseñanzas se incorporan en el presente documento por referencia. También son posibles otros métodos para la síntesis o producción. En una realización preferida el oligonucleótido es un ácido desoxirribonucleico (ADN), aunque también pueden sintetizarse y aplicarse secuencias de ácido ribonucleico (ARN).

65 Los oligonucleótidos útiles en los ejemplos descritos en el presente documento se diseñan preferentemente para resistir la degradación por enzimas nucleolíticas endógenas. La degradación *in vivo* de oligonucleótidos produce productos de degradación de oligonucleótidos de longitud reducida. Es más probable que dichos productos de degradación realicen hibridación no específica y es menos probable que sean eficaces, en relación con sus

homólogos de longitud completa. Por lo tanto, es deseable usar oligonucleótidos que sean resistentes a la degradación en el cuerpo y que sean capaces de alcanzar las células diana. Los presentes oligonucleótidos pueden hacerse más resistentes a degradación *in vivo* sustituyendo con uno o más enlaces internucleotídicos artificiales internos los enlaces fosfodiéster nativos, por ejemplo, reemplazando fosfato con azufre en el enlace. Los ejemplos de enlaces que pueden usarse incluyen fosforotioatos, metilfosfonatos, sulfona, sulfato, cetilo, fosforoditioatos, diversos fosforamidatos, ésteres de fosfato, fosforotioatos enlazados y fosforamidatos enlazados. Dichos ejemplos son ilustrativos, en lugar de limitantes, ya que se conocen bien en la técnica otros enlaces internucleotídicos. La síntesis de oligonucleótidos que tienen uno o más de estos enlaces sustituyendo los enlaces internucleotídicos fosfodiéster se conoce bien en la técnica, incluyendo rutas sintéticas para producir oligonucleótidos que tienen enlaces internucleotídicos mixtos.

Los oligonucleótidos pueden hacerse resistentes a la extensión por enzimas endógenas por "recubrimiento terminal" o incorporando grupos similares en los nucleótidos 5' o 3' terminales. Un reactivo para recubrimiento terminal está disponible en el mercado como Amino-Link II™ de Applied BioSystems Inc, Foster City, CA. Se describen métodos para recubrimiento terminal, por ejemplo, en Shaw *et al* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19, 747-750 y Agrawal *et al* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(17), 7595-7599.

Un método adicional para preparar oligonucleótidos resistentes a ataque de nucleasa es "autoestabilizarlos" como se describe en Tang *et al* (1993) *Nucl. Acids Res.* 21, 2729-2735. Los oligonucleótidos autoestabilizados tienen estructuras de bucle en horquilla en sus extremos 3', y muestran resistencia aumentada a degradación por fosfodiesterasa de veneno de serpiente, ADN polimerasa I y suero bovino fetal. La región autoestabilizada del oligonucleótido no interfiere en la hibridación con ácidos nucleicos complementarios, y los estudios de farmacocinética y estabilidad en ratones han mostrado persistencia *in vivo* aumentada de los oligonucleótidos autoestabilizados con respecto a sus homólogos lineales.

En un ejemplo en el que el agente es un compuesto con afinidad de unión por tenascina C, el compuesto puede unirse de forma sustancialmente reversible o sustancialmente irreversible con un sitio activo de tenascina C. En un ejemplo adicional, el compuesto puede unirse con una parte de tenascina C que no es el sitio activo para interferir con la unión de la tenascina C con un ligando o receptor. En un ejemplo adicional más, el compuesto puede unirse con una parte de tenascina C para reducir la actividad de las proteínas por un efecto alostérico. Este efecto alostérico puede ser un efecto alostérico que está implicado en la regulación natural de la actividad de tenascina C, por ejemplo en la activación de la tenascina C por un "activador cadena arriba".

Se conocen bien en la técnica métodos para detectar interacciones entre un compuesto de ensayo y tenascina C. Por ejemplo puede usarse ultrafiltración con métodos de espectroscopia de masas de pulverización de iones/HPLC u otros métodos físicos y analíticos. Además, pueden usarse métodos de Transferencia de Resonancia de Energía Fluorescente (FRET), en los que puede medirse la unión de dos entidades marcadas con fluorescencia midiendo la interacción de los marcadores fluorescentes cuando están en proximidad estrecha entre sí.

Los métodos alternativos de detección de la unión de un polipéptido con macromoléculas, por ejemplo ADN, ARN, proteínas y fosfolípidos, incluyen un ensayo de resonancia de plasmón superficial, por ejemplo como se describe en Plant *et al.*, 1995, *Analyt Biochem* 226(2), 342-348. Los métodos pueden hacer uso de un polipéptido que está marcado, por ejemplo con un marcador radiactivo o fluorescente.

Un método adicional para identificar un compuesto que es capaz de unirse al polipéptido es uno en el que el polipéptido se expone al compuesto y cualquier unión del compuesto con dicho polipéptido se detecta y/o se mide. Puede determinarse la constante de unión para la unión del compuesto al polipéptido. Se conocen bien por los expertos en la materia métodos adecuados para detectar y/o medir (cuantificar) la unión de un compuesto con un polipéptido y pueden realizarse, por ejemplo, usando un método capaz de operar con alto rendimiento, por ejemplo un método basado en microplaca. Una nueva tecnología, denominada VLSIPS™, ha permitido la producción de microplacas extremadamente pequeñas que contienen cientos de miles o más sondas moleculares diferentes. Estas microplacas biológicas o matrices tienen sondas dispuestas en matrices, asignándose cada sonda a una localización específica. Se han producido microplacas biológicas en las que cada localización tiene una escala de, por ejemplo, diez micrómetros. Las microplacas pueden usarse para determinar si moléculas diana interaccionan con cualquiera de las sondas en la microplaca. Después de exponer la matriz a moléculas diana en condiciones de ensayo seleccionadas, dispositivos de exploración pueden examinar cada localización en la matriz y determinar si una molécula diana ha interaccionado con la sonda en esa localización.

Otro método para identificar compuestos con afinidad de unión por tenascina C es el sistema de dos híbridos de levadura, en el que los polipéptidos de la invención pueden usarse para "capturar" proteínas que se unen con tenascina C. El sistema de dos híbridos de levadura se describe en Fields y Song, *Nature* 340: 245-246 (1989).

En un ejemplo adicional, el agente es un compuesto que tiene capacidad de unión a ligando para tenascina C.

Por ejemplo, el agente puede ser un fragmento soluble de un receptor de tenascina C (tal como FPRL1). Como alternativa, el agente puede ser una molécula de alta afinidad que imita un anticuerpo (un denominado "affibody")

(por ejemplo, véase documento US 5.831.012 y www.affibody.se). Estos ligandos son proteínas pequeñas, sencillas compuestas de un haz de tres hélices basado en el armazón de uno de los dominios de unión a IgG de la Proteína A (una proteína de superficie de la bacteria *Staphylococcus aureus*). Este armazón tiene excelentes características como un ligando de afinidad y puede diseñarse para unirse con alta afinidad con cualquier proteína diana dada.

El agente del primer aspecto de la invención es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. El fragmento de unión a antígeno puede seleccionarse del grupo que consiste en fragmentos Fv (por ejemplo Fv monocatenario y Fv con enlaces disulfuro), fragmentos de tipo Fab (por ejemplo fragmentos Fab, fragmentos Fab' y fragmentos F(ab)₂), dominios variables individuales (por ejemplo, dominios V_H y V_L) y anticuerpos de dominio (dAb, incluyendo formatos individuales y dobles [es decir dAb-enlazador-dAb]).

El anticuerpo puede unirse preferentemente específicamente al dominio FBG que activa TLR4.

Las ventajas de usar fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos, son múltiples. El menor tamaño de los fragmentos puede conducir a mejores propiedades farmacológicas, tales como mejor penetración de tejido sólido. Además, fragmentos de unión a antígeno tales como fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, ScFv y dAb pueden expresarse en y secretarse de *E. coli*, permitiendo de este modo la fácil producción de grandes cantidades de dichos fragmentos.

También se incluyen dentro del alcance de la invención versiones modificadas de anticuerpos y un fragmento de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo modificados por la unión covalente de polietilenglicol u otro polímero adecuado.

Se conocen bien en la técnica métodos para generar anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos mediante uno cualquiera de varios métodos que emplean la inducción de producción *in vivo* de moléculas de anticuerpo, exploración de bibliotecas de inmunoglobulina (Orlandi. *et al.*, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 3833-3837; Winter *et al.*, 1991, Nature 349: 293-299) o generación de moléculas de anticuerpo monoclonal por líneas celulares en cultivo. Estos incluyen, pero sin limitación, la técnica de hibridoma, la técnica de hibridoma de linfocitos B humano, y la técnica de hibridoma de virus de Epstein-Barr (VEB) (Kohler *et al.*, 1975. Nature 256: 4950497; Kozbor *et al.*, 1985. J. Immunol. Methods 81: 31-42; Cote *et al.*, 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030; Cole *et al.*, 1984. Mol. Cell. Biol. 62: 109-120).

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales adecuados para antígenos seleccionados por técnicas conocidas, por ejemplo las desveladas en "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) y en "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications" J G R Hurrell (CRC Press, 1982).

Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo usando métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo Harlow y Lane, 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Por ejemplo, pueden prepararse fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la presente invención por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en *E. coli* o células de mamífero (por ejemplo cultivo de células de ovario de hámster Chino u otros sistemas de expresión de proteínas) de ADN que codifica el fragmento. Como alternativa, pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales.

Se apreciará por los expertos en la materia que para terapia o diagnóstico humano, se usan preferentemente anticuerpos humanizados. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos modificados por ingeniería genética o fragmentos de anticuerpo que tienen preferentemente partes mínimas derivadas de anticuerpos no humanos. Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos en los que se reemplazan regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo humano (anticuerpo receptor) por restos de una región determinante de complementariedad de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la funcionalidad deseada. En algunos casos, se reemplazan restos marco conservados de Fv del anticuerpo humano por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias marco conservadas o de región determinante de complementariedad importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones determinantes de complementariedad corresponden a las de un anticuerpo no humano y todas, o sustancialmente todas, las regiones marco conservadas corresponden a las de una secuencia consenso humana relevante. Los anticuerpos humanizados también incluye óptimamente al menos una parte de una región constante de anticuerpo, tal como una región Fc, normalmente derivada de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Jones *et al.*, 1986. Nature 321: 522-525; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332: 323-329; Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596).

Se conocen bien en la técnica métodos para humanizar anticuerpos no humanos. En general, el anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducido en él de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos, denominados con frecuencia restos importados, normalmente se toman de un dominio variable importado. La humanización puede realizarse esencialmente como se ha descrito (véase, por ejemplo,

- 5 Jones *et al.*, 1988, Nature 321: 522-525; Reichmann *et al.*, 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, Science 239: 1534-1536; documento US 4.816.567) sustituyendo regiones determinantes de complementariedad humanas con regiones determinantes de complementariedad de roedores correspondientes. En consecuencia, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados pueden ser normalmente anticuerpos humanos en los que se sustituyen algunos restos de región determinante de complementariedad y posiblemente algunos restos marco conservados por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.
- 10 También pueden identificarse anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en este campo, incluyendo bibliotecas de presentación de fagos (véase, por ejemplo, Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227: 381; Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol. 222: 581; Cole *et al.*, 1985, En: Monoclonal antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp. 77; Boerner *et al.*, 1991, J. Immunol. 147: 86-95).
- 15 Una vez que se han obtenido anticuerpos adecuados, pueden ensayarse con respecto a actividad, por ejemplo por ELISA.
- 20 El agente del primer aspecto de la invención puede ser un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene especificidad por el Receptor de Tipo Toll 4 (TLR4), correceptores de Receptor de Tipo Toll 4 (en la unión de tenascina-4, tenascina-C o un dominio de los mismos de cualquiera de estos).
- 25 Los correceptores para receptores primarios, tales como TLR4, ayudan en la unión de una molécula de señalización al receptor primario para facilitar el reconocimiento y la unión de ligando e iniciar/mantener el proceso biológico resultante de la unión al receptor.
- 30 El agente del primer aspecto de la invención puede ser un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene especificidad por el dominio FBG de tenascina C.
- También se describe en el presente documento un método para identificar un agente que modula la actividad de tenascina C que comprende las etapas de:
- (i) proporcionar uno o más agentes candidatos;
 - (ii) poner en contacto una o más células con tenascina C y el o los agentes candidatos;
 - (iii) poner en contacto una o más células con tenascina C y ningún agente candidato;
 - (iv) determinar si dicho agente candidato modula el efecto de tenascina C en la o las células en la etapa (ii) en comparación con la célula o las células de la etapa de control (iii).
- 40 Pueden llevarse a cabo métodos para determinar si el agente candidato modula el efecto de tenascina C usando los métodos de los ejemplos.
- El método puede dar como resultado que se regule positivamente la actividad de tenascina C.
- El método puede dar como resultado que se regule negativamente la actividad de tenascina C.
- 45 El método puede incluir las células de las etapas (ii) y (iii) (descritas anteriormente) que expresan receptor de tipo Toll 4 (TLR4).
- 50 El método puede tener la o las células seleccionadas del grupo que consiste en células inflamatorias, fibroblastos, células de tipo fibroblasto (incluyendo fibroblastos sinoviales de AR, también conocidos como sinoviocitos), fibroblastos embrionarios de ratón, células de riñón embrionario humano.
- Las células inflamatorias pueden seleccionarse del grupo que consiste en macrófagos, células dendríticas, monocitos, linfocitos, células de tipo monocito y células de tipo macrófago.
- 55 También se describe en el presente documento un método de identificación de un agente que modula una respuesta inflamatoria crónica realizando el método de identificar un agente que modula la actividad de tenascina C.
- 60 En este método la inflamación crónica puede asociarse con cualquier afección asociada a inflamación inapropiada. Dichas afecciones incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide (AR), afecciones autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias del intestino, heridas que no se curan, esclerosis múltiple, cáncer, aterosclerosis, enfermedad de sjogren, diabetes, lupus eritematoso (incluyendo lupus eritematoso sistémico), asma, enfermedades fibróticas (incluyendo cirrosis hepática), fibrosis pulmonar, daño por UV y psoriasis.
- 65 Es de interés particular, pero no exclusivo, que la inflamación crónica se asocia con artritis reumatoide (AR).

También se describe en el presente documento un agente identificado de acuerdo con el método del segundo y tercer aspectos de la invención. Dicho agente puede modular una respuesta inflamatoria crónica.

5 El agente puede regular negativamente la respuesta inflamatoria crónica.

El agente puede regular positivamente la respuesta inflamatoria crónica.

10 El agente puede seleccionarse del grupo que consiste en moléculas de ARN de interferencia corto (ARNip), moléculas de ARN en horquilla corto (ARNhp), oligonucleótidos antisentido, compuestos con afinidad de unión por tenascina C, anticuerpos (policlonales o monoclonales) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, compuestos inhibidores pequeños, polipéptidos y proteínas.

15 En el primer aspecto de la invención la inflamación crónica puede asociarse con cualquier afección asociada a inflamación inapropiada. Dichas afecciones incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide (AR), afecciones autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias del intestino, heridas que no se curan, esclerosis múltiple, cáncer, aterosclerosis, enfermedad de sjogren, diabetes, lupus eritematoso (incluyendo lupus eritematoso sistémico), asma, enfermedades fibróticas (incluyendo cirrosis hepática), fibrosis pulmonar, daño por UV y psoriasis.

20 En un segundo aspecto de la invención se proporciona una composición que comprende un agente como se define en el primer aspecto de la invención y un vehículo, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

25 Se apreciará por los expertos en la materia que dicha cantidad eficaz del agente o formulación del mismo puede suministrarse como una dosis de una única embolada (es decir administración aguda) o, más preferentemente, como una serie de dosis a lo largo del tiempo (es decir administración crónica).

30 Los agentes de la invención pueden formularse a diversas concentraciones, dependiendo de la eficacia/toxicidad del compuesto que se use y la indicación para la que se use. Preferentemente, la formulación comprende el agente de la invención a una concentración de entre 0,1 μM y 1 mM, más preferentemente entre 1 μM y 100 μM , entre 5 μM y 50 μM , entre 10 μM y 50 μM , entre 20 μM y 40 μM y más preferentemente aproximadamente 30 μM . Para aplicaciones *in vitro*, las formulaciones pueden comprender una concentración menor de un compuesto de la invención, por ejemplo entre 0,0025 μM y 1 μM .

35 Se apreciará por expertos en la materia que los agentes de la invención generalmente se administrarán en mezcla con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéutico adecuado seleccionado con respecto a la vía pretendida de administración y la práctica farmacéutica convencional (por ejemplo, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995, Ed. Alfonso Gennaro, Mack Publishing Company, Pensilvania; Estados Unidos).

40 Por ejemplo, los agentes de la invención pueden administrarse por vía oral, por vía bucal o por vía sublingual en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes saporíferos o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada. Los agentes de la invención también pueden administrarse mediante inyección intracavernosa.

45 Dichos comprimidos pueden contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato cálcico dibásico y glicina, disgregantes tales como almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato de almidón sódico, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábica. Adicionalmente, pueden incluirse agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, gliceril behenato y talco.

50 También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, celulosa, azúcar de la leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, los compuestos de la invención pueden combinarse con diversos agentes edulcorantes o saporíferos, materia colorante o tintes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

55 Los agentes de la invención también pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intraarticular, por vía intraarterial, por vía intraperitoneal, por vía intratecal, por vía intraventricular, por vía intraesternal, por vía intracraneal, por vía intramuscular o por vía subcutánea, o pueden administrarse por técnicas de infusión. Se usan mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer la solución isotónica con sangre. Las soluciones acuosas deberían tamponarse de forma adecuada (preferentemente a un pH de 3 a 9), si fuera necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se consigue fácilmente por técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia.

65 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estéril acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación

isotónica con la sangre del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo ampollas y frascos sellados, y pueden almacenarse en una condición criodesecada (liofilizada) que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. También pueden prepararse soluciones y suspensiones para inyección extemporánea de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito.

Para administración oral y parenteral a pacientes humanos, el nivel de dosificación diario de los agentes de la invención habitualmente será de 1 a 1000 mg por adulto (es decir de aproximadamente 0,015 a 15 mg/kg) administrados en dosis individuales o divididas.

Los agentes de la invención también pueden administrarse por vía intranasal o por inhalación y se suministran convenientemente en forma de un inhalador de polvo seco o una presentación de pulverización de aerosol de un recipiente presurizado, bomba, pulverizador o nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo diclorofluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A3) o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA3), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. El recipiente presurizado, bomba, pulverizador o nebulizador puede contener una solución o suspensión del compuesto activo, por ejemplo usando una mezcla de etanol y el propulsor como el disolvente, que puede contener adicionalmente un lubricante, por ejemplo, sorbitán trioleato. Pueden formularse cápsulas y cartuchos (hechos, por ejemplo, de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador para que contengan una mezcla de polvo de un compuesto de la invención y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las formulaciones de aerosol o polvo seco se disponen preferentemente de modo que cada dosis medida o "descarga" contenga al menos 1 mg de un compuesto de la invención para suministro al paciente. Se apreciará que la dosis diaria global con un aerosol variará de paciente a paciente, y puede administrarse en una única dosis o, más habitualmente, en dosis divididas a lo largo del día.

Como alternativa, los agentes de la invención pueden administrarse en forma de un supositorio o pesario, o pueden aplicarse por vía tópica en forma de una loción, solución, crema, pomada o polvo de uso externo. Los compuestos de la invención también pueden administrarse por vía transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche cutáneo. También pueden administrarse por la vía ocular.

Para uso oftálmico, los agentes de la invención pueden formularse como suspensiones micronizadas en solución salina isotónica, de pH ajustado, estéril o, preferentemente, como soluciones en solución salina isotónica, de pH ajustado, estéril, opcionalmente en combinación con un conservante tal como cloruro de benzalconio. Como alternativa, pueden formularse en un ungüento tal como vaselina.

Para aplicación por vía tópica a la piel, los agentes de la invención puede formularse como un ungüento adecuado que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, compuesto de polioxietileno polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, pueden formularse como una loción o crema adecuada, suspendida o disuelta en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, sorbitán monoestearato, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de cetil ésteres, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen grageas que comprenden el principio activo en una base con sabor, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.

Cuando el agente es un polipéptido, puede ser preferible usar un sistema de suministro farmacológico de liberación prolongada, tal como microesferas. Estas se diseñan específicamente para reducir la frecuencia de las inyecciones. Un ejemplo de dicho sistema es el Depósito Nutropin que encapsula hormona del crecimiento humana recombinante (rhGH) en microesferas biodegradables que, una vez inyectadas, liberan la rhGH lentamente durante un periodo prolongado.

Como alternativa, pueden administrarse agentes polipeptídicos de la presente invención por un dispositivo implantado de forma quirúrgica que libera el fármaco directamente al sitio requerido.

También pueden emplearse sistemas de terapia de electroporación (EPT) para la administración de proteínas y polipéptidos. Un dispositivo que suministra un campo eléctrico por pulsos a células aumenta la permeabilidad de las membranas celulares al fármaco, dando como resultado una potenciación significativa del suministro farmacológico intracelular.

También pueden suministrarse proteínas y polipéptidos por electroincorporación (EI). La EI se produce cuando partículas pequeñas de hasta 30 micrómetros de diámetro en la superficie de la piel experimentan pulsos eléctricos idénticos o similares a los usados en la electroporación. En la EI, estas partículas se conducen a través del estrato córneo y hacia las capas más profundas de la piel. Las partículas pueden cargarse o recubrirse con fármacos o genes o pueden actuar simplemente como "balas" que generan poros en la piel a través de los que pueden entrar los fármacos.

Un método alternativo de suministro de proteínas y polipéptidos es el inyectable ReGel termosensible. Por debajo de la temperatura corporal, ReGel es un líquido inyectable mientras que a temperatura corporal forma inmediatamente un depósito de gel que lentamente se degrada y se disuelve en polímeros conocidos, seguros, biodegradables. El fármaco activo se suministra a lo largo del tiempo a medida que se disuelven los biopolímeros.

Los productos farmacéuticos proteicos y polipeptídicos también pueden suministrarse por vía oral. Uno de dichos sistemas emplea un proceso natural para la captación oral de vitamina B12 en el cuerpo para suministrar conjuntamente proteínas y polipéptidos. Acoplándose al sistema de captación de vitamina B12, la proteína o el polipéptido puede moverse a través de la pared intestinal. Se producen complejos entre análogos de vitamina B12 y el fármaco que conservan tanto afinidad significativa por el factor intrínseco (FI) en la parte de vitamina B12 del complejo como bioactividad significativa de la parte farmacológica del complejo.

También se conocen bien en la técnica métodos para administrar agentes oligonucleotídicos o polinucleotídicos de la invención (véase Dass, 2002, *J Pharm Pharmacol.* 54(1): 3-27; Dass, 2001, *Drug Deliv.* 8(4): 191-213; Lebedeva *et al.*, 2000, *Eur J Pharm Biopharm.* 50(1): 101-19; Pierce *et al.*, 2005, *Mini Rev Med Chem.* 5(1): 41-55; Lysik y WuPong, 2003, *J Pharm Sci.* 2003 2(8): 1-559-73; Dass, 2004, *Biotechnol Appl Biochem.* 40(Pt 2): 113-22; Medina, 2004, *Curr Pharm Des.* 10(24): 2981-9).

La composición del segundo aspecto de la invención puede comprender además al menos otro agente.

Dicho agente adicional puede ser una agente antiinflamatorio que incluye pero sin limitación un agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un fármaco antirreumático modificador de enfermedad (DMARD), una estatina (incluyendo inhibidores de HMG-CoA reductasa tales como simvastatina), un agente biológico (productos biológicos), un esteroide, un agente inmunosupresor, un salicilato y/o un agente microbicida. Los agentes antiinflamatorios no esteroideos incluyen agentes antimetabolitos (tales como metotrexato) y agentes de oro antiinflamatorios (incluyendo tiomalato sódico de oro, aurotiomalato o sales de oro, tales como auranofina). Los productos biológicos incluyen agentes anti TNF (incluyendo adalimumab, etanercept, infliximab, reactivos anti IL-1, reactivos anti IL-6, reactivos anti linfocitos B (retoximab), reactivos anti linfocitos T (anticuerpos anti CD4), reactivos anti IL-15, reactivos anti CLTA4, reactivos anti RAGE), anticuerpos, receptores solubles, proteínas de unión a receptores, proteínas de unión a citocinas, proteínas mutantes con funciones alteradas o atenuadas, ARNi, aptámeros polinucleotídicos, oligonucleótidos antisentido o ácidos grasos omega 3. Los esteroides (también conocidos como corticosteroides) incluyen cortisona, prednisolona o dexametasona. Los agentes inmunosupresores incluyen ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico. Los salicilatos incluyen aspirina, salicilato sódico, salicilato de colina y salicilato de magnesio. Los agentes microbicidas incluyen quinina y cloroquina. Por ejemplo, el agente puede administrarse en combinación con uno o más de un AINE, DMARD o inmunosupresor.

También se describe en el presente documento un agente o composición como se define en el presente documento para su uso como un medicamento.

En un tercer aspecto de la invención se proporciona un agente o composición como se ha definido en el primer o segundo aspectos de la invención para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria crónica, en el que la respuesta inflamatoria crónica se asocia con artritis reumatoide (AR), enfermedades inflamatorias del intestino, aterosclerosis y/o psoriasis.

En un cuarto aspecto de la invención se proporciona el uso de un agente o composición como se define en el primer o segundo aspectos de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección inflamatoria crónica, en el que la respuesta inflamatoria crónica se asocia con artritis reumatoide (AR), enfermedades inflamatorias del intestino, aterosclerosis y/o psoriasis.

También se describe en el presente documento un método para tratar una afección inflamatoria crónica que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un agente o composición como se define en el presente documento.

El agente, composición, uso o método como se define en el presente documento puede relacionarse con el tratamiento de una afección inflamatoria crónica en el que la afección se asocia con cualquier afección asociada a inflamación inapropiada. Dichas afecciones incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide (AR), afecciones autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias del intestino, heridas que no se curan, esclerosis múltiple, cáncer, aterosclerosis, enfermedad de sjogren, diabetes, lupus eritematoso (incluyendo lupus eritematoso sistémico), asma, enfermedades fibróticas (incluyendo cirrosis hepática), fibrosis pulmonar, daño por UV y psoriasis.

También se describe en el presente documento un kit de partes para realizar los métodos descritos en el presente documento que comprende:

- 5 (i) una o más células
 (ii) una muestra de control de una o más células
 (iii) una muestra de tenascina C
 (iv) instrucciones para su uso

El kit puede comprender opcionalmente:

- 10 (v) un agente candidato.

El kit puede comprender además opcionalmente

- 15 (vi) medios para determinar el efecto de un agente candidato en la actividad de tenascina C o inflamación crónica.

En un quinto aspecto de la invención se proporciona un kit de partes que comprende:

- 20 (i) un agente o composición como se ha definido en el primer o segundo aspectos de la invención
 (ii) medios de administración
 (iii) instrucciones para su uso

El kit del quinto aspecto de la invención puede comprender además opcionalmente

- 25 (iv) al menos otro agente.

Definiciones

- 30 Por "inflamación" se incluye el significado de acumulación local de fluido, proteínas plasmáticas y glóbulos blancos que se inicia por lesión tisular, infección o una respuesta inmunitaria local.

- 35 Por "inflamación aguda" se incluye el significado de los estadios iniciales (inicio) de la inflamación y la respuesta inflamatoria transitoria a corto plazo inmediatamente después de la lesión, infección o respuesta inmunitaria local. Normalmente, la inflamación aguda se resuelve rápidamente, durando de varios minutos a no más de varios días.

- 40 Por "inflamación crónica" se incluye el significado de inflamación persistente y/o no resuelta. Se asocia con frecuencia con la destrucción inapropiada de tejido sano. Esta puede ser progresiva y durar un periodo de semanas o más. La inflamación crónica normalmente se asocia con infección o enfermedad persistente incluyendo, pero sin limitación, afecciones autoinmunitarias.

- 45 Por "inflamación crónica de la articulación" se incluye el significado de inflamación persistente que es progresiva y no remite durante un periodo de semanas a meses, dando como resultado distorsión de la articulación afectada y pruebas radiográficas de destrucción de cartílago y hueso como se observa en enfermedad humana (Kelly, Harris, Ruddy y Sledge, Textbook of Rheumatology 4^a Edición).

- 50 En modelos murinos experimentales, la inflamación crónica de la articulación se caracteriza por inflamación que no disminuye y provoca destrucción tisular inapropiada, incluso durante un periodo de tiempo relativamente corto. Esto se caracteriza (y puede identificarse) histológicamente por la presencia prolongada de células inflamatorias en el sinovio y espacio de la articulación, muerte de condrocitos y erosión del cartílago y el hueso.

Por un "agente" se entienden todas las entidades químicas, por ejemplo oligonucleótidos, polinucleótidos, polipéptidos, peptidomiméticos y compuestos pequeños.

- 55 Por "fragmento" se entienden al menos 10 nucleótidos, por ejemplo al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos.

- 60 Por "variante" se entiende que la secuencia de nucleótidos comparte al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de interés de longitud completa, por ejemplo al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia.

- 65 El porcentaje de identidad de secuencia entre dos polinucleótidos puede determinarse usando programas informáticos adecuados, por ejemplo el programa GAP del Grupo de Informática Genética de la Universidad de Wisconsin y se apreciará que el porcentaje de identidad se calcula en relación con polinucleótidos cuyas secuencias se han alineado de forma óptima.

El alineamiento puede como alternativa llevarse a cabo usando el programa Clustal W (como se describe en Thompson *et al.*, 1994, Nuc. Acid Res. 22: 4673-4680).

Los parámetros usados pueden ser los siguientes:

Parámetros de alineamiento por pares rápido: tamaño K-tuple (palabra); 1, tamaño de ventana; 5, penalización de hueco; 3, número de diagonales superiores; 5. Método de puntuación: x por ciento.

Parámetros de alineamiento múltiple: penalización de hueco abierto; 10, penalización de extensión de hueco; 0,05.

Matriz de puntuación: BLOSUM.

Como alternativa, el programa BESTFIT puede usarse para determinar alineamientos de secuencias locales.

Por "anticuerpo" se entienden moléculas de anticuerpos sustancialmente intactas, así como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos (en los que al menos un aminoácido está mutado en relación con los anticuerpos humanos de origen natural), anticuerpos monocatenarios, anticuerpos biespecíficos, cadenas pesadas de anticuerpos, cadenas ligeras de anticuerpos, homodímeros y heterodímeros de cadenas pesadas y/o ligeras de anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno y derivados de los mismos.

Por "fragmento de unión a antígeno" se entiende un fragmento funcional de un anticuerpo que es capaz de unirse con tenascina C.

El término "sujeto" significa todos los animales incluyendo seres humanos. Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, vacas, perros, gatos, cabras, ovejas y cerdos. El término "paciente" significa un sujeto que tiene un trastorno que necesita tratamiento.

Como se usa en el presente documento, "formulación farmacéutica" significa una formulación terapéuticamente eficaz de acuerdo con la invención.

Una "cantidad terapéutica eficaz" o "cantidad eficaz" o "eficaz terapéutica", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una afección y régimen de administración dados. Esta es una cantidad predeterminada de material activo que se ha calculado que produce un efecto terapéutico deseado en asociación con el aditivo y diluyente requeridos, es decir un transportador o vehículo de administración. Además, se pretende que signifique una cantidad suficiente para reducir y más preferentemente prevenir un déficit clínicamente significativo en la actividad, función y respuesta del hospedador. Como alternativa, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para provocar una mejora en una afección clínicamente significativa en un hospedador. Como se aprecia por los expertos en la materia, la cantidad de un compuesto puede variar dependiendo de su actividad específica. Las cantidades de dosificación adecuadas pueden contener una cantidad predeterminada de composición activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido. En los métodos y uso para fabricación de composiciones de la invención, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz del componente activo. Puede determinarse una cantidad terapéuticamente eficaz por el trabajador médico o veterinario experto habitual basándose en características del paciente, tales como edad, peso, sexo, condición, complicaciones, otras enfermedades, etc., como se conoce bien en la técnica.

Se describirán ahora ejemplos que representan un aspecto de la invención con referencia a las siguientes figuras en las que:

Figura 1. Resolución acelerada de la inflamación aguda en ratones deficientes en tenascina C.

(a) Hinchazón de la pata en ratones de tipo silvestre (+/+) (barras blancas) y sin tenascina C (-/-) (barras negras) a lo largo del tiempo después de la inyección de zimosano. Los datos se muestran como el aumento medio del diámetro de la pata en comparación con el diámetro de la pata antes de la inyección +/-ETM (n = 24 ratones por genotipo). **= p<0,01. (b-e) Secciones representativas de la articulación del tobillo de ratones de tipo silvestre (b, c) y sin tenascina C (d, e) 4 días después de la inyección de zimosano, teñidas con hematoxilina y eosina (b, d) y safranina-O (c, e). Las cajas destacan el sinovio de la articulación (s) y proteoglicano del cartílago (cp). Aumento x10. Cuantificación de la inflamación de la articulación (f) y muerte de condrocitos (g) en articulaciones de la rodilla 4 días después de la inyección con zimosano de ratones de tipo silvestre (barras blancas) y ratones sin tenascina C (barras negras). Los datos se expresan como la media (+/-DT) (n = 24 ratones por genotipo). * = p < 0,05.

Figura 2. Se induce inflamación sinovial en ratones deficientes en tenascina C tras la inyección de antígeno.

(a-b, g) Secciones representativas de la articulación de la rodilla de ratones de tipo silvestre inyectados con simulación. (c-f, h-i) Secciones representativas de la articulación de la rodilla de ratones de tipo silvestre (c, d, h) o sin tenascina C (e, f, i) 24 horas después de la inyección intraarticular de mBSA. La infiltración de células inflamatorias en la cápsula, menisco y el espacio de la articulación de ratones tanto de tipo silvestre como sin tenascina C se destaca por (cap), (M) y (J) respectivamente. (S) Destaca el sinovio sano de ratones inyectados con simulación que no tiene más de 1-3 células de grosor a lo largo de la superficie ósea completa y (ST) destaca los sinovios de ratones de tipo silvestre y sin tenascina C que están ambos significativamente engrosados. Las secciones se tiñen con hematoxilina y eosina (a, c, e, g, h, i) y safranina O (b, d, f). Aumento x10 (a-f) o x40 (g-i). (n = 5 ratones por genotipo).

Figura 3. La inflamación sinovial disminuye rápidamente en ratones deficientes en tenascina C.

Secciones representativas de la articulación de la rodilla de ratones de tipo silvestre (a, b, f) o sin tenascina C (c, d, e) 3 días después de la inyección intraarticular de mBSA. (a, c) La línea destaca inflamación aumentada de la cápsula en ratones de tipo silvestre en comparación con ratones sin tenascina C. (b, d) (cp) destaca pérdida de proteoglicano de cartílago aumentado en ratones de tipo silvestre en comparación con ratones sin tenascina C. (e, f) Se observan hiperplasia sinovial significativa (línea), depósitos celulares y de fibrina en el espacio de la articulación (flecha) e invasión de pannus (cabezas de flecha) en ratones de tipo silvestre en comparación con ratones sin tenascina C. Las secciones se tiñen con hematoxilina y eosina (a, c, e, f) y safranina O (b, d). Aumento x10 (a-d) o x20 (e-f). (n = 5 ratones por genotipo).

Figura 4. Se protegen ratones deficientes en tenascina C de destrucción tisular durante la artritis inducida por antígeno.

(a-b) Secciones representativas de la articulación de la rodilla de ratones de tipo silvestre 7 días después de la inyección intraarticular de mBSA, teñidos con hematoxilina y eosina (a) y safranina-O (b). Aumento x10. (n = 24 ratones por genotipo). La cabeza de flecha destaca el área de erosión del hueso. La flecha destaca la invasión de pannus en el cartílago articular. (c-d) Secciones representativas de la articulación de la rodilla de ratones de tipo sin tenascina-C 7 días después de la inyección intraarticular de mBSA, teñidas con hematoxilina y eosina (c) y safranina-O (d). Aumento x10. (n = 24 ratones por genotipo). J destaca el espacio de la articulación y AC el cartílago articular intacto. (e) Puntuación histológica de inflamación de la articulación de la rodilla 24 horas, 3 días y 7 días después de la inyección con mBSA de ratones de tipo silvestre (barras blancas) y ratones sin tenascina C (barras negras). Los datos representan la media +/- DT (n = 5 por genotipo (24h, 3d) o 24 por genotipo (7d)). (f) Cuantificación de la muerte de condrocitos, erosión de superficie del cartílago y erosión del hueso después de la inyección con mBSA en articulaciones de la rodilla de ratones de tipo silvestre (barras blancas) y ratones sin tenascina C (barras negras). Se muestra la muerte de condrocitos a las 24 horas, 3 días y 7 días, y la erosión de superficie del cartílago y erosión del hueso a los 7 días. Los datos representan la media +/- DT (n = 5 por genotipo (24h, 3d) o 24 por genotipo (7d)).

Figura 5. La tenascina C induce síntesis de TNF- α , IL-6 e IL-8 en macrófagos humanos primarios y fibroblastos sinoviales de AR.

(a-b) Los macrófagos humanos primarios (a) y fibroblastos sinoviales con AR (b) no se estimularon (sin adición) o se estimularon con LPS (1 ng/ml (a) o 10 ng/ml (b)) o tenascina C recombinante (1,0 μ M – 1,0 nM) durante 24 horas. Los datos mostrados son la media de valores por triplicado (+/-DT) de uno de tres experimentos representativos. (c) Los macrófagos humanos primarios no se estimularon (sin adición) o se estimularon con LPS (1 ng/ml) o tenascina C recombinante (1,0 μ M) durante 24 horas. (-) indica que las células se preincubaron solamente con medio. (P) Las células se preincubaron con polimixina B 25 μ g/ml durante 30 minutos antes de la estimulación. (H) Las células se incubaron con medio sin adición o que contenía LPS o tenascina C que se hirvió durante 15 minutos antes de la adición a las células. Los datos mostrados son la medida de valores por triplicado (+/- DT) de uno de tres experimentos representativos.

Figura 6. El dominio FBG de tenascina C media en la estimulación de síntesis de citocinas *in vivo* e *in vitro*.

(a) Los macrófagos humanos primarios no se estimularon (sin adición) o se estimularon con LPS (1 ng/ml), tenascina C recombinante (TNC) o dominios de tenascina C 1,0 μ M (TA, EGF-L, TNIII1-5, TNIII1-3, TNIII3-5, TNIII5-7, TNIII6-8 y FBG) durante 24 horas. Los datos mostrados son la media de valores por triplicado (+/-DT) de uno de tres experimentos representativos. (b) Las células de membrana sinovial con AR no se estimularon (sin adición) o se estimularon con LPS (10 ng/ml) o FBG recombinante (1,0 – 0,01 μ M) durante 24 horas. Los datos mostrados son la media del porcentaje de cambio en los niveles de citocinas en comparación con células no estimuladas (+/- ETM) de cinco pacientes diferentes. (c-h) Secciones

representativas de la articulación de la rodilla de ratones de tipo silvestre 3 días después de la inyección intraarticular de PBS (c-e) o 1 µg de FBG (f-h). Las secciones se tiñen con hematoxilina y eosina (c,d,f,g) o Safranina-O (e, h). Aumento x10 (c, f) o x25 (d,e,g,h) (n = 5 ratones por genotipo). (i) Cuantificación de inflamación de la articulación, erosión del hueso, erosión de superficie del cartílago y muerte de condrocitos en las articulaciones de la rodilla de ratones de tipo silvestre 3 días después de la inyección intraarticular de PBS (barras negras) o 1 µg de FBG (barras blancas). Los datos representan la media +/- DT (n = 5 por genotipo).

Figura 7. La síntesis de citocinas mediada por FBG es dependiente de MyD88.

(a) Los fibroblastos sinoviales de AR humanos no estaban infectados, se infectaron con adenovirus que expresaba GFP solamente (AdGFP) o se infectaron con adenovirus que expresaba MyD88 negativo dominante (AdMyD88dn). Las células no se estimularon, se estimularon con LPS (10 ng/ml) o se estimularon con FBG (1 µM) durante 24 horas. Los datos mostrados son la media de tres experimentos independientes (+/- ETM). (b) Los fibroblastos embrionarios de ratón aislados de ratones de tipo silvestre (+/+) o deficientes en MyD88 (-/-) no se estimularon (-) o se estimularon con PAM3 (100 ng/ml), LPS (100 ng/ml), TNFα (100 ng/ml), IL-1 (5 ng/ml) y FBG (1 µM) durante 24 horas. Los datos mostrados son la media de tres experimentos independientes (+/-ETM).

Figura 8. La síntesis de citocinas mediada por FBG es dependiente de TLR4 pero no requiere CD14 o MD-2.

(a) Se preincubaron macrófagos humanos primarios con medio solamente o medio que contenía anticuerpos bloqueadores de función para TLR2 (10 µg/ml), TLR4 (25 µg/ml) o anticuerpos de control de isotipo (25 µg/ml) durante 30 minutos antes de la estimulación. Las células no se estimularon, o se estimularon con LPS (1 ng/ml), FBG (1 µM) o PAM3 (10 ng/ml) durante 24 horas. Los datos mostrados son la media de tres experimentos independientes (+/-ETM). (b) Los fibroblastos embrionarios de ratón aislados de ratones de tipo silvestre, deficientes en TLR2 (TLR2 -/-) o TLR4 (TLR4 -/-) no se estimularon o se estimularon con PAM3 (100 ng/ml), LPS (100 ng/ml), IL-1 (5 ng/ml) y FBG (1 µM) durante 24 horas. Los datos mostrados son la media de tres experimentos independientes (+/-ETM). (c) Los macrófagos derivados de médula ósea aislados de ratones de tipo silvestre, deficientes en TLR2 (TLR2 -/-) o TLR4 (TLR4 -/-) no se estimularon o se estimularon con PAM3 (100 ng/ml), LPS (100 ng/ml) o FBG (1 µM) durante 24 horas. Los datos mostrados son la media de tres experimentos independientes (+/-ETM). (d) Se preincubaron macrófagos humanos sin inhibidor, con mAb LPS 1 µg/ml o anticuerpo anti CD14 10 µg/ml durante 30 minutos antes de la estimulación con LPS (1 ng/ml), FBG (1 µM) o PAM3 (10 ng/ml) durante 24 horas. Los datos mostrados son la media de tres experimentos independientes (+/-ETM).

Figura 9. Hinchazón de la pata a lo largo del tiempo después de la inyección de zimosano.

Imágenes representativas de las patas de ratones sin tenascina C no inyectados (a, e) (diámetro 1,6 mm), ratones sin tenascina C 24 horas (d, f) (diámetro 2,5 mm) y 4d (b, h) (diámetro 1,7 mm) después de la inyección de zimosano y de ratones de tipo silvestre 4 días después de la inyección de zimosano (c, g) (diámetro 2,1 mm).

Figura 10. Síntesis de proteínas recombinantes.

(a) Estructura de dominio del monómero de tenascina C que comprende diferentes dominios, incluyendo el dominio de ensamblaje (TA), 14 y media repeticiones de tipo EGF (EGF-L), 17 repeticiones de tipo fibronectina tipo III (TNIII) (8 expresadas de forma constitutiva (1-8) y 9 que pueden cortarse y empalmarse de forma alternativa, y un glóbulo de tipo fibrinógeno (FBG). (b) Las regiones abarcadas por las proteínas recombinantes que se sintetizaron, los restos de aminoácidos correspondientes y el peso molecular de cada proteína.

Figura 11. Análisis de pureza de proteínas.

Gel teñido con plata que muestra 1 µg de cada proteína recombinante analizado por SDS-PAGE en condiciones reductoras. Carril: 1 (TA), 2 (EGF-L), 3 (TNIII1-5), 4 (TNIII5-7), 5 (TNIII6-8), 6 (TNIII1-3), 7 (TNIII3-6) y 8 (FBG).

Figura 12. La inflamación de las articulaciones mediada por FBG *in vivo* requiere la expresión de TLR4.

Secciones representativas de la articulación de la rodilla de ratones sin TLR2 (a) y TLR4 (b) 3 días después de la inyección intraarticular de 1 µg de FBG. Las secciones están teñidas con hematoxilina y eosina. Aumento x10 (n = 5 ratones por genotipo). (c) Cuantificación de la inflamación de la articulación, erosión del hueso, erosión de la superficie del cartílago y muerte de condrocitos en las articulaciones de la rodilla de ratones sin TLR2 (barras blancas) y TLR4 (barras negras) 3 días después de la inyección intraarticular de 1 µg de FBG. Los datos representan la media +/- DT (n = 5 por genotipo).

Figura 13. Secuencia de aminoácidos de tenascina C humana y sus dominios

Figura 14. Secuencia de nucleótidos de tenascina C humana

Figura 15. Síntesis de TNF en respuesta a péptidos de FBG específicos.

Síntesis de TNF por cultivos de membrana con AR incubados durante 24 horas sin adición o con 100 μ M de cada péptido de FBG (P1, P3-P9).

5 **Figura 16. Síntesis de TNF e IL8 en respuesta a diversas concentraciones de péptidos de FBG específicos.**

Síntesis de TNF e IL8 por cultivos de membrana con AR incubados durante 24 horas sin adiciones o con 25, 100 o 250 μ M de péptido de FBG.

10 **Figura 17. Síntesis de IL8 en respuesta a LPS, dominio de FBG completo o péptidos de FBG específicos.**

Síntesis de IL8 por macrófagos después de 24 horas de incubación sin adición, con LPS 1 ng/ml, dominio de FBG completo 1 μ M (FBG) o péptidos de FBG 1 o 20 μ M (P1, P3-P9).

15 **Figura 18. Síntesis de IL8 y TNF en respuesta a LPS y FBG después de preincubación con péptidos de FBG.**

Síntesis de TNF e IL8 por macrófagos después de 24 horas de incubación sin adición, con LPS 1 ng/ml o dominio de FBG completo 1 μ M (FBG) con o sin preincubación con péptidos de FBG 20 μ M.

20 **Figura 19. Síntesis de IL8 y TNF en respuesta a ARNip dirigidos a tenascina C.**

Niveles de ARNm de tenascina C en fibroblastos con AR transfectados con ARNip específico de luciferasa (control) o con ARNip dirigidos a tenascina C: oligo 1 (ip 1), oligo 2 (ip 2) o una combinación de oligos 1+2 (ip 1+2). Síntesis de IL6 en fibroblastos con AR transfectados con ARNip de luciferasa (control) o con una combinación de oligos dirigidos a tenascina C 1+2 (ARNip) en presencia o ausencia de LPS 10 ng/ml durante 24 horas.

25

Ejemplo 1 –métodos generales

Reactivos

30 El zimosano, BSA metilado y adyuvante completo de Freund, anticuerpo anti FLAG M2 (anticuerpo monoclonal de ratón), blasticidina y anticuerpos de control de isotipo (IgG2a, IgG1 de ratón) fueron de Sigma-Aldrich (Dorset, Reino Unido). Hypnorm fue de VetaPharma Ltd. (Leeds, Reino Unido). El ensayo de lisado de *Limulus amaebocyte* fue de Associates of Cape Cod (Liverpool, Reino Unido). Las células de riñón embrionario humano de tipo silvestre (HEK293-EBNA) fueron de Invitrogen (Groningen, Países Bajos). M-CSF e IL-1 β fueron de PeproTech (Neuilly-Sur-Seine, Francia). DMEM, RPMI 1640, suero bovino fetal (FBS), penicilina/estreptomina, solución antimicótica-antibiótica PSA y β -mercaptoetanol fueron de PAA Laboratories (Yeovil, Reino Unido). Las líneas celulares HEK293 que expresaban de forma estable TLR2 humano y TLR4/CD14/MD-2, polimixina B, msbB LPS y los anticuerpos bloqueadores de función TLR2 (Clon: TL2.1 *Isotipo*: IgG2a de ratón) y TLR4 (Clon: HTA125 *Isotipo*: IgG2a de ratón) fueron de Invivogen (Calne, Reino Unido). LPS de *Escherichia coli* purificado en fenol-cloroformo (rugoso y liso) y Pam3Cys-Ser-Lys4 (Pam3C) fueron de Alexis (Birmingham, Reino Unido). TNF- α y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra-IL-1 F3) murinos fueron de R&D Systems (Abingdon, Reino Unido). Los anticuerpos de bloqueo de función anti CD14 (*Isotipo*: IgG1 de ratón) fueron de Abcam (Cambridge, Reino Unido). Los ELISA de TNF- α , IL-6 e IL-8 humanos y murinos fueron de Pharmingen (Oxford, Reino Unido).

45 *Purificación de tenascina C de longitud completa*

Para asegurar que la producción de citocinas no se atribuía a contaminantes bacterianos tales como LPS y moléculas asociadas a LPS se purificó tenascina C humana de longitud completa recombinante a partir de medio acondicionado de la línea celular de mamífero HEK293 transfectada con tenascina C humana marcada con his en el vector pCEP-pu como se ha descrito (Lange (2007)). Se purificó tenascina C hasta su homogeneidad como se ha descrito (Lange (2007)) y se determinó que estaba libre de contaminación de LPS usando el ensayo de lisado de *Limulus amaebocyte* de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

55 *Síntesis de proteínas recombinantes*

Se sintetizaron proteínas correspondientes a cada dominio de tenascina C (TA, EGF-L, diversas repeticiones de TNIII y FBG) y se purificaron. Véase Ejemplo 2.

60 *Medición de la contaminación con LPS en proteínas recombinantes*

Para determinar los niveles de LPS en cada proteína recombinante se usó el ensayo del lisado de *Limulus amaebocyte* de acuerdo con las instrucciones del fabricante (sensibilidad $\sim 0,7 \pm 0,5$ pg de LPS por mg de proteína). Todas las proteínas recombinantes usadas en este estudio tenían niveles de LPS que eran menores de 10 pg/ml.

65

Vectores adenovirales y su propagación

Se obstruyeron de forma interna vectores adenovirales recombinantes, deficientes en replicación que codificaban MyD88 de tipo silvestre (AdMyD88wt), formas negativas dominantes de MyD88 (AdMyD88dn) y control de GFP (AdGFP). Hay una descripción de la síntesis de estos virus en Andreaskos (2004). Todos los virus usados en este estudio tienen supresión de E1/E3, pertenecen al serotipo de Ad5. Los virus se propagaron en 293 células de riñón embrionario humano, se purificaron por ultracentrifugación a través de dos gradientes de cloruro de cesio, y se determinaron sus títulos virales por ensayo de placas como se ha descrito previamente (Sacre (2007)).

10 *Animales*

El profesor Charles French-Constant (Universidad de Edimburgo, Reino Unido) proporcionó ratones deficientes en tenascina C homocigotos de la cepa original descrita por Saga (1992) en 129/sv una cepa endogámica de ratones con un fondo de vientre blanco y apariencia de agutí. Se obtuvieron ratones 129/sv de tipo silvestre, endogámicos, congénicos de la misma edad de Charles River (Margate, Reino Unido). Todos los ratones 129/sv de tipo silvestre y deficientes en tenascina C fueron macho y de entre 8 y 10 semanas de edad en el momento de la experimentación.

Se obtuvieron ratones deficientes en TLR2 y TLR4 homocigotos en un fondo de C57BL/6 (una cepa endogámica de ratones con un pelaje negro) de B&K Universal (Hull, Reino Unido) Hoshino (1999) y Takeuchi (1999). Se proporcionaron ratones deficientes en MyD88 homocigotos en un fondo de C57BL/6 por el Instituto Sanger (Cambridge, Reino Unido). Se obtuvieron ratones C57B/L6 de tipo silvestre endogámicos congénicos de la misma edad de Charles River (Margate, Reino Unido). Para el aislamiento de fibroblastos de embrión de ratón se apareó una hembra de 8-10 semanas de edad con dos machos de 8-10 semanas de edad. Para el aislamiento de macrófagos derivados de médula ósea los ratones fueron hembra y entre 10 y 12 semanas de edad en el momento de la experimentación.

Todos los animales se alimentaron con pienso para roedores convencional y agua a voluntad, y se alojaron (<6 ratones/jaula) en jaulas revestidas con serrín en un ambiente de aire acondicionado con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los procedimientos animales se aprobaron por el comité de ética institucional.

30 *Métodos Estadísticos*

Se calcularon la media, DT, ETM y ensayos estadísticos usando GraphPad versión 3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Se analizaron las medias de múltiples grupos por análisis de varianza de una vía, seguido del ensayo de Comparaciones Múltiples de Dunnett, cuando fue apropiado. Se usó ensayo de t para muestras no relacionadas para experimentos que implicaban solamente dos grupos.

Ejemplo 2 - Síntesis de proteínas recombinantes

40 Se sintetizaron y purificaron proteínas correspondientes a cada dominio de tenascina C (TA, EGF-L, diversas repeticiones de TNIII y FBG). Las proteínas recombinantes sintetizadas se representan en la Figura 9.

Reactivos

45 La Pfu Turbo polimerasa fue de Stratagene (Ámsterdam, Países Bajos). Los tubos de PCR Easy mix 50 fueron de Molecular Bioproducts (Lutterworth, Reino Unido). Los kits RNeasy y columnas de Ni²⁺-NTA-agarosa fueron de Qiagen (Crawley, Reino Unido). El vector pCR Blunt, vector plasmídico pCEP4, células de riñón embrionario humano (HEK293-EBNA) y geles de gradiente de Bis-Tris 4-12 % fueron de Invitrogen (Groningen, Países Bajos). El vector pET32b y células BL21 (DE3) Rosetta fueron de Novagen (Kent, Reino Unido). Las columnas HiTrap Q, columnas HiTrap S, columna Sephacryl S500 HR y columnas de heparina sepharose fueron de Amersham (Buckinghamshire, Reino Unido).

55 Se obtuvieron enzimas de restricción de New England BioLabs (Hitchin, Reino Unido). DMEM, suero bovino fetal (FBS) y penicilina/estreptomina fueron de PAA laboratories (Yeovil, Reino Unido). El reactivo de transfección FuGENE6 fue de Roche Applied Science (Basilea, Suiza).

60 El anticuerpo anti FLAG M2 (anticuerpo monoclonal de ratón), anti FLAG M2-agarosa, péptido FLAG fueron de Sigma-Aldrich (Dorset, Reino Unido). El anticuerpo anti tetra-his (anticuerpo monoclonal de ratón) fue de Qiagen (Crawley, Reino Unido). IgG de cabra anti (IgG de ratón) conjugado con fosfatasa alcalina y sustrato estabilizado con Western Blue para fosfatasa alcalina fueron de Promega (Southampton, Reino Unido). Los Patrones de Proteína de Precisión para SDS-PAGE fueron de BioRad (Hemel Hempstead, Reino Unido).

Diseño de cebadores

65 Los límites de los dominios se determinaron usando alineamientos publicados en la secuencia de tenascina C humana (Siri (1991) número de referencia P24821 (Swiss-Prot)). Para clonar cada dominio los inventores diseñaron

5 cebadores de PCR en los que los cebadores tanto directo como inverso contenían 18-21 bases correspondientes a las secuencias 5' y 3' terminales de la secuencia codificante necesaria. El cebador directo contenía un sitio de restricción Nde1, seguido de un marcador his N terminal, inmediatamente antes de la secuencia codificante. Las 3 bases finales del sitio Nde1 forman el codón de inicio de metionina ATC. El cebador inverso incluía un codón de parada TTA inmediatamente después de la secuencia codificante, seguido de un sitio BamH1 o un Kpn1 para permitir la clonación unidireccional a vectores de expresión pET32b.

Tabla 1

Nombre de la proteína	Cebador directo Cebador inverso
TA	DIR: <u>ATACATATGCATCATCATCATCAT</u>GGGGTCCTCAAG AAAGTCATCCGG INV: <i>GCCGGATCCTTAGCCTGCTCCTGCAGTACATTG</i>
EGF-L	PCR1 DIR: ACAGTGGTACCACCATGGGGGCCATGGGGGCCATGACT CAGCTGTTG INV: <i>CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCACCTTCGGTAGCGAG</i> GGCAAG PCR2 DIR: GACTAGAAGGACGACGATGACAAGTGCTGTCTCCAGCC TGCCAC INV: <i>GACAGCGGATCCTTAATGATGATGATGATGATGTGAGCA</i> GTCTTCTCCGCTGTAGC
TN1-5	DIR: <u>ATACATATGCATCATCATCATCAT</u>GAGGTGTCTCCTCC CAAAGA INV: <i>GCCGGTACCTTAAGTGGATGCCTTCACACGTGC</i>
TN1-3	DIR: <u>ATACATATGCATCATCATCATCAT</u>GAGGTGTCTCCTC CCAAAGA INV: <i>GCCGGTACCTTATGTTGTGAAGGTCTCTTT GGC</i>
TN3-5	DIR: <u>ATACATATGCATCATCATCATCAT</u>CGCTTGGATGCC CCCAGCCAGAT INV: <i>GCCGGTACCTTAAGTGGATGCCTTCACACGTGC</i>
TN5-7	DIR: <u>ATACATATGCATCATCATCATCAT</u>GAGTTGGACACG CCCAAGGAC INV: <i>GCCGGATCCTTATGTTGTGAACCTGGCAGTGATGGTTG</i>
TN6-8	DIR: <u>ATACATATGCATCATCATCATCAT</u>GCCATGGGCTCCCC AAAGGAA INV: <i>GCCGGATCCTTATGTTGTGAAGATGGTCTGGATCAT</i>
FBG	DIR: <u>ATACATATGCATCATCATCATCAT</u>ATTGGACTCCTGTAC CCCTTCC INV: <i>GCCGGATCCTTATGCCCGTTTGCGCCTGCCT TCAA</i>

10 Todos los cebadores anteriores se escriben de 5' a 3'. Las secuencias Flag están en negrita, los marcadores His (CATCATCATCATCAT) están subrayados, y los sitios de escisión de enzimas de restricción (CATATG = sitio Nde1, GGATCC = BamH1, GGTACC = sitio Kpn1) están en cursiva negrita.

PCR

15 Se llevó a cabo amplificación por PCR usando 10 pmol/μl de cada cebador, 1 μg de molde, 5 μl de DMSO y 1,25 unidades de Pfu Turbo polimerasa en un volumen final de 25 μl. Esto se añadió al tampón y dNTP en tubos Easy

mix 50. El molde usado para todas las reacciones fue ADNc preparado a partir de células de glioma humano U87MG usando ARN aislado con kits RNeasy. La reacción se cicló 40 veces con temperaturas de desnaturalización, hibridación y elongación de 95 °C, 55-65 °C (dependiendo de la temperatura de fusión (T_m) de los cebadores) y 72 °C respectivamente.

5

Clonación

Se ligaron productos de PCR en vectores pCR Blunt y se secuenciaron para asegurar que no se habían introducido errores por PCR. Se seleccionaron clones que no tenían errores o mutaciones silenciosas. Después se ligaron insertos en pET32b usando sitios de restricción Nde1 y BamH1 introducidos por ingeniería genética en cebadores (TN5-7 y TN6-8). La tenascina C humana tiene sitios BamH1 internos dentro del dominio TA (posición 494) y TNIII2 (posición 2509). Se clonaron por lo tanto TA y TN1-8 usando el sitio Nde1 en el cebador DIR y el sitio Kpn1 en el sitio de clonación de pCRBlunt. La tenascina C humana no contiene sitios Kpn1 internos. Se clonaron TN1-5, TN1-3 y TN3-5 usando sitios Nde1 y Kpn1 en los cebadores. FBG contiene un sitio Nde1 interno (posición 6439) y se clonó por lo tanto usando un ligamiento de dos etapas de digestión con Nde1 y BamH1, seguido de digestión Nde1. (Las posiciones se refieren a sitios dentro de la secuencia de nucleótidos de longitud completa de tenascina C, proporcionada en la figura 14).

20

Crecimiento bacteriano, inducción y lisis

Los plásmidos se transformaron en células BL21 (DE3) Rosetta, se cultivaron en 3 l de medio Luria-Bertani que contenía carbenicilina 50 µg/ml y se indujeron con isopropilo-β-D-tiogalactopiranosido 1 mM. Después de 3 horas, las células se recogieron por centrifugación a 4.000 rpm durante 20 minutos, se lavaron dos veces con tampón de lavado helado (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM) y se lisaron con una prensa francesa. Se recogieron cuerpos de inclusión por centrifugación a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Con la excepción de TA y FBG las proteínas se localizaron completamente en el sobrenadante. Se extrajeron proteínas TA y FBG recombinantes de cuerpos de inclusión con clorhidrato de guanidina 6 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y β-mercaptoetanol 10 mM a temperatura ambiente con agitación constante durante 2 horas.

Purificación de proteínas bacterianas

La solución que contenía proteína recombinante se aplicó a una columna de Ni²⁺-NTA-agarosa y se lavó con Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 que contenía imidazol 20 mM. La columna se lavó posteriormente con Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y la proteína se eluyó con Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 que contenía imidazol 60 mM. Para TA y FBG cada tampón de lavado y elución contenía clorhidrato de guanidina 6 M. Después de la cromatografía con Ni TA y FBG no requirieron purificación posterior. Se purificaron adicionalmente TN1-3 y TN6-8 por cromatografía de intercambio aniónico usando una columna HiTrap Q, TN1-5, TN3-5 y TN5-7 por cromatografía de intercambio catiónico usando una columna HiTrap S y TN1-8 usando una columna HiTrap S seguido de filtración en gel usando una columna Sephacryl S500 HR.

40

Replegamiento de proteínas insolubles

TA y FBG se replegaron diluyendo hasta 20 µg/ml con Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 que contenía clorhidrato de guanidina 6 M y tratando después con cistamina 20 mM con agitación durante 16 horas a 4 °C. La solución se dializó después dos veces frente a 15 volúmenes de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 que contenía NaCl 150 mM, CaCl₂ 10 mM, β-mercaptoetanol 5 mM y 2-hidroxietil disulfuro 1 mM durante 24 horas a 4 °C, dos veces frente a Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 durante 8 horas a 4 °C y después se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El replegamiento se evaluó por desplazamientos de tamaño usando SDS PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. La actividad proteica se confirmó por polimerización del dominio TA y unión de FBG con columnas de heparina sepharose.

50

Síntesis del dominio EGF-L usando células de mamífero

Los intentos iniciales de expresar y purificar la región de repeticiones EGF-L usando un sistema de expresión de *E. coli* no tuvieron éxito. Esto más probablemente sea atribuible a la dificultad para conseguir plegamiento proteico debido a un total de 91 cisteínas en esta región. Por lo tanto, los dominios de tipo EGF de TN-C se expresaron usando células HEK293.

55

Se llevaron a cabo dos reacciones de PCR. El primer producto de PCR consistió en un sitio de enzima de restricción *KpnI*, una secuencia Kozak seguida de la secuencia señal TN-C. El segundo producto de PCR consistió en un péptido FLAG, la secuencia de dominio de tipo EGF, seguido de un marcador de histidina y una secuencia de enzima de restricción BamH1.

60

Los dos productos de PCR se ligaron entre sí como se describe en Ho (1989). Se llevaron a cabo reacciones de PCR como se ha descrito anteriormente. La construcción completa se clonó en el vector Blunt de PCR y se secuenció. Después se subclonó en el vector pCEP4. El ADN se transfirió a células HEK293 usando Fugene y se

65

seleccionaron células para resistencia a higromicina (200 µg/ml) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero de ternero fetal al 10 % (v/v), penicilina (100 unidades/ml) y estreptomina (100 unidades/ml). Se recogieron y agruparon 2 litros de medio acondicionado (recogido después de haberse cultivado las células en medio) de células transfectadas de forma estable. El medio acondicionado agrupado (2 litros) se centrifugó a 3000 rpm para separar los residuos celulares del medio.

El medio se aplicó después a una columna anti FLAG. Se recogió material en fracciones de 50 ml para el flujo continuo. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna de NaCl 1 M, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 y después se lavó con 10 volúmenes de columna de isopropanol 60 % para asegurar la retirada de LPS. La columna se lavó después con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 y finalmente la proteína se eluyó usando péptido FLAG 200 µg/ml en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5.

Análisis de pureza de proteínas

Cada proteína se dializó frente a 1000 volúmenes de NaCl 150 mM y Tris 50 mM pH 7,5. La pureza de las proteínas se analizó por SDS-PAGE en condiciones reductoras. Para hacer esto se procesó 1 µg de cada proteína recombinante purificada en un gel de gradiente de Bis-Tris 4-12 % y el gel se tiñó con plata posteriormente para demostrar una única banda (figura 10). También se llevaron a cabo análisis de transferencia de Western. Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno. Las membranas se bloquearon con BSA al 5 % en solución salina tamponada con Tris y después se incubaron con anticuerpos primarios que reconocían anticuerpos de FLAG M2 (dilución 1:2000) (EGF-L) o tetra-his (1:2000) (todas las demás proteínas). La transferencia se incubó después con anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina y las bandas proteicas se visualizaron usando sustrato estabilizado con Western Blue por lo que los genes muestran una única banda específica reconocida por cada anticuerpo al Pm esperado (no mostrado).

Ejemplo 3 - Modelos animales

Artritis inducida por zimosano

Se indujo artritis inducida por zimosano (ZIA) en ratones deficientes en tenascina C y de tipo silvestre por inyección de zimosano (*Saccharomyces cerevisiae*), como se describe en Keystone (1977). Se preparó zimosano disolviendo 15 mg de zimosano en 1 ml de PBS estéril. La solución se hirvió dos veces y se sonicó. Los ratones se anestesiaron por inyección intraperitoneal de 150 µl de Hypnorm diluido 1:10 en agua estéril, después se les inyectó zimosano (10 µl) en la almohadilla plantar derecha (d=0).

Los ratones de control recibieron una inyección de 10 µl de PBS solamente o no se les inyectó. Para evaluación macroscópica de artritis, se midió el grosor de cada pata trasera diariamente con microcalibradores (Kroeplin, Schluchlem, Alemania) y el diámetro se expresó como una media para cada pata trasera inflamada por ratón.

Después de completar el experimento (día=4), se sacrificó a los ratones y se fijaron las patas traseras en formalina tamponada al 10 % (v/v), se descalcificaron con EDTA 10 % y se procesaron con parafina.

Artritis inducida por antígeno

Se indujo artritis inducida por antígeno (AIA) en ratones deficientes en tenascina C y de tipo silvestre como se ha descrito previamente por Brackertz (1977). Brevemente, el día 0 los ratones se anestesiaron por inyección intraperitoneal de 150 µl de Hypnorm diluido 1:10 en agua estéril, después se inmunizaron con 200 µg de BSA metilado. Se emulsionó mBSA en 0,2 ml de adyuvante completo de Freund y se inyectó por vía intradérmica en la base de la cola.

El día 7, se indujo artritis por inyección intraarticular de mBSA (100 µg en 10 µl de PBS estéril) en la articulación de la rodilla derecha usando una microcánula de calibre 33 estéril. Los ratones de control recibieron una inyección de 10 l de PBS solamente o no se les inyectó.

El día 14 se sacrificó a los ratones, se escindieron las articulaciones de la rodilla y se fijaron en formalina tamponada al 10 % (volumen/volumen) se descalcificaron, con EDTA 10 % y se procesaron con parafina.

Inyección de FBG

Se anestesió a los ratones de tipo silvestre por inyección intraperitoneal de 150 µl de Hypnorm diluido 1:10 en agua estéril y después se les inyectaron 100 ng, 1 o 3 µg de FBG en 10 µl de PBS estéril en la articulación de la rodilla derecha usando una microcánula de calibre 33 estéril. Los ratones de control recibieron una inyección de 10 µl de PBS solamente o no se les inyectó.

Los días 3 y 7, se sacrificó a los ratones, se escindieron las articulaciones de la rodilla y se fijaron en formalina tamponada al 10 % (volumen/volumen), se descalcificaron, con EDTA 10 % y se procesaron con parafina.

Histología de las articulaciones de la rodilla

5 Se cortaron secciones de tejido coronal (4 μm) a 7 profundidades en toda la articulación; a 80 μm de distancia y se tiñeron con hematoxilina y eosina o Safranina-O para evaluar la patología de la articulación. Se puntuaron cambios histopatológicos usando los siguientes parámetros como se describe en Van Lent (2006).

10 La inflamación (el flujo de entrada de células inflamatorias al sinovio (infiltrado) y la cavidad de la articulación (exudados)), se clasificó usando una escala arbitraria de 0 (sin inflamación) a 3 (inflamación grave). La muerte de condrocitos se determinó como el porcentaje de área de cartílago que contenía lagunas vacías en relación con el área total. La erosión o superficie de cartílago se determinó como la cantidad de cartílago perdido en relación con el área de cartílago total. Se determinó la destrucción de hueso en 10 áreas diferentes de la sección de la articulación de la rodilla total. La destrucción se clasificó en una escala de 0 (sin daños) a 3 (pérdida completa de la estructura ósea). Se realizó un análisis histológico por un investigador ciego a los grupos experimentales. La puntuación media para cada animal en un grupo experimental se calculó promediando las puntuaciones histopatológicas en al menos 5 profundidades de sección por articulación.

20 **Resultados**

La inflamación de la articulación inducida por zimosano no se mantiene en ratones deficientes en tenascina C

25 Se usó inyección de zimosano en la almohadilla plantar para inducir sinovitis aguda en ratones. Los ratones de tipo silvestre mostraron rápida hinchazón de la pata alcanzado un diámetro de pata máximo a las 24 horas (2,56 mm, un aumento del 62 % del diámetro de partida de la pata). Este se mantuvo durante 24 horas más. Después de 2 días el diámetro de la pata se redujo pero las patas permanecieron hinchadas hasta los 4 días (2,08 mm, un aumento del 32 %) (figura 1a). Los ratones deficientes en tenascina C mostraron un grado similar de hinchazón de las patas a los ratones de tipo silvestre 24 horas después de la inyección (2,41 mm, un aumento del 57 % del diámetro de partida de la pata). Sin embargo, la hinchazón en los ratones sin tenascina C disminuyó más rápidamente que en los ratones de tipo silvestre; el diámetro de la pata se redujo significativamente a los 2 días y se había reducido a 1,7 mm (un aumento de solamente el 11 %) a los 4 días (figura 1a). El día 4 después de la inyección las patas de los ratones de tipo silvestre aún estaban visiblemente hinchadas y rojas, mientras que las patas de ratones sin tenascina C no estaban visiblemente hinchadas ni rojas y se asemejaban a patas no inyectadas (Figura 9).

35 Esta diferencia se reflejó histológicamente a los 4 días. Los sinovios de ratones de tipo silvestre estaban inflamados significativamente y mostraron infiltración celular y se observó pérdida de proteoglicanos del cartílago (figura 1b, c). Por el contrario, el sinovio de ratones deficientes en tenascina C no mostró sinovitis, infiltrado celular o pérdida de proteoglicanos del cartílago (figura 1d, e) y se asemejó a las articulaciones de ratones con inyección de simulación o sin inyección (no mostrados). La cuantificación de la inflamación de la articulación reveló que aunque había poco exudado (masa celular en la cavidad de la articulación) en ratones de tipo silvestre o sin tenascina C, los niveles de infiltrado (masa celular en la capa sinovial) se redujeron significativamente en ratones sin tenascina C (figura 1f). No se produjo erosión de cartílago o hueso en ratones de ninguno de los genotipos (no mostrado), sin embargo se produjo un bajo nivel de muerte de condrocitos en ratones de tipo silvestre, que no se observó en ratones sin tenascina C (figura 1g). Por lo tanto la expresión de tenascina C parece promover el mantenimiento de la inflamación aguda.

Los ratones sin tenascina C están protegidos de inflamación persistente y daño estructural durante la artritis inducida por antígenos

50 Para determinar si la tenascina C también contribuye a enfermedad inflamatoria de las articulaciones más destructiva, se indujo artritis erosiva por inyección intraarticular de mBSA en la articulación de la rodilla después de inmunización con mBSA. Este modelo implica respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales e induce cambios patológicos similares a AR humana (Brackertz (1977)). La inyección de mBSA indujo una respuesta inflamatoria similar en ratones tanto sin tenascina C como de tipo silvestre. La infiltración celular y engrosamiento sinovial resulta evidente a las 24 horas en ratones de ambos genotipos (figura 2c-f, h, i) en comparación con ratones con inyección de simulación (figura 2a, b, g) o no inyectados (no mostrados).

60 Sin embargo, esto no persiste en ratones sin tenascina C como lo hace en los ratones de tipo silvestre. A los 3 días después de la inyección los ratones de tipo silvestre muestran inflamación aumentada del menisco y la cápsula, hiperplasia sinovial, células y depósitos de fibrina en el espacio de la articulación, formación de pannus y pérdida de proteoglicanos de cartílago localizado (figura 3a, b, f). Por el contrario, a los 3 días en ratones sin tenascina C la inflamación se limita a la cápsula, la inflamación sinovial ha disminuido y no hay agregados de fibrina/células presentes en el espacio de la articulación, no hay formación de pannus y no hay pérdida de proteoglicanos del cartílago (figura 3c, d, e).

65

A los 7 días los ratones de tipo silvestre mostraron infiltración celular inflamatoria persistente y exudado del espacio de la articulación, sinovitis extensiva y formación de pannus y destrucción de cartílago articular y erosión del hueso (figura 4a, b). Las rodillas a las que se inyectó simulación y rodillas de ratones que no se habían sometido a inyección estaban sanas y no mostraron inflamación o destrucción de la articulación (no mostrado). Los ratones deficientes en tenascina C también tenían articulaciones sanas que mostraron solamente infiltración celular inflamatoria leve, sin exudado del espacio de la articulación, sinovitis, formación de pannus, destrucción de cartílago articular o erosión del hueso (figura 4c, d). Las articulaciones de ratones deficientes para tenascina C que se habían inyectado con simulación y/o que no se habían sometido a inyección también estaban sanas (no mostrado).

Estos datos histológicos se reflejan en la puntuación de la enfermedad de las articulaciones como se describe en los materiales y métodos. Los niveles de infiltrado celular y exudado observado tanto en ratones de tipo silvestre como en ratones sin tenascina C 24 horas después de la inyección no fueron significativamente diferentes. Sin embargo, aunque la masa celular continúa aumentando en ratones de tipo silvestre a lo largo del tiempo, esta respuesta se atenuó en ratones sin tenascina C y los números de células en la articulación se redujeron a lo largo del tiempo (figura 4e). Aparecieron niveles crecientemente altos de muerte de condrocitos en el cartílago de ratones de tipo silvestre a lo largo del tiempo, pero no se observó enfermedad significativa en ratones sin tenascina C (figura 4f). No resultó evidente erosión superficial de cartílagos ni erosión del hueso en ratones de tipo silvestre a las 24 horas o 3 días (no mostrado) pero se había producido destrucción tisular significativa a los 7 días. Por el contrario los ratones sin tenascina C no mostraron ninguna destrucción tisular a las 24 horas, 3 días (no mostrado) o 7 días (figura 4f). Estos datos indican que aunque el inicio de la inflamación de la articulación (flujo de entrada de células en el sinovio y el espacio de la articulación) no se ve afectado en ratones sin tenascina C, a diferencia de ratones de tipo silvestre la enfermedad no progresa hasta la destrucción tisular y muerte celular. Estos resultados demuestran que se requiere expresión de tenascina C para inflamación sinovial persistente y destrucción de las articulaciones en este modelo.

Ejemplo 4 - cultivo celular

Muestras de ensayo de pacientes-

Se aislaron monocitos humanos de sangre periférica (London Blood Bank) y se derivaron macrófagos de monocitos después de la diferenciación durante 4 días con 100 ng/ml de M-CSF como se ha descrito previamente (Foxwell (1998)).

Se aislaron células de membrana con AR (que representaban una población mixta de todos los tipos celulares sinoviales) de membranas sinoviales obtenidas de pacientes que se sometieron a cirugía de reemplazo de articulación como se ha descrito previamente (Brennan (1989)). Se aislaron fibroblastos sinoviales con AR de la población mixta de células de membranas con AR como se ha descrito previamente (Brennan (1989)). El estudio se aprobó por el comité de ética de la fundación local (Riverside NHS Research Committee) y se obtuvo tejido residual (sinovio después de cirugía de reemplazo de articulación) solamente después de recibir consentimiento informado firmado del paciente y anonimizar el tejido para proteger la identidad del paciente.

Inmediatamente después del aislamiento, se cultivaron células de membrana con AR y macrófagos a 1×10^5 células/pocillo en RPMI 1640 que contenía FBS 10 % (v/v) y penicilina/estreptomicina 100 U/ml (Unidades/ml) en placas de cultivo tisular de 96 pocillos durante 24 horas antes de la estimulación. Se cultivaron fibroblastos sinoviales (usados solamente en el número de pase 2 o 3) a 1×10^4 células/pocillo en DMEM que contenía FBS 10 % (v/v) y penicilina/estreptomicina 100 U/ml en placas de cultivo tisular de 96 pocillos durante 24 horas antes de la estimulación.

Fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) y macrófagos derivados de médula ósea (BMDM)

Los MEF expresan altos niveles de ARNm de los 9 TLR murinos y son específicamente y altamente sensibles a activación de ligando de TLR. Los MEF de ratones con deleciones dirigidas de TLR2, TLR4 y MyD88 demuestran defectos profundos en su respuesta de IL-6 a ligandos específicos (Kurt-Jones (2004)). Se aislaron MEF de embriones de d13 recogidos de ratones de la misma edad, hembras embarazadas, de tipo silvestre, TLR2, TLR4 y nulos (como se describe en Todaro (1963)). Se cultivaron fibroblastos a 2×10^4 células/pocillo en DMEM que contenía FBS 10 % (v/v) y penicilina/estreptomicina 100 U/ml en placas de cultivo tisular de 96 pocillos durante 24 horas antes de la estimulación.

Se derivaron BMDM aspirando los fémures de ratones de tipo silvestre hembra de la misma edad, sin TLR2 y TLR4 como se describe en Butler (1999)) y cultivando las células durante 7 días en DMEM, FBS 20 % (v/v), solución antibiótica-antimicótica PSA 10 ml/l (v/v), β -Mercaptoetanol 50 μ M y M-CSF 10 ng/ml. Los macrófagos se cultivaron después a 1×10^5 células/pocillo en DMEM, FBS 20 % (v/v), solución antibiótica-antimicótica PSA 10 ml/l (v/v), β -Mercaptoetanol 50 μ M en placas de cultivo tisular de 96 pocillos durante 24 horas antes de la estimulación.

Líneas celulares HEK293

Se cultivaron líneas celulares HEK293 que expresaban TLR2 y TLR4/CD14/MD-2 a 1×10^4 células/pocillo en DMEM que contenía FBS 10 % (v/v) y blasticidina 10 $\mu\text{g/ml}$ en placas de cultivo tisular de 96 pocillos durante 24 horas antes de la estimulación.

Estimulación celular y evaluación de la síntesis de citocinas

Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C con las dosis indicadas de tenascina C y fragmentos de tenascina C recombinante (1,0 μM - 1,0 nM). Las células también se estimularon cuando se indicó con LPS (1 ng/ml para macrófagos humanos, 10 ng/ml para fibroblastos humanos, células de membrana con AR y HEK, 100 ng/ml para MEFS y BMDM y 10 ng/ml para HEKS), PAM3 (10 ng/ml para macrófagos humanos, fibroblastos humanos y HEK, 100 ng/ml para MEF y BMDM), IL-1 murino (5 ng/ml para MEFS) y TNF- α murino (100 ng/ml para MEFS). A no ser que se indique específicamente de otro modo se usó LPS rugoso para estudios *in vitro*.

Para experimentos de transferencia génica adenoviral, se incubaron fibroblastos sinoviales con AR humana con vectores adenovirales a una multiplicidad de infección de 100, se lavaron después de 2 horas, se cultivaron en medio completo durante 24 horas, después se estimularon durante 24 horas, después de lo cual se recogieron los sobrenadantes.

Cuando se indica, las células se preincubaron con anticuerpo anti CD14 10 $\mu\text{g/ml}$, antagonista del receptor de IL1 10 $\mu\text{g/ml}$, anticuerpo anti TLR2 10 $\mu\text{g/ml}$, anticuerpo anti TLR4 25 $\mu\text{g/ml}$, anticuerpo de control de isotipo 10 o 25 $\mu\text{g/ml}$, polimixina B 25 $\mu\text{g/ml}$ o msbB LPS 1 $\mu\text{g/ml}$, durante 30 minutos a 37 °C antes de la estimulación. Donde se indique, se hirvieron tenascina C recombinante y FBG, y LPS durante 15 minutos antes de la adición a las células.

En todos los casos, la viabilidad de las células no se vio afectada significativamente durante el periodo de tiempo experimental cuando se examinó por el ensayo de viabilidad celular de MTT (Sigma, Poole, Reino Unido).

Los sobrenadantes se examinaron posteriormente con respecto a la presencia de las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-8 por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La absorbancia se leyó en un lector de placas de ELISA espectrofotométrico (Labsystems Multiscan Biochromic, Vantaa, Finlandia) y se analizó usando el programa de software Ascent (Thermo Labsystems, Altrincham, Reino Unido).

Resultados

La tenascina C induce síntesis de TNF- α , IL-6 e IL-8 en fibroblastos sinoviales con AR humanos primarios y macrófagos

Los inventores investigaron a continuación si la tenascina C podría activar la respuesta inmunitaria innata. Se usó tenascina C para estimular macrófagos humanos primarios y fibroblastos sinoviales con AR y la producción de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-8 examinadas. El componente de la pared celular bacteriana LPS se usó como un control positivo. La tenascina C indujo un perfil de citocinas específico de tipo celular que fue significativamente diferente de LPS. Estimuló de forma dependiente de la dosis la producción de TNF- α , IL-6 e IL-8 en macrófagos humanos (figura 5a). Sin embargo, la tenascina C solamente indujo síntesis de IL-6 en fibroblastos sinoviales, mientras que LPS indujo tanto IL-6 como IL-8 (figura 5b). Ni LPS ni tenascina C indujeron síntesis de TNF- α en fibroblastos (datos no mostrados). La estimulación con tenascina C de IL-6 (Figura 5c), IL-8 y TNF- α por macrófagos humanos e IL-6 por fibroblastos sinoviales (no mostrado) fue sensible al calor y no fue afectada por el inhibidor de LPS, polimixina B. Juntos estos resultados proporcionan fuertes pruebas de que la inducción de citocinas por tenascina C no se debe a la contaminación con LPS.

El glóbulo de tipo fibrinógeno (FBG) media en la activación por tenascina C de células.

La tenascina C es una molécula hexamérica grande, de la que cada dominio se une a diferentes receptores de superficie celular (revisado en Orend (2005)). Entender el mecanismo de acción de la tenascina C requerirá la identificación de qué dominio o dominios son críticos para promover la producción de citocinas. Los inventores sintetizaron proteínas recombinantes que comprendían diferentes dominios de la molécula (figura 10). Cada dominio se realizó en *E. coli*, se purificó (figura 11) y se descubrió que contenía < 10 pg/ml de LPS sometiendo la proteína pura al ensayo de lisado de *Limulus amaebocyte*. Solamente un dominio de tenascina C estaba activo. El glóbulo de tipo fibrinógeno (FBG) estimuló la síntesis de TNF- α en macrófagos humanos (Figura 6a), síntesis de IL-6 e IL-8 en macrófagos humanos (no mostrado) e IL-6 en fibroblastos sinoviales con AR (no mostrado) en un grado igual a tenascina C de longitud completa. Como tenascina C de longitud completa, FBG no indujo síntesis de IL-8 en fibroblastos sinoviales con AR donde LPS sí (datos no mostrados). La síntesis de citocinas inducida por FBG también fue sensible al calor y no se vio afectada por polimixina B (datos no mostrados).

El dominio de FBG de tenascina C induce la producción de citocinas en el sinovio con AR humano e inflamación de las articulaciones en ratones.

Los inventores investigaron si FBG podría promover la expresión de citocinas inflamatorias en membranas sinoviales de pacientes con AR. Este modelo tisular de AR (que comprendía una población mixta de todos los tipos celulares sinoviales) produce espontáneamente niveles altos de IL-6, IL-8 y TNF- α (Brennan (1989)) (figura 6b). FBG potenció adicionalmente la síntesis de todas estas citocinas (figura 6b). Para determinar si FBG podría inducir la inflamación *in vivo*, se inyectó a ratones de tipo silvestre por vía intraarticular FBG. Los inventores observaron una estimulación transitoria y dependiente de dosis de la inflamación de la articulación. No se produjo inflamación o pérdida de proteoglicanos en ratones no inyectados o en ratones a los que se inyectó PBS (figura 6c-e) o 100 ng de FBG (datos no mostrados). En ratones a los que se inyectó 1 μ g de infiltración celular inflamatoria de FBG (figura 6f), se observó sinovitis leve, formación de pannus (figura 6g) y pérdida de proteoglicanos (figura 6h). Se vio una respuesta similar en ratones a los que se inyectaron 3 μ g de FBG (datos no mostrados). Tras la cuantificación histológica, se observaron altos niveles de infiltrado celular y exudado y muerte de condrocitos en ratones a los que se inyectó FBG, junto con una cantidad modesta de erosión de superficie de cartílago y daño óseo (figura 6i).

La síntesis de citocinas mediada por FBG depende de Myd88

Se ha demostrado que muchos DAMP, incluyendo el fibrinógeno (Smiley (2001)), estimulan la respuesta inmunitaria innata mediante activación de TLR. Por lo tanto, los inventores investigaron si los TLR podrían también mediar en la producción de citocinas inducida por tenascina C. El factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) se requiere para la señalización por todos los TLR, excepto TLR3 (O'Neill (2008)). La infección de fibroblastos sinoviales con adenovirus que expresa MyD88 negativo dominante, pero no virus de control de GFP, anuló la inducción por FBG de IL-6 (figura 7a). Estos datos sugieren que la inflamación inducida por FBG depende de MyD88 funcional. Este efecto de FBG no parece estar mediado por IL-1 ya que la adición del antagonista del receptor de IL-1 no inhibió la inducción de citocinas (datos no mostrados). Para confirmar que la acción de FBG es dependiente de MyD88 los inventores demostraron que FBG no estimula la síntesis de citocinas en fibroblastos embrionarios aislados de ratones con deleciones dirigidas en el gen de MyD88. El ligando de TLR2 PAM3, ligando de TLR4 LPS e IL-1 señalizan todos mediante MyD88. La estimulación con estos también se anuló en MEF de ratones deficientes. Sin embargo, TNF- α , que no señala mediante MyD88, no se vio afectado (figura 7b). La retransfección de MyD88 de tipo silvestre restauró la sensibilidad de estas células a FBG, PAM3, LPS e IL-1 (datos no mostrados).

FBG señala mediante TLR4

Los TLR muestran especificidad por ligandos endógenos; las proteínas se reconocen por uno o ambos de TLR2 y 4 (revisado en O'Neill (2008)). Los anticuerpos neutralizadores para TLR4 inhibieron la síntesis de IL-6, IL-8 y TNF- α inducida tanto por FBG como por LPS en macrófagos humanos y la síntesis de IL-6 en fibroblastos sinoviales con AR pero no tuvieron ningún efecto en la función del ligando de TLR2, PAM3. Los anticuerpos para TLR2 inhibieron la síntesis de citocinas mediada por PAM3 pero no tuvieron ningún efecto en la síntesis de citocinas inducida por LPS o FBG. Los controles del mismo isotipo no tuvieron ningún efecto en la síntesis de citocinas inducida por ningún ligando (se muestra la síntesis de TNF- α por macrófagos humanos en la figura 8a). Para confirmar que la acción de FBG es dependiente de TLR4 los inventores demostraron que FBG no estimula la síntesis de citocinas en fibroblastos embrionarios o macrófagos aislados de ratones con deleciones dirigidas en el gen de TLR4. La síntesis de citocinas mediada por FBG no se vio afectada en fibroblastos embrionarios o macrófagos aislados de ratones con deleciones dirigidas en el gen de TLR2. Las células aisladas de ratones deficientes para TLR2 no fueron sensibles a PAM3, pero fueron sensibles a LPS e IL-1. Las células aisladas de ratones deficientes en TLR4 no fueron sensibles a LPS pero respondieron a PAM3 e IL-1 (figura 8b, c). Además, se requería la expresión de TLR4 para la acción artritogénica de FBG *in vivo*; FBG fue capaz de inducir la inflamación de las articulaciones en ratones sin TLR2 pero no en ratones sin TLR4 (figura 12).

Requisitos de correceptor diferentes para FBG y LPS

La señalización de LPS mediante TLR4 está mediada por un complejo receptor que incluye la proteína soluble MD-2 y superficie celular ligada a GPI o CD14 soluble (revisado en Fitzgerald (2004)). A continuación los inventores examinaron si se requieren CD14 y MD-2 para la activación por FBG de TLR4. Como control positivo los inventores examinaron aquí la actividad de LPS glucosilado liso que requiere tanto MD-2 como CD14 (Jiang (2005)). La síntesis de IL-6, IL-8 y TNF- α mediada por LPS por macrófagos humanos y la síntesis de IL-6 por fibroblastos sinoviales con AR se inhibió por anticuerpos anti CD14 y un LPS antagonista derivado de la *E. coli* mutante msbB que compite por la unión de LPS con MD-2 (Coats (2007)). Por el contrario, la síntesis de citocinas mediada tanto por PAM3, que no requiere estos correceptores para la activación de TLR2, como por FBG no se vio afectada por anticuerpos anti CD14 o LPS mutante para msbB (la figura 8d muestra síntesis de TNF- α por macrófagos humanos). Estos datos sugieren que ni CD14 ni MD-2 se requieren para la síntesis de citocinas mediada por FBG. Por lo tanto, aunque LPS y FBG señalizan ambos mediante activación de TLR4, pueden tener diferentes requisitos de correceptor.

Ejemplo 5 - inhibición de la acción y síntesis de tenascina C en tejido humano

Este ejemplo estudia el efecto de (1) la prevención de la acción proinflamatoria de tenascina C y (2) la inhibición de la expresión de tenascina C en el sinovio con AR humano.

Métodos**Síntesis peptídica**

Se sintetizaron nueve péptidos solapantes que comprendían el dominio FBG completo (tabla 2) por Biogenes, Alemania. Los péptidos se escindieron a temperatura ambiente (mezcla de escisión: trifluoroacetato 90 %, tioanisol 5 %, etanoditiol 3 %, anisol 2 %), se purificaron por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa y se caracterizaron por análisis de espectroscopia de masas MALDI TOF. La pureza de los péptidos fue > 85 % como se determinó por cromatografía líquida de alto rendimiento.

El equipo fue incapaz de sintetizar el péptido 7, supuestamente debido a la formación de estructura secundaria que evitaba la elongación de la cadena peptídica (como se ha indicado previamente (LaFleur (1997))).

Tabla 2. Péptidos solapantes que abarcan el dominio FBG completo de tenascina C humana

Nº de péptido	Secuencia de aminoácidos
1	TIGLLYFPKDCSQAMLNGDTTSGLYTIYL
2	YTIYLNKGDAEAELEVFCDMTSDGGGWIVFL
3	WIVFLRRKNGRENFYQNWKAYAAGFGDRRE
4	GDRREEFWLGLDNLNKITAQQQYELRVD
5	ELRVDLRDHGETAFVYDKFSVGDAKTRYK
6	KTRYKLVVEGYSGTAGDSMAYHNGRSFST
7	RSFSTFDKDTDSAITNCALSYKGAFWYRN
8	WYRNCHRVNLMGRYGDNNHSQGVNWFHWKG
9	FHWKGHEHSIQFAEMKLRPSNFRNLEGRRKRA

Muestras de ensayo de pacientes y cultivo celular

Se aislaron células de membrana con AR (que representan una población mixta de todos los tipos celulares sinoviales) de membranas sinoviales obtenidas de pacientes que se sometían a cirugía de reemplazo de la articulación (Brennan (1989)). El tejido de membrana sinovial se digirió en RPMI 1640 (GIBCO) que contenía suero de ternero fetal al 5 % (FCS) (GIBCO), colagenasa de tipo IV 5 mg/ml (Sigma) y DNAsa tipo I 0,15 mg/ml (Sigma) y se incubó a 37 °C durante 2 horas.

Después de la incubación el tejido se pipeteó a través de una malla de nylon a un vaso de precipitados estéril. Las células se lavaron después tres veces en medio completo (RPMI 1640 complementado con FCS 10 %). Se aislaron fibroblastos sinoviales con AR de la población mixta de células de membrana con AR mediante selección en DMEM (Bio-Whittaker) complementado con FBS 10 %, glutamina 1 µM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin. Se aislaron monocitos humanos de sangre periférica (London Blood Bank) y se derivaron macrófagos de monocitos después de la diferenciación durante 4 días con 100 ng/ml de M-CSF.

El estudio se aprobó por el comité de ética de la fundación local, y se obtuvo tejido residual (sinovio después de cirugía de reemplazo de articulación) solamente después de recibir consentimiento informado firmado del paciente y anonimizar el tejido para proteger la identidad del paciente.

Estimulación celular y evaluación de la síntesis de citocinas

Inmediatamente después del aislamiento, se cultivaron células de membrana con AR a 1×10^5 células/pocillo en RPMI 1640 que contenía FBS 10 % (v/v) y penicilina/estreptomycin 100 U/ml en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C sin adición, con tampón de control (PBS, BSA 1 %, NaN_3 0,01 %) o con 25 µM, 100 µM o 250 µM de cada péptido que abarcaba FBG.

Se sembraron fibroblastos sinoviales (usados solamente en el número de pase 2 o 3) a una concentración de 5×10^4 células en una placa de 3,5 cm. Se transfeció ARNip a una concentración final de 10 nM usando Lipofectamine 2000

(Invitrogen) durante 4 horas en OptiMEM I sin suero. Se usaron dos ARNip diferentes contra tenascina C humana (s7069 y s229491) (Applied Biosystems).

5 Las secuencias de ARNip de s7069 son: (sentido 5' CGCGAGAACUUCUACCAAAtt 3', antisentido 5' UUUGGUAGAAGUUCUCGCGtc 3') y de s229491 son (5' GGAAUAUGAAUAAAGAAGAtt 3', antisentido 5' UCUUCUUUAUUCUUAUUCcgg 3'). El ARNip contra luciferasa (Dharmacon) se transfeció como un control no dirigido.

10 Cuatro horas después de la transfección, el medio se cambió con medio de Eagle modificado por Dulbecco preequilibrado que contenía FBS 10 % (v/v) y las células se incubaron durante 48 y 72 horas adicionales. Las células se estimularon después con LPS 10 ng/ml durante 24 horas a 37 °C. Los niveles de ARNm y proteína de tenascina C se cuantificaron por PCR y transferencia de western respectivamente. El ARN total se extrajo de células usando un mini kit de Sangre de ARN QiaAmp (Qiagen, Alemania). Se sintetizó ADNc a partir de cantidades equivalentes de ARN total usando la Transcriptasa Inversa SuperScript® III (Invitrogen) y oligo dT de 18 unidades (Eurofins MWG Operon).

15 Se analizó la expresión génica por métodos de ct delta-delta basados en PCR en tiempo real cuantitativa con el conjunto de cebadores TaqMan de tenascina C humana (Hs01115663-m1) y control endógeno de proteína ribosómica humana (RPLPO) (4310879E) (Applied Biosystems) en una máquina Corbett Rotor-gene 6000 (Corbett Research Ltd). Se detectó proteína tenascina C en sobrenadantes celulares y lisados celulares por SDS PAGE y transferencia de western usando el anticuerpo MAB1908 (Millipore).

20 Se cultivaron macrófagos a 1×10^5 células/pocillo en RPMI 1640 que contenía FBS 5 % (v/v) y penicilina/estreptomycin 100 U/ml en placas de cultivo tisular de 96 pocillos durante 24 horas antes de la estimulación. Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C sin adición, con FNG 1,0 μ M, LPS 1 ng/ml o péptido de FBG 1 o 20 μ M. Donde se indique, las células se preincubaron con péptidos de FBG 20 μ M durante 15 minutos.

25 La viabilidad de las células no se vio afectada significativamente a lo largo el periodo de tiempo experimental cuando se examinaron por el ensayo de viabilidad celular de MTT (Sigma, Poole, Reino Unido). Los sobrenadantes se examinaron con respecto a la presencia de las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-8 por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D systems). La absorbancia se leyó en un lector de placas de ELISA espectrofotométrico (Labsystems Multiscan Biochromic, Vantaa, Finlandia) y se analizó usando el programa de software Ascent (Thermo Labsystems, Altrincham, Reino Unido).

35 **Métodos estadísticos**

Se calculó la media, DT y ETM usando GraphPad (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

40 **Resultados**

Bloqueo de la síntesis de citocinas en cultivos de membrana con AR por péptidos de FBG específicos

45 El enfoque de la inhibición peptídica se ha usado exitosamente para determinar el sitio de unión de integrina α v β 3 en el dominio FBG de tenascina C y para prevenir la adhesión celular en respuesta a este dominio de tenascina C (Lafleur (1997) y Yokoyama (2000)).

50 Los inventores sintetizaron una serie de 8 péptidos solapantes de aproximadamente 30 aminoácidos que abarcaban la secuencia completa de FBG (Tabla 2). Los péptidos se ensayaron con respecto a la capacidad para bloquear la síntesis de citocinas espontánea en cultivos de membrana sinovial con AR. La síntesis de TNF e IL8 se inhibió por los péptidos 3 y 8, pero no por ningún otro péptido (TNF mostrado en la figura 15). Los péptidos 3 y 8 inhibieron de forma dependiente de dosis la síntesis de citocinas consiguiendo las mayores concentraciones 95 % y 56 % de inhibición respectivamente (figura 16). Aunque el péptido 5 no tuvo ningún efecto en la síntesis de TNF, bloqueó de forma dependiente de la dosis la síntesis de IL8 en células de membrana con AR con una inhibición máxima del 81 % (figura 16).

55 Para mapear el dominio activo dentro de FBG responsable de inducir la producción de citocinas los inventores estimularon macrófagos humanos primarios con cada péptido de FBG. Los péptidos 1, 5 y 6 indujeron todos la síntesis de citocinas de una manera dependiente de dosis (figura 17).

60 Para determinar si cualquier péptido podría bloquear la síntesis de citocinas inducida por FBG en macrófagos humanos, las células se preincubaron con cada péptido de FBG antes de la estimulación con FBG o LPS completo. El péptido 5 bloqueó específicamente la síntesis de citocinas mediada por FBG, mientras que el péptido 8 bloqueó la síntesis de citocinas en respuesta tanto a LPS como a FBG (figura 18).

65 El péptido 8 bloquea por lo tanto de forma no específica la producción de citocinas inducida por cualquier estímulo. Este dominio es el dominio de unión a integrina de FBG que media en la adhesión celular y por lo tanto puede actuar

para evitar la unión de células con placas de cultivo tisular. El péptido 5 bloquea específicamente la síntesis de citocinas inducida por FBG lo que sugiere que la dirección de este dominio puede ser útil en la prevención de la inflamación inducida por tenascina C.

5 El silenciamiento de la expresión génica de tenascina C inhibe la síntesis de citocinas en fibroblastos sinoviales con AR

La examinación del efecto de la inhibición de la expresión de tenascina C en el sinovio con AR humano ha identificado fibroblastos sinoviales como la principal fuente de tenascina C en AR (figura 1 C) (en Goh 2010).

La anulación mediada por ARNip de la expresión de tenascina C en estas células se ha mostrado con un máximo de eficacia entre el 94-96 % (figura 19). En células transfectadas con ARNip de tenascina C, tanto el nivel basal de síntesis de citocinas como la producción de citocinas inducida por LPS se inhibieron en el 38 % y 44 % respectivamente en comparación con células de control (figura 19).

Estos datos revelan que el silenciamiento de tenascina C en fibroblastos sinoviales con AR reduce la síntesis de citocinas proinflamatorias y sugiere que la anulación de la expresión de tenascina C es una estrategia viable para inhibir la inflamación en el sinovio.

Este trabajo ha establecido que el bloqueo de la actividad de tenascina C (con péptidos) y la expresión de tenascina C (con ARNip) reduce la síntesis de citocinas inflamatorias en sinovios con AR humanos. Estos datos muestran que el bloqueo de tenascina C es potencialmente clínicamente beneficioso en el tratamiento de AR y otras enfermedades inflamatorias.

25 Referencias

1. Smolen, J. S. y Maini, R. N. Interleukin-6: a new therapeutic target. *Arthritis Res Ther* 8 Supl 2, S5 (2006).
2. Williams, R. O., Paleolog, E. y Feldmann, M. Cytokine inhibitors in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases, *Curr Opin Pharmacol* 7, 412-417 (2007).
3. Brentano, F., Kyburz, D., Schorr, O., Gay, R. y Gay, S. The role of Toll-like receptor signalling in the pathogenesis of arthritis. *Cell Immunol* 233, 90-96 (2005).
4. O'Neill, L. A. Primer: Toll-like receptor signaling pathways-what do rheumatologists need to know? *Nat Clin Pract Rheumatol* (2008).
5. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301-305 (2002).
6. Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81, 1-5 (2007).
7. Gordon, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111, 927-930 (2002).
8. Medzhitov, R. y Janeway, C.A., Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298-300 (2002).
9. Radstake, T. R., *et al.* Expression of toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon-gamma. *Arthritis Rheum* 50, 3856-3865 (2004).
10. Roelofs, M. F., *et al.* The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum* 52, 2313-2322 (2005).
11. Sacre, S. M., *et al.* The Toll-like receptor adaptor proteins MyD88 and Mal/TIRAP contribute to the inflammatory and destructive processes in a human model of rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 170, 518-525 (2007).
12. Choe, J. Y., Crain, B., Wu, S. R. y Corr, M. Interleukin 1 receptor dependence of serum transferred arthritis can be circumvented by toll-like receptor 4 signaling. *J Exp Med* 197, 537-542 (2003).
13. Lee, E. K., Kang, S.M., Paik, D. J., Kim, J. M. y Youn, J. Essential roles of Toll-like receptor-4 signaling in arthritis induced by type II collagen antibody and LPS. *Int Immunol* 17, 325-333 (2005).
14. Abdollahi-Roodsaz, S., *et al.* Inhibition of Toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis. *Arthritis Rheum* 56, 2957-2967 (2007).
15. Vanags, D., *et al.* Therapeutic efficacy and safety of chaperonin 10 in patients with rheumatoid arthritis: a double-blind randomised trial. *Lancet* 368, 855-863 (2006).
16. Chiquet-Ehrismann, R. y Chiquet, M. Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol* 200, 488-499 (2003).
17. Cutolo, M., Picasso, M., Ponassi, M., Sun, M.Z. y Balza, E. Tenascin and fibronectin distribution in human normal and pathological synovium. *J Rheumatol* 19, 1439-1447 (1992).
18. McCachren, S. S. y Lightner, V. A. Expression of human tenascin in synovitis and its regulation by interleukin-1. *Arthritis Rheum* 35, 1185-1196 (1992).
19. Salter, D.M. Tenascin is increased in cartilage and synovium from arthritic knees. *Br J Rheumatol* 32, 780-786 (1993).
20. Chevalier, X., Groult, N., Larget-Piet, B., Zardi, L. y Hornebeck, W. Tenascin distribution in articular cartilage from normal subjects and from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 37, 1013-1022

(1994).

21. Hasegawa, M., *et al.* Expression of large tenascin-C splice variants in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Orthop Res* 25, 563-568 (2007).
22. Orend, G. Potential oncogenic action of tenascin-C in tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1066-1083 (2005).
23. Brackertz, D., Mitchell, G. F. y Mackay, I.R. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 20, 841-850 (1977).
24. Brennan, F. M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R. y Feldmann, M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2, 244-247 (1989).
25. Smiley, S. T., King, J. A. y Hancock, W. W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 167, 2887-2894 (2001).
26. Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C. y Golenbock, D. T. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes Infect* 6, 1361-1367 (2004).
27. Jiang, Z., *et al.* CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol* 6, 565-570 (2005).
28. Coats, S. R., Do, C. T., Karimi-Naser, L. M., Braham, P. H. y Darveau, R. P. Antagonistic lipopolysaccharides block *E. coli* lipopolysaccharide function at human TLR4 via interaction with the human MD-2 lipopolysaccharide binding site. *Cell Microbiol* 9, 1191-1202 (2007).
29. Siri, A., *et al.* Human tenascin: primary structure, pre-mRNA splicing patterns and localization of the epitopes recognized by two monoclonal antibodies. *Nucleic Acids Res* 19, 525-531 (1991).
30. Gondokaryono, S. P., *et al.* The extra domain A of fibronectin stimulates murine mast cells via toll-like receptor 4. *J Leukoc Biol* 82, 657-665 (2007).
31. Taylor, K. R., *et al.* Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *J Biol Chem* 282, 18265-18275 (2007).
32. Kim, H. M., *et al.* Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 130, 906-917 (2007).
33. Schaefer, L., *et al.* The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest* 115, 2223-2233 (2005).
34. Foell, D., Wittkowski, H. y Roth, J. Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3, 382-390 (2007).
35. Taniguchi, N., *et al.* High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* 48, 971-981 (2003).
36. Pullerits, R., *et al.* High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis. *Arthritis Rheum* 48, 1693-1700 (2003).
37. Kokkola, R., *et al.* Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis Rheum* 48, 2052-2058 (2003).
38. Gutowski, N. J., Newcombe, J. y Cuzner, M. L. Tenascin-R and C in multiple sclerosis lesions: relevance to extracellular matrix remodelling. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25, 207-214 (1999).
39. Amin, K., *et al.* Inflammation and structural changes in the airways of patients with primary Sjogren's syndrome. *Respir Med* 95, 904-910 (2001).
40. Loots, M. A., *et al.* Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol* 111, 850-857 (1998).
41. Lange, K., *et al.* Endothelin receptor type B counteracts tenascin-C-induced endothelin receptor type A-dependent focal adhesion and actin stress fiber disorganization. *Cancer Res* 67, 6163-6173 (2007).
42. Saga, Y., Yagi, T., Ikawa, Y., Sakakura, T. y Aizawa, S. Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev* 6, 1821-1831 (1992).
43. Hoshino, K., *et al.* Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162, 3749-3752 (1999).
44. Takeuchi, O., *et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443-451 (1999).
45. Keystone, E. C., Schorlemmer, H. U., Pope, C. y Allison, A. C. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthritis Rheum* 20, 1396-1401 (1977).
46. van Lent, P. L., *et al.* Fc gamma receptors directly mediate cartilage, but not bone, destruction in murine antigen-induced arthritis: uncoupling of cartilage damage from bone erosion and joint inflammation. *Arthritis Rheum* 54, 3868-3877 (2006).
47. Foxwell, B., *et al.* Efficient adenoviral infection with IkappaB alpha reveals that macrophage tumor necrosis factor alpha production in rheumatoid arthritis is NF-kappaB dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8211-8215 (1998).
48. Kurt-Jones, E. A., *et al.* Use of murine embryonic fibroblasts to define Toll-like receptor activation and specificity. *J Endotoxin Res* 10, 419-424 (2004).
49. Todaro, G. J. y Green, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17, 299-313 (1963).
50. Butler, D. M., Malfait, A. M., Maini, R. N., Brennan, F. M. y Feldmann, M. Anti-IL-12 and anti-TNF antibodies synergistically suppress the progression of murine collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 29, 2205-2212 (1999).
51. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. y Pease, L. R. Site-directed mutagenesis by overlap

- extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59 (1989).
52. Clark, R. A., Erickson, H. P. y Springer, T. A. Tenascin supports lymphocyte rolling. *J Cell Biol* 137, 755-765 (1997).
53. El-Karef, A., *et al.* Deficiency of tenascin-C attenuates liver fibrosis in immune-mediated chronic hepatitis in mice. *J Pathol* 211, 86-94 (2007).
54. Loike, J. D., Cao, L., Budhu, S., Hoffman, S. y Silverstein, S. C. Blockade of alpha 5 beta 1 integrins reverses the inhibitory effect of tenascin on chemotaxis of human monocytes and polymorphonuclear leukocytes through three-dimensional gels of extracellular matrix proteins. *J Immunol* 166, 7534-7542 (2001).
55. Talts, J.F., Wirl, G., Dictor, M., Muller, W.J. y Fassler, R. tenascin-C modulates tumor stroma and monocyte/macrophage recruitment but not tumor growth or metastasis in a mouse strain with spontaneous mammary cancer. *J Cell Sci* 112 (Pt 12), 1855-1864 (1999).
56. Jones (2000) *Matrix Biol.*, 19, 581-96
57. Harandi (2009) *Expert Review of Vaccines*, 8, 293-298
58. McIntyre (2006) *BMC Biotechnol.* 6: 1
59. Paddison (2002) *Genes Dev.* 16 (8): 948-58
60. Andreakos (2004) *Blood*, 103, 2229-37
61. Goh, F. G., Piccinini, A.M., Krausgruber, T., Udalova, I. A. y Midwood, K. S. Transcriptional regulation of the endogenous danger signal tenascin-C: a novel autocrine loop in inflammation. *J Immunol* 184, 2655-2662 (2010).
62. Midwood, K. *et al.* Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med* 15, 774-780 (2009).
63. LaFleur, D. W. *et al.* Aortic smooth muscle cells interact with tenascin-C through its fibrinogen-like domain. *J Biol Chem* 272, 32798-32803 (1997).
64. Taylor, P. C. y Feldmann, M. Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 5, 578-582 (2009).
65. Yokoyama, K., Erickson, H. P., Ikeda, Y. y Takada, Y. Identification of amino acid sequences in fibrinogen gamma -chain and tenascin C C-terminal domains critical for binding to integrin alpha vbeta 3. *J Biol Chem* 275, 16891-16898 (2000).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente para la modulación de una respuesta inflamatoria crónica en la que el agente modula la actividad biológica de tenascina C, en la que el agente es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene especificidad por el dominio FBG de tenascina C.
2. Un agente de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el agente modula la actividad biológica de tenascina C alterando las propiedades de unión de tenascina C.
- 10 3. Un agente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 siendo el agente un inhibidor de las propiedades de unión de tenascina C, o siendo el agente un inhibidor de la unión competitiva de tenascina C.
- 15 4. Un agente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fv, fragmentos scFv, Fab, dominios variables individuales y anticuerpos de dominio, y en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo están opcionalmente humanizados.
- 20 5. Un agente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en donde la respuesta inflamatoria crónica está asociada a una afección **caracterizada por** inflamación inapropiada, por ejemplo en donde la respuesta inflamatoria crónica está asociada a artritis reumatoide (AR), afecciones autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias del intestino, heridas que no se curan, esclerosis múltiple, cáncer, aterosclerosis, enfermedad de Sjogren, diabetes, lupus eritematoso (incluyendo lupus eritematoso sistémico), asma, enfermedades fibróticas (incluyendo cirrosis hepática), fibrosis pulmonar, daño por UV y psoriasis.
- 25 6. Una composición que comprende un agente como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un vehículo, un excipiente y/o un diluyente farmacéuticamente aceptables y opcionalmente que comprende además al menos otro agente.
- 30 7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el al menos otro agente es un agente antiinflamatorio (por ejemplo antiinflamatorios no esteroideos (AINE), corticosteroides, fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (DMARD) o inmunosupresores, una estatina, un agente biológico (productos biológicos), un agente inmunosupresor, un salicilato y/o un agente microbicida.
- 35 8. Un agente o una composición como se definen en las reivindicaciones 1-7 para uso en el tratamiento de una afección inflamatoria crónica, en donde la respuesta inflamatoria crónica se asocia a artritis reumatoide (AR), enfermedades inflamatorias del intestino, aterosclerosis y/o psoriasis.
- 40 9. Uso de un agente o de una composición como se definen en las reivindicaciones 1-7 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección inflamatoria crónica, en donde la respuesta inflamatoria crónica está asociada a artritis reumatoide (AR), enfermedades inflamatorias del intestino, aterosclerosis y/o psoriasis.
- 45 10. Un kit de partes que comprende:
 (i) un agente o una composición como se definen en las reivindicaciones 1-7
 (ii) medios de administración
 (iii) instrucciones para su uso
 y que comprende opcionalmente además
 (iv) al menos otro agente.

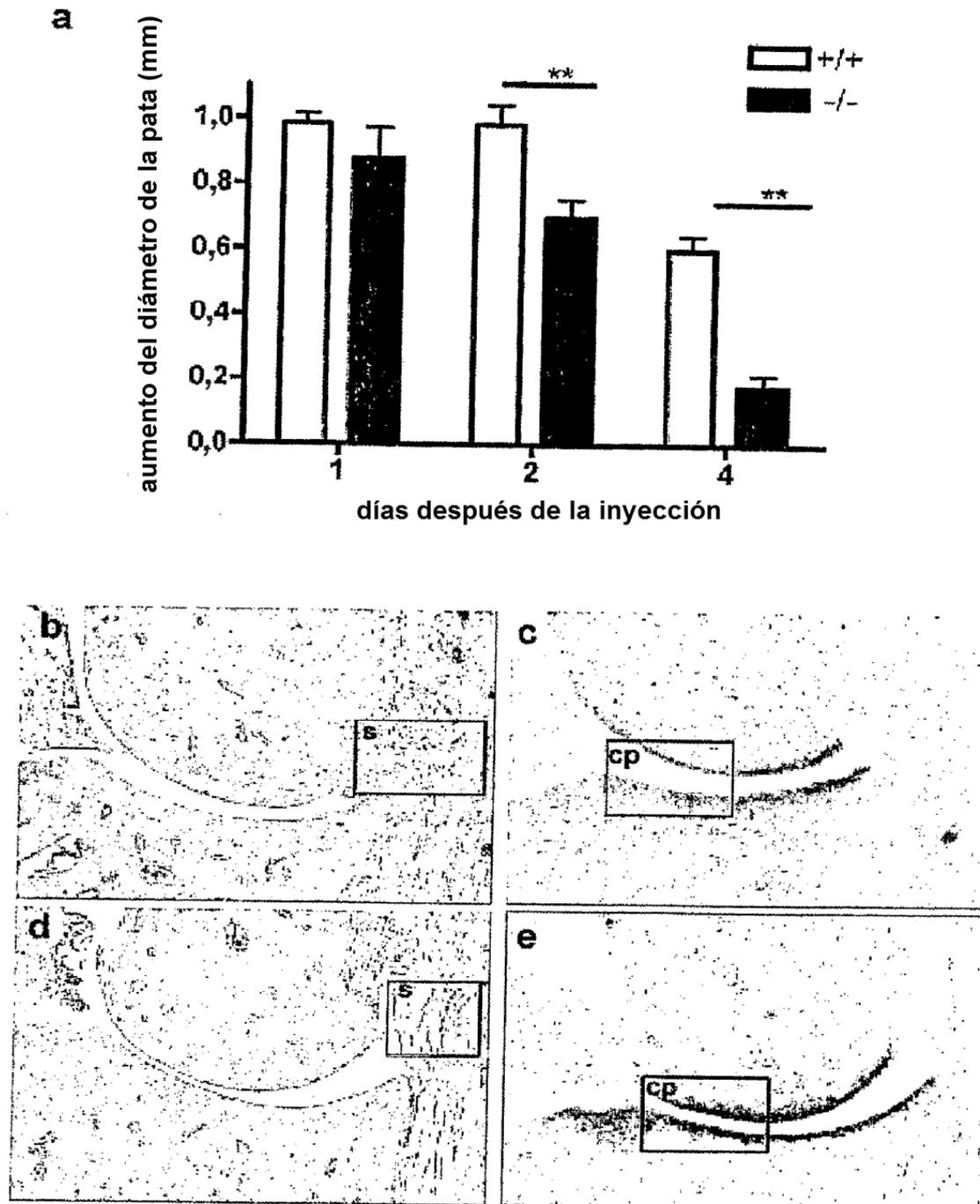


Figura 1

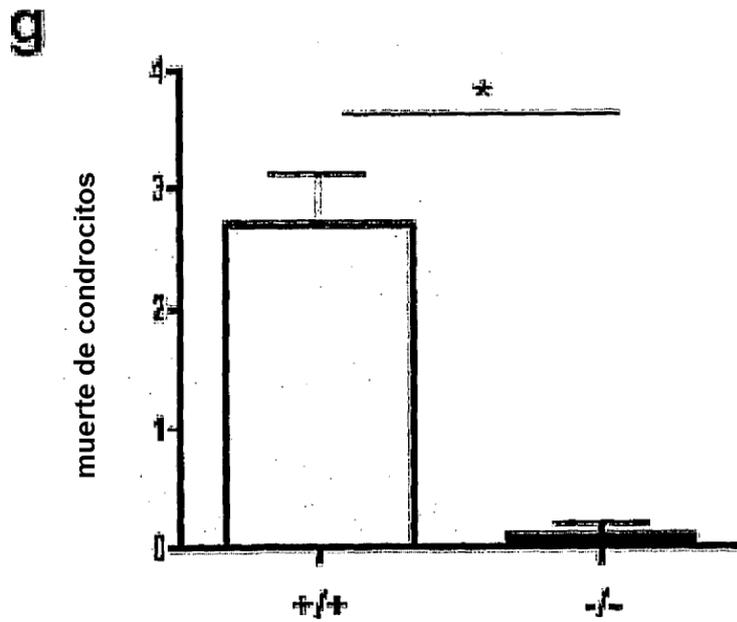
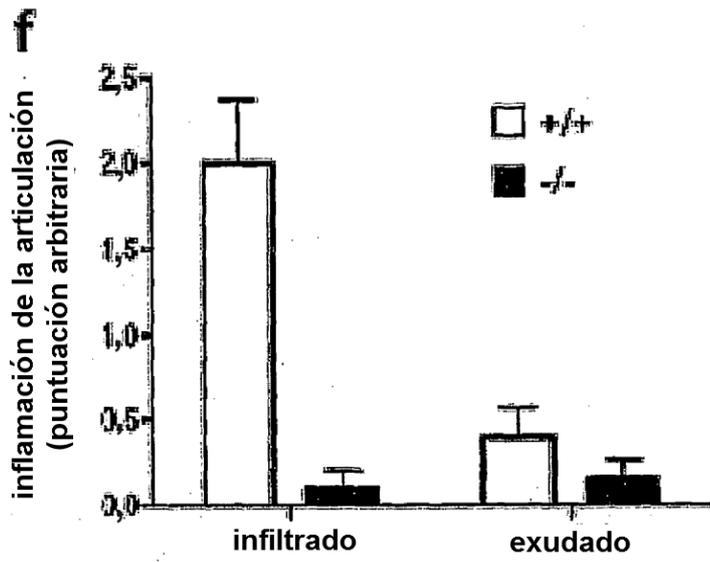


Figura 1 (continuación)



Figura 2

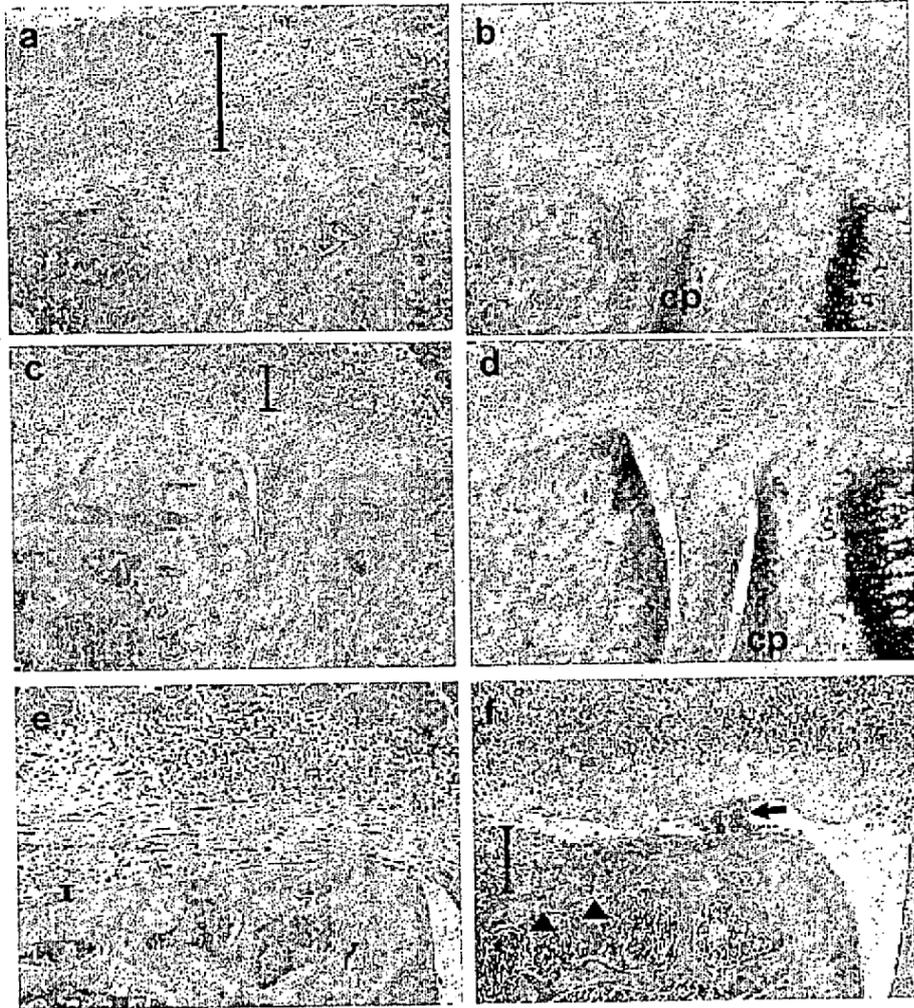


Figura 3

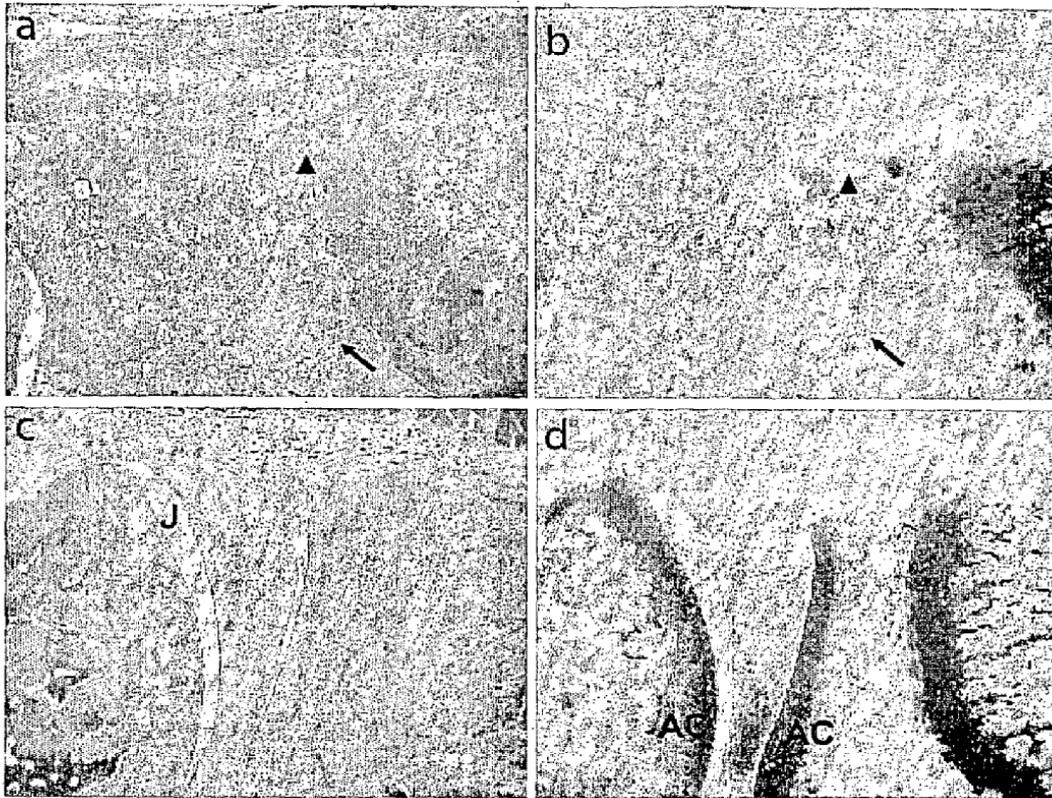
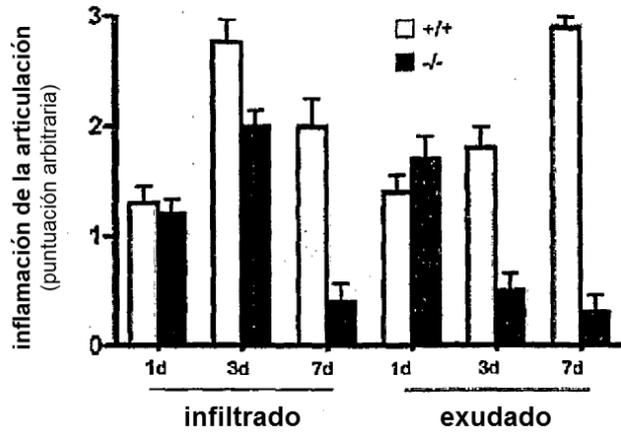


Figura 4

e



f

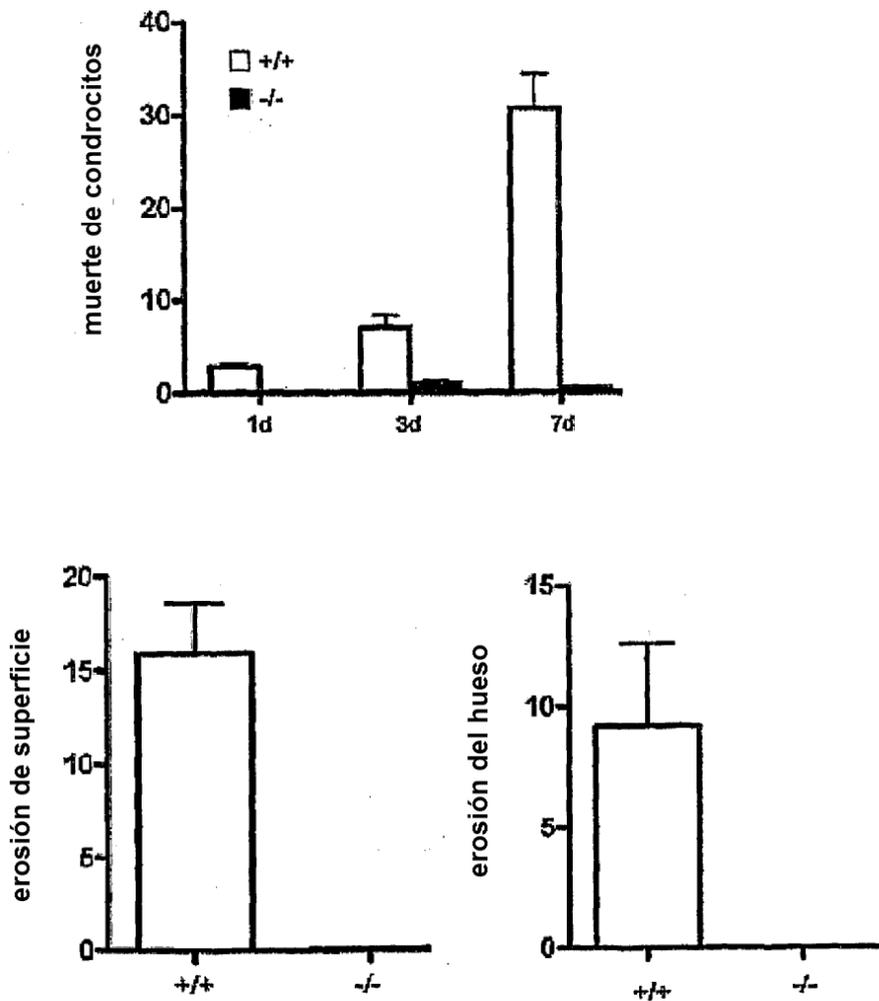


Figura 4 (continuación)

a

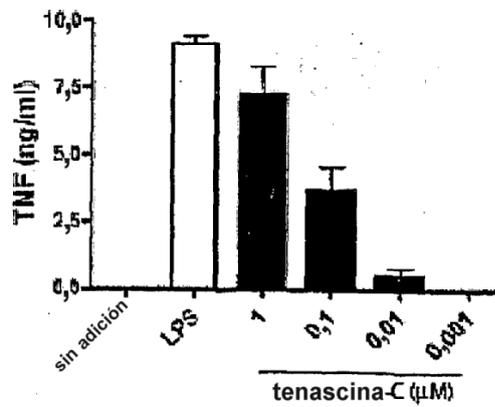
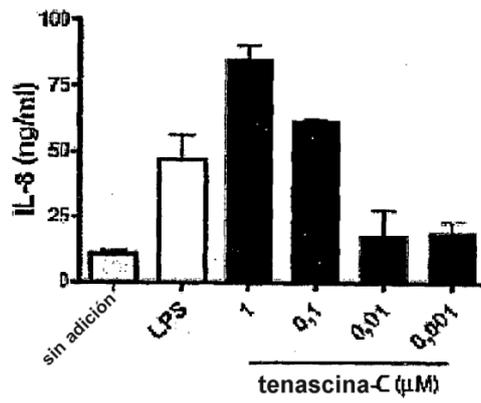
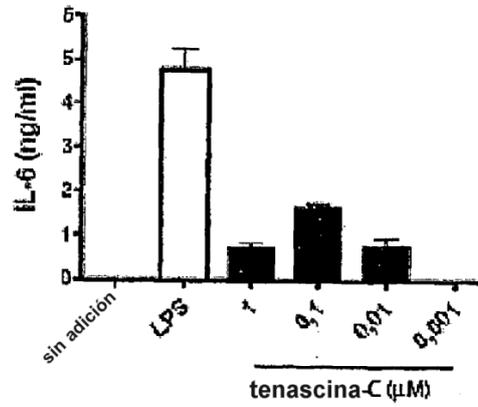
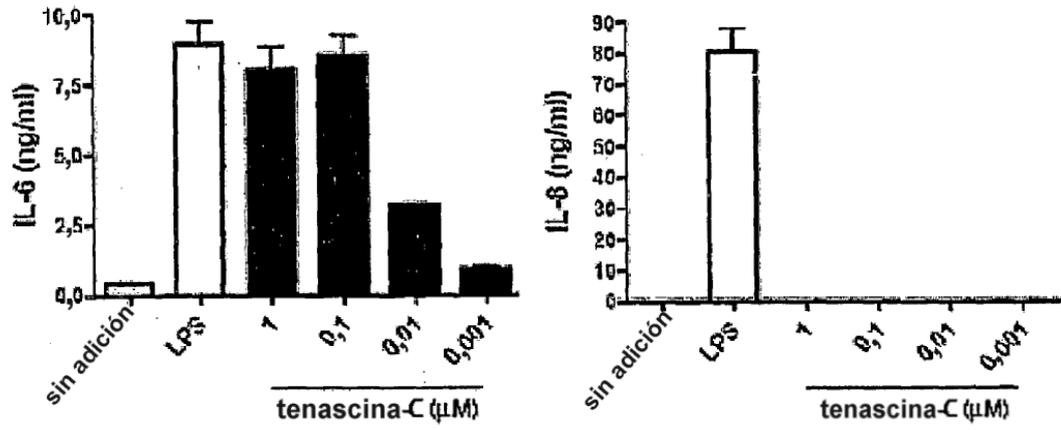


Figura 5

b



c

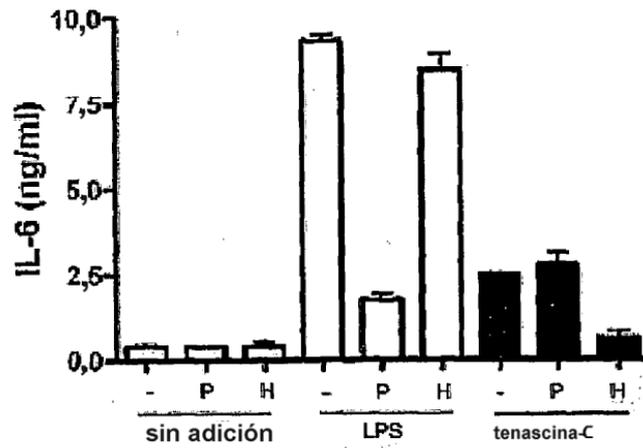


Figura 5 (continuación)

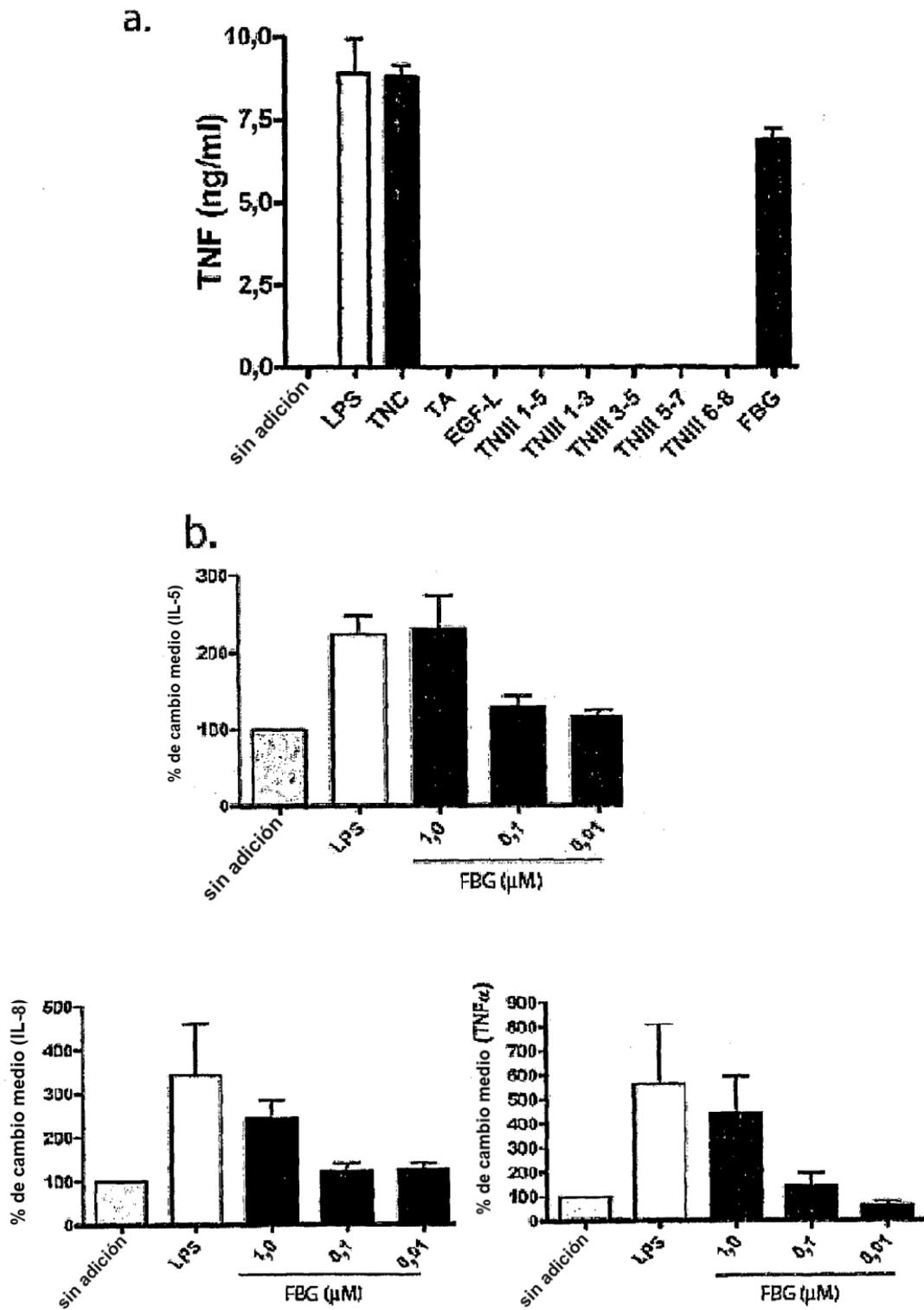


Figura 6

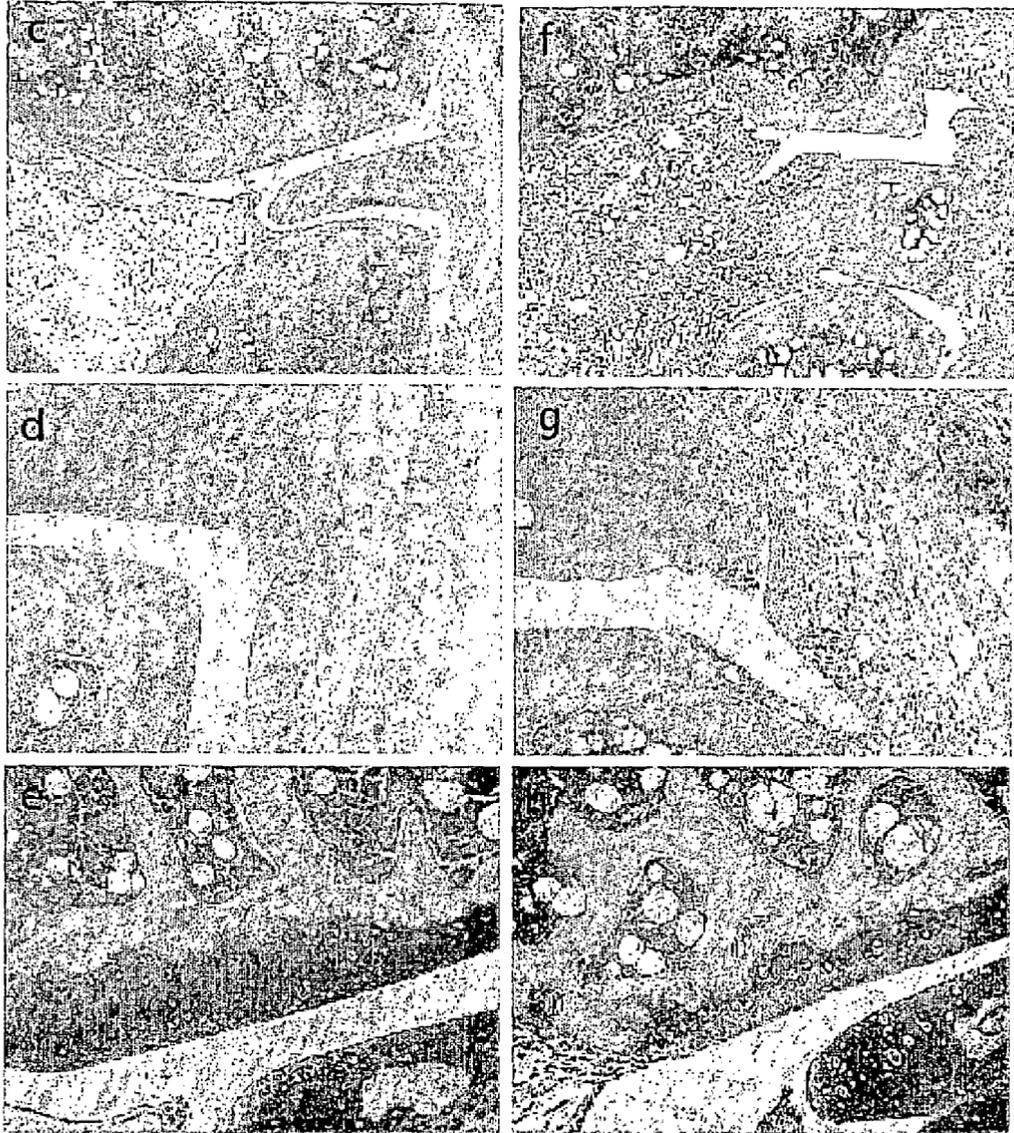


Figura 6 (continuación)

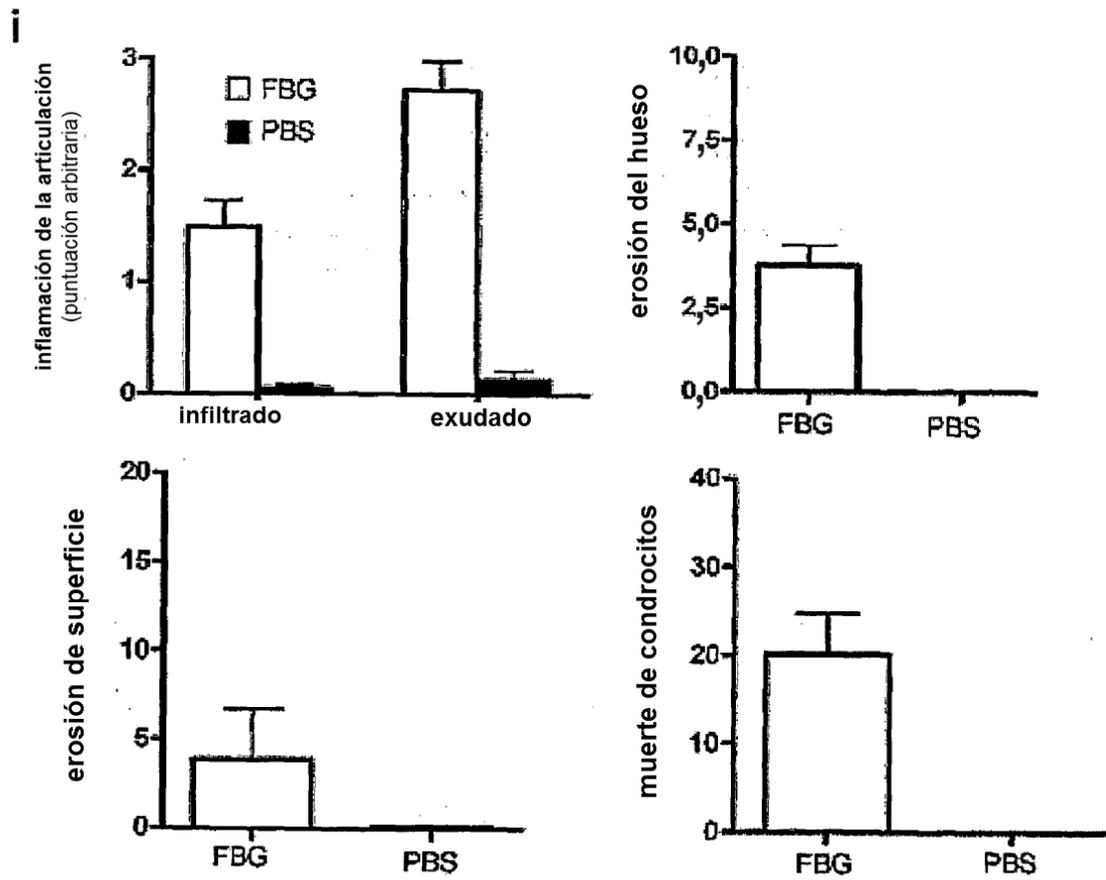


Figura 6 (continuación)

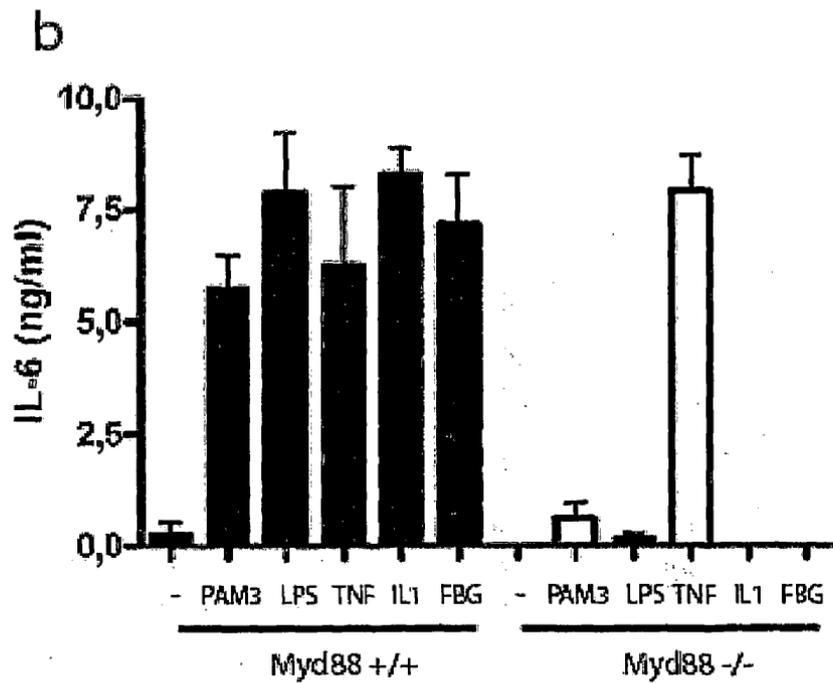
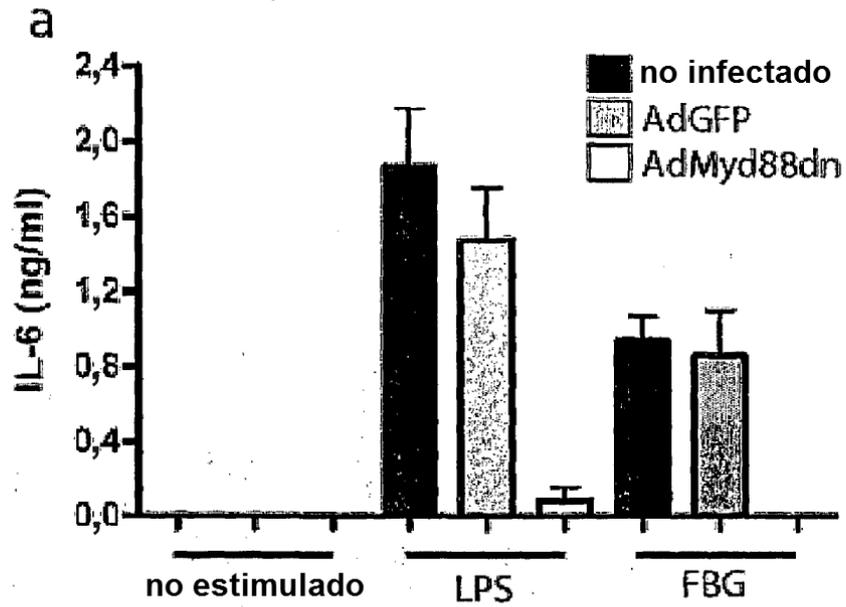


Figura 7

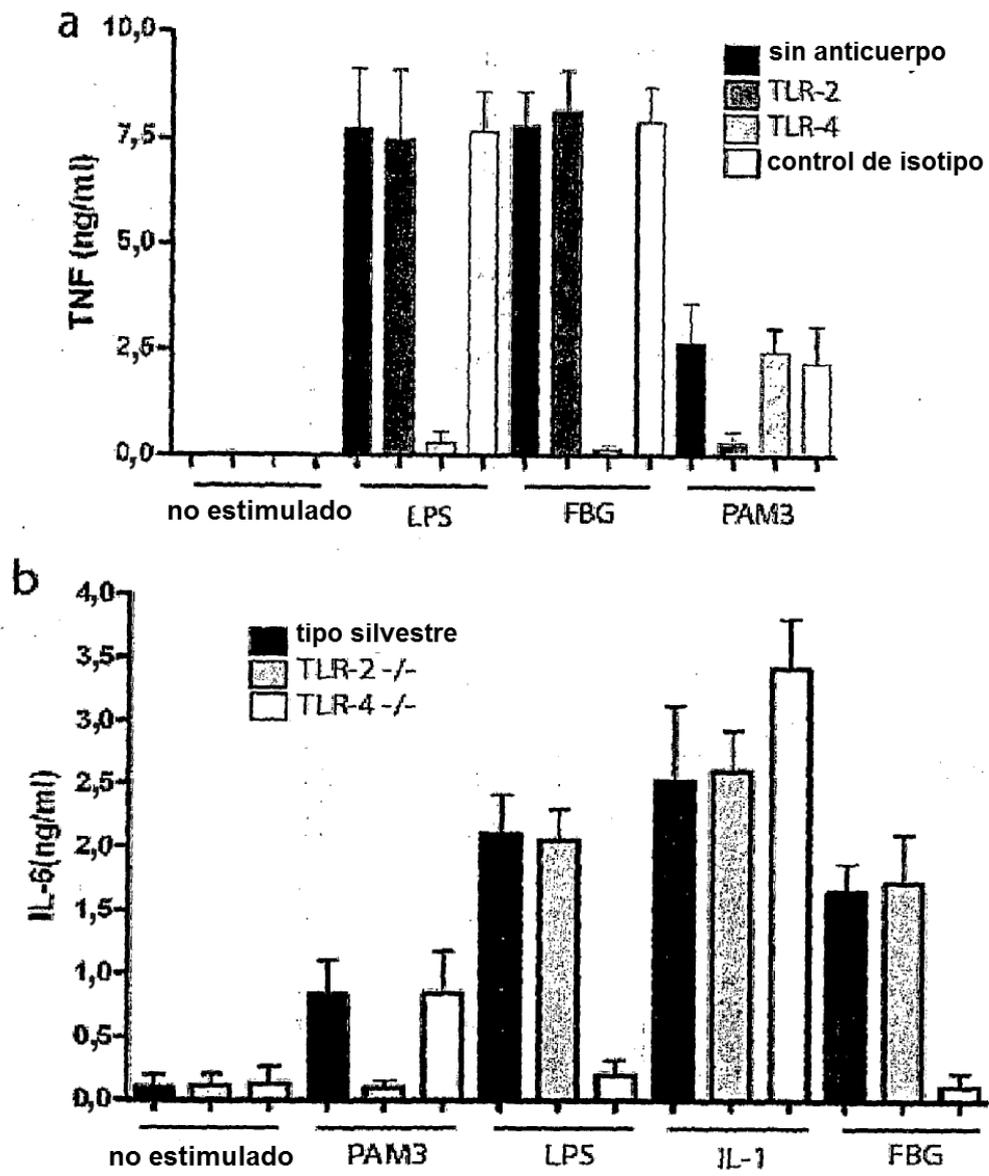


Figura 8

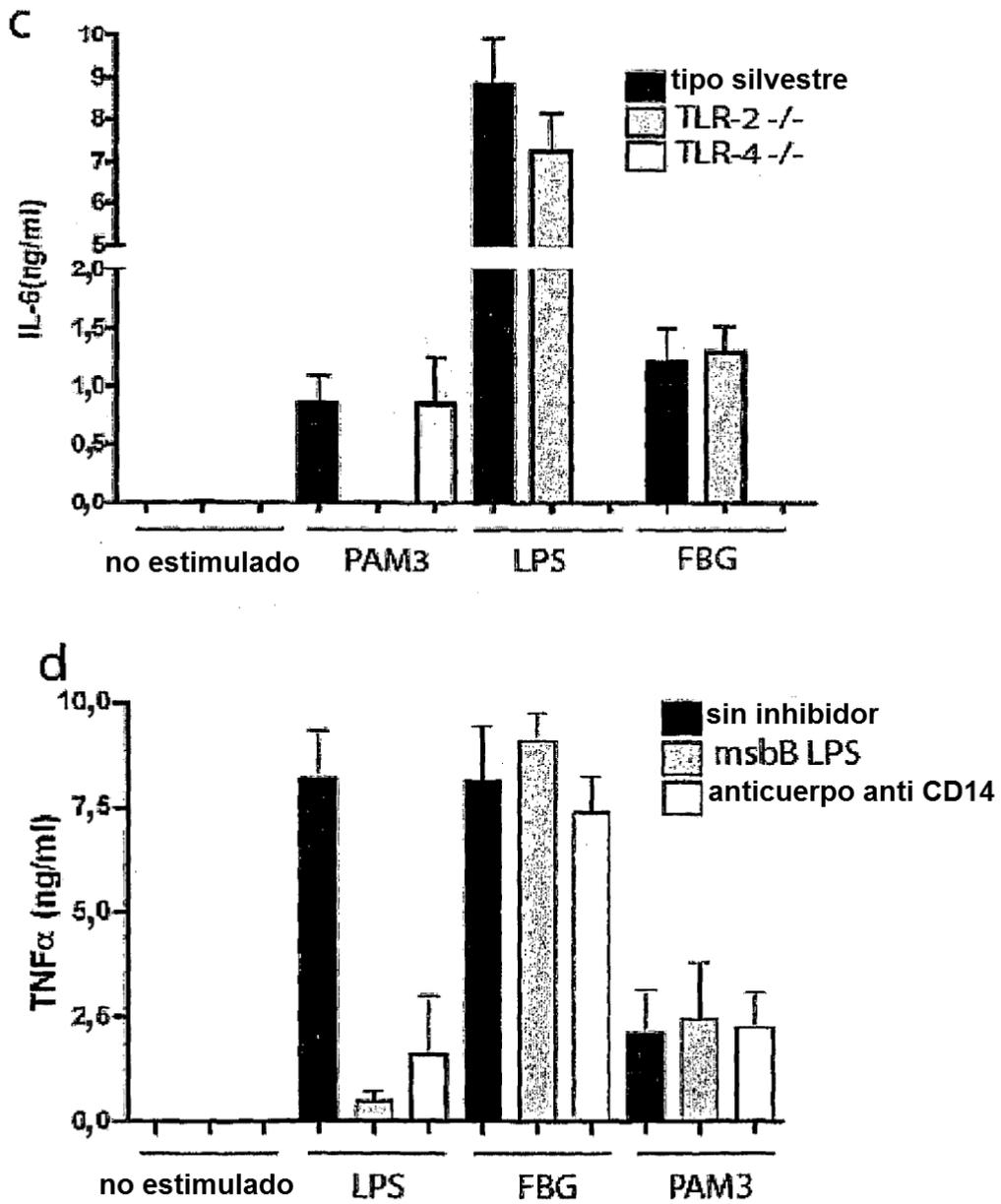


Figura 8 (continuación)

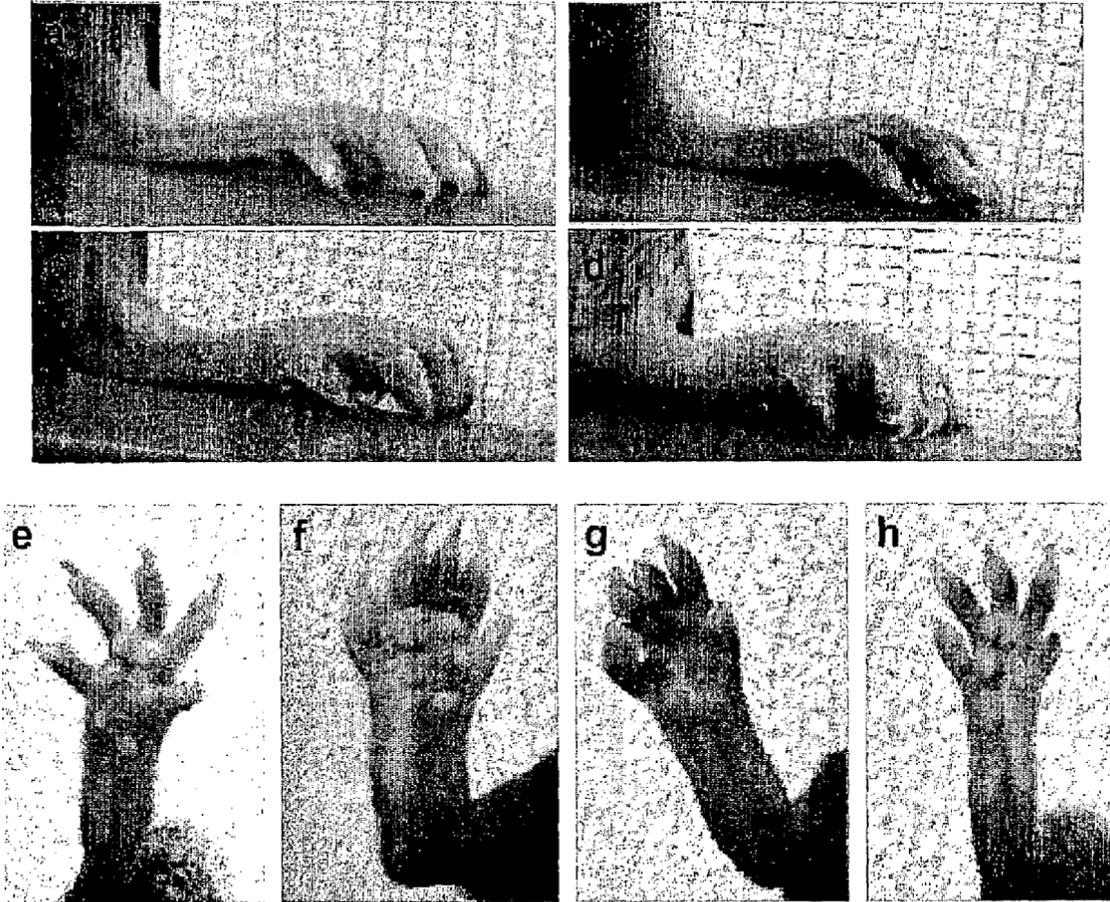
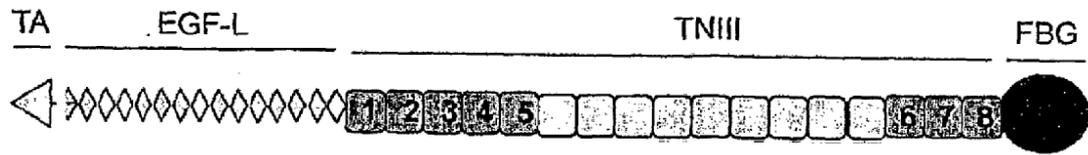


Figura 9

a



b

Región	Nombre	Restos	PM (kDa)
	TA	23-45	15,6
	EGF-L	146-621	49,4
	TNIII1-5	622-1071	51,2
	TNIII6-8	1709-1973	29,4
	FBG	1974-2201	26,9
	TNIII1-3	622-891	31,4
	TNIII3-5	802-1071	30,6
	TNIII5-7	984-1885	29,7

Figura 10

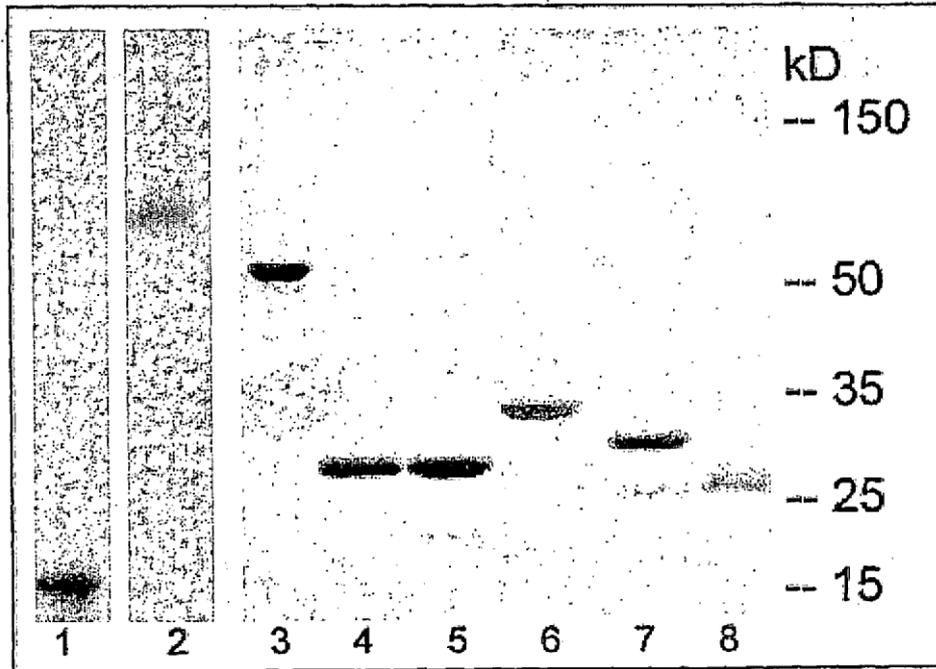
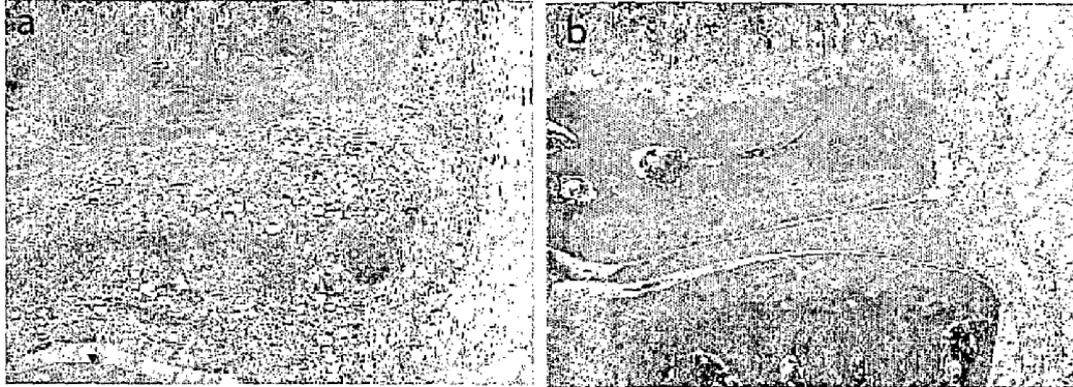


Figura 11



C

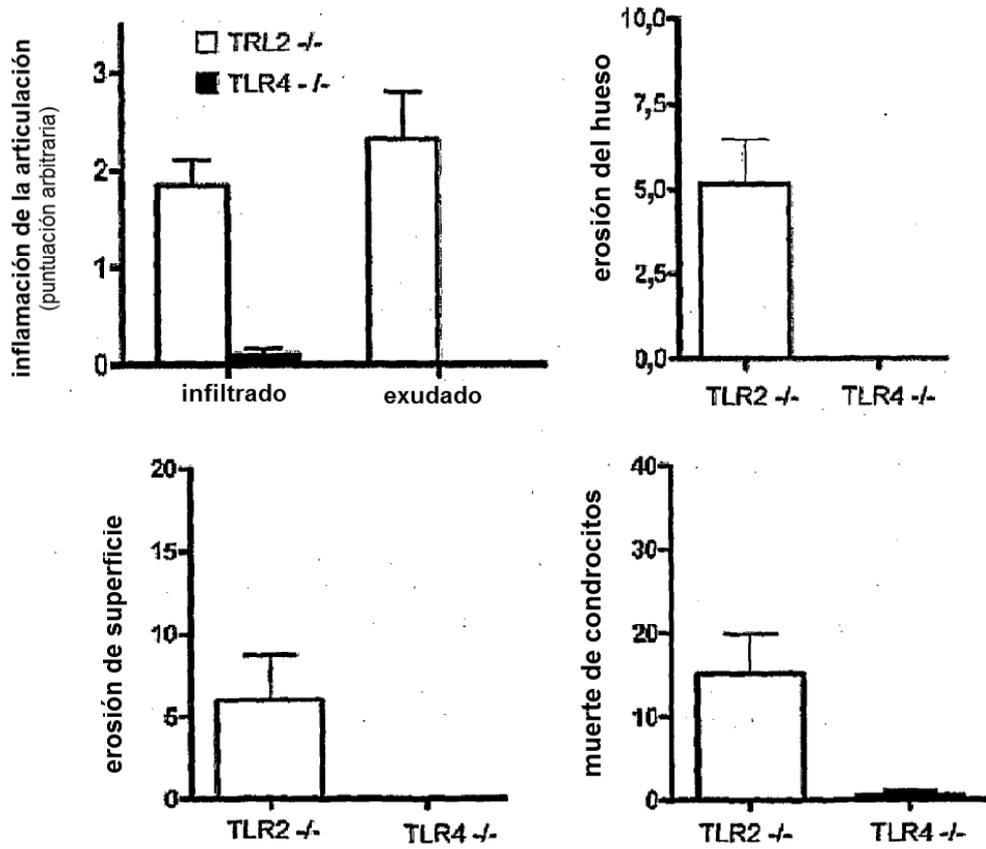


Figura 12

dominio TA

23 gvlkkvir hkrqsgvnat lpeen 45

dominio EGFL

146 cclqp atgrldtrpf csgrgnfste ggcvccepww
 181 kgpncsepec pgnchlrgc idggcicddg ftgedcsqla cpsdcndqgk cvngvcicfe
 241 gyagadcsre icpvpcseeh gtcvdglcvc hdgfagddcn kplclnncyn rgrcvenecv
 301 cdegftgedc selicpndcf drgrcingtc yceegftged cgkptcphac htqgrceegq
 361 cvcdegfagl dcsekrpad chnrgrcvdg rceddgftg adcgelkcpn gcsghgrcvn
 421 ggcvcdegyt gedcsqlrcp ndchsrgrcv egkcvceqgf kgydcsdmsc pndchqhgrc
 481 vngmccvddg ytgedcrrdq cprdcsnrgl cvdggcvced gftgpdcael scpndchggq
 541 rcvngqcvch egfmgkdcke qrcpsdchgg grcvdggcic hegftgldcg qhscpsdcnn
 601 lgqcvsgrci cnegysgedc s 621

dominio FNIII

622 evsppkdlv vtevteetvn lawdnemrvt eylvytpth
 661 egglemqfrv pgdqtstiiq elepgveyfi rvfailenkk sipvsarvat ylpapeglkf
 721 ksiketsvev ewdpldiafe tweiifrnmm kedegeitks lrrpetsyrg tglapggeye
 781 islhivknnt rggplkrvtt trldapsqie vkdvtdttal itwfkplaei dgieltygik
 841 dvpgdrttid ltedenqysi gnkpdteye vslisrrgdm ssnpaketft tgl dapnrlr
 901 rvsqtdnsit lewrngkaai dsyrikyapi sggdhaevdv pksqqattkt tltglrpgte
 961 ygigvsavke dkesnpatin aateldtpkd lqvsetaets ltllwktpla kfdryrlnys
 1021 lptggwvqvq lprnttsyvl rglepgqeyn vltaekgrh kskparvkas teqapelenl
 1081 tvtevgwdgl rlnwtaadqa yehfiqvge ankveaarnl tvpgslravd ipglkaatpy
 1141 tvsiygvigq yrtpvlsaea stgetpnlge vvvaevgwda lklnwtapeg ayeyffiqvq
 1201 eadtveaaqn ltvpgglrst dlpglkaath ytitirgvtq dfsttplsve vlteevpdmg
 1261 nltvtevswd alrlnwttpd gtydqftiqv qeadqveeah nltvpgslrs meipglragt
 1321 pyvtvlhgev rghstrplav evvtedlpql gdllavsevgw dgllrlnwtaa dnayehfviq
 1381 vqevnkveaa qnltlpgslr avdipgleaa tpyrvsiygv irgyrtpvls aeastakepe
 1441 ignlnvsdit pesfnlswma tdgifetfti eiidsnrllt tveynisgae rtahisglpp
 1501 stdfivylsg lapsirtkti satattealp llenltisdi npygftvswm asenafdsfl
 1561 vtvdsgkll dpqeftlsgt qrklelrgli tgigyevmvs gftqghqtkp lraeivteae
 1621 pevdnllvsd atpdgfrlsw tadegvdfnf vlkirdtkkq sepleitlla pertrdltgl
 1681 reateyeiel ygiskgrrsq tvsaiattam gspkevifsd itensatvsw raptaqvess
 1741 rityvpitgg tpsmvtvdgt ktqtrlvkli pgveylvsii amkgfeesep vsgsftald
 1801 gpsglvtani tdsealarwq paiatvdsyv isytgekvpe itrvtsgntv eyaltdlepa
 1861 teytlrifae kgpqksstit akfttdldsp rdlstatevqs etalltwrpp rasvtgyllv
 1921 yesvdgtvke vivgpdttsy sladlspsth ytakiqalng plrsnmiqti ftt 1973

dominio FBG

1974 igllypf
 1981 pkdcsqamln gdttsglyti ylngdkaqal evfcdmtdsg ggwivflrrk ngrenfyqnw
 2041 kayaagfgdr reefwlgldn lnkitaqqy elrvdlrdhg etafavydkf svgdaktryk
 2101 lkvegysgta gdsamayhng sfstfdktd saitncalsy kgafwyrnch rvnlmgrygd
 2161 nnhsqgvnwfw hwkghehsiq faemklrpsn frnlegrkr a 2201

Figura 13

1 attacagagg aaggagctcg ctatataagc cagccaaagt tggetgcacc ggccacagcc
 61 tgcctactgt caccgcctc tcccgcgcgc agatacacgc ccccgctcc gtgggcacaa
 121 aggcagcgct gctggggaac tcgggggaac ggcacagtgga gaaccgccc agctccacac
 181 tccaggtact tctccaagg acctaggtct ctgcgccatc ggaaagaaaa taattctttc
 241 aagaagatca gggacaactg atttgaagtc tactctgtgc ttctaaatcc ccaattctgc
 301 tgaaagtgag ataccctaga gccctagagc cccagcagca cccagccaaa cccacctcca
 361 ccatgggggc catgactcag ctggtggcag gtgtctttct tgctttcctt gccctcgcta
 421 ccgaaggtgg ggtcctcaag aaagtcatcc ggcacaagcg acagagtggg gtgaacgcca
 481 cctgcccaga agagaaccag ccagtgggtg ttaaccacgt ttacaacatc aagctgcccag
 541 tgggtatccc gtgttcgggtg gatctggagt cagccagtgg ggagaaagac ctggcaccgc
 601 cttcagagcc cagcgaaagc tttcaggagc acacagtgga tggggaaaa cagattgtct
 661 tcacacatcg catcaacatc ccccgccggg cctgtggctg tgccgcagcc cctgatgta
 721 aggagctgct gagcagactg gaggagctgg agaacctggg gtcttcctcg agggagcaat
 781 gtactgcagg agcaggctgc tgtctccagc ctgccacagc ccgcttggac accaggccct
 841 tctgtagcgg tcggggcaac ttcagcactg aaggatgtgg ctgtgtctgc gaacctggct
 901 ggaaaggccc caactgctct gagcccgaat gtccaggcaa ctgtcacctt cgaggccggg
 961 gcattgatgg gcagtgcac tgtgacgacg gcttcacggg cgaggactgc agccagctgg
 1021 cttgccccag cgactgcaat gaccagggca agtgcgtaaa tggagtctgc atctgtttcg
 1081 aaggctacgc cggggctgac tgcagccgtg aaatctgccc agtgccctgc agtgaggagc
 1141 acggcacatg tgtagatggc ttgtgtgtgt gccacgatgg ctttgaggc gatgactgca
 1201 acaagcctct gtgtctcaac aattgctaca accgtggacg atgctgtggag aatgagtgcg
 1261 tgtgtgatga gggtttcacg ggcgaagact gcagtgagct catctgcccc aatgactgct
 1321 tcgaccgggg ccgctgcac atatggcact gctactgcga agaaggcttc acaggatgag
 1381 actgcccggaa acccacctgc ccacatgcct gccacacca gggccgggtg gaggaggggc
 1441 agtgtgatg tgatgagggc tttgcccgtg tggactgcag cgagaagagg tgcctgctg
 1501 actgtcaca tcgtggccgc tgtgtagacg ggcgggtgta gtgtgatgat ggtttcactg
 1561 gagctgactg tggggagctc aagtgtcca atggctgcag tggccatggc cgctgtgtca
 1621 atgggcagtg tgtgtgtgat gagggtata ctggggagga ctgcagccag ctacgggtgc
 1681 ccaatgactg tcacagtcgg ggcgctgtg tcgagggcaa atgtgtatgt gagcaaggct
 1741 tcaagggcta tgactgcagt gacatgagct gccctaata ctgtcaccag cacggccgct
 1801 gtgtgaatgg catgtgtgtt tgtgatgacg gctacacagg ggaagactgc cgggatcgcc
 1861 aatgccccag ggactgcagc aacaggggccc tctgtgtgga cggacagtgc gtctgtgagg
 1921 acggcttcac cggccctgac tgtgcagaac tctcctgtcc aaatgactgc catggccagg
 1981 gtgcgtgtgt gaatgggcag tgcgtgtgcc atgaaggatt tatgggcaaa gactgcaagg
 2041 agcaaagatg tcccagtgac tgtcatggcc agggccgctg cgtggacggc cagtgcactt
 2101 gccacgaggg cttcacaggc ctggactgtg gccagcactc ctgccccagt gactgcaaca
 2161 acttaggaca atgctctctg ggcgctgca tctgcaacga gggctacagc ggagaagact
 2221 gctcagaggt gtctcctccc aaagacctcg ttgtgacaga agtgacggaa gagacggtca
 2281 acctggcctg ggacaatgag atgcgggtca cagagtacct tgtcgtgtac acgcccacc
 2341 acgaggggtg tctggaaatg cagttccgtg tgccctggga ccagacgtcc accatcatcc
 2401 aggagctgga gcctgggtgtg gactacttta tccgtgtatt tgccatcctg gagaacaaga
 2461 agagcattcc tgtcagcgc aggggtggcca cgtacttacc tgcacctgaa ggctgaaat
 2521 tcaagtccat caaggagaca tctgtggaag tggagtggga tctctagac attgcttttg
 2581 aaacctggga gatcatcttc cggaaatgta ataaagaaga tgaggagag atcaccaaaa
 2641 gcctgaggag gccagagacc tcttaccggc aaactggtct agctcctggg caagagtatg
 2701 agatctctct gcacatagtg aaaaacaata cccggggccc tggcctgaag aggggtacca
 2761 ccacacgctt ggatgcccc agccagatcg aggtgaaaga tgtcacagac acctgcct
 2821 tgatcacctg gttcaagccc ctggctgaga tctgatggcat tgagctgacc tacggcatca
 2881 aagacgtgcc aggagaccgt accaccatcg atctcacaga ggacgagaac cagtactcca
 2941 tcgggaacct gaagcctgac actgagtacg aggtgtccct catctcccgc agaggtgaca
 3001 tgtcaagcaa cccagccaaa gagaccttca caacaggcct cgatgctccc aggaatcttc

Figura 14

3061 gacgtgtttc ccagacagat aacagcatca ccctggaatg gaggaatggc aaggcagcta
 3121 ttgacagtta cagaattaag tatgccccca tctctggagg ggaccacgct gaggttgatg
 3181 ttccaaagag ccaacaagcc acaaccaaaa ccacactcac aggtctgagg ccgggaactg
 3241 aatatgggat tggagtttct gctgtgaagg aagacaagga gagcaatcca gcgaccatca
 3301 acgcagccac agagtggac acgcccgaag accttcaggt ttctgaaact gcagagacca
 3361 gcctgaccct gctctggaag acaccgttgg ccaaatttga ccgctaccgc ctcaattaca
 3421 gtctccccac aggccagtgg gtgggagtgc agcttccaag aaacaccact tctatgtcc
 3481 tgagaggcct ggaaccagga caggagtaca atgtcctcct gacagccgag aaaggcagac
 3541 acaagagcaa gcccgcacgt gtgaaggcat cactgaaca agcccctgag ctggaaaacc
 3601 tcaccgtgac tgaggttggc tgggatggcc tcagactcaa ctggaccgca gctgaccagg
 3661 cctatgagca ctttatcatt caggtgcagg aggccaacaa ggtggaggca gctcggaaacc
 3721 tcaccgtgcc tggcagcctt cgggctgtgg acataccggg cctcaaggct gctacgcctt
 3781 atacagtctc catctatggg gtgatccagg gctatagaac accagtgtct tctgctgagg
 3841 cctccacagg ggaactccc aatttgggag aggtcgtggt ggccgaggtg ggctgggatg
 3901 cctcaaaact caactggact gctccagaag gggcctatga gtactttttc attcaggtgc
 3961 aggaggctga cacagtagag gcagcccaga acctcaccgt cccaggagga ctgaggtcca
 4021 cagacctgcc tgggctcaaa gcagccactc attataccat caccatccgc ggggtcactc
 4081 aggacttcag cacaaccctt ctctctgttg aagtcttgac agaggaggtt ccagatatgg
 4141 gaaacctcac agtgaccgag gttagctggg atgtctcag actgaaactgg accacgccag
 4201 atggaacctc tgaccagttt actattcagg tccaggaggc tgaccaggtg gaagaggtc
 4261 acaatctcac ggttcctggc agcctgcgtt ccatggaaat cccaggcctc agggctggca
 4321 ctctttacac agtcaccctg cacggcgagg tcaggggcca cagcactcga ccccttgcctg
 4381 tagaggtcgt cacagaggat ctcccacagc tgggagattt agccgtgtct gaggttggct
 4441 gggatggcct cagactcaac tggaccag tggacaatgc ctatgagcac tttgtcattc
 4501 aggtgcagga ggtcaacaaa gtggaggcag ccagaacct cacgttgctt ggcagcctca
 4561 gggctgtgga catcccgggc ctcgaggctg ccacgcctta tagagtctcc atctatgggg
 4621 tgatccgggg ctatagaaca ccagtactct ctgctgaggc ctccacagcc aaagaacctg
 4681 aaattggaaa cttaaatggt tctgacataa ctcccagag cttcaatctc tctggatgg
 4741 ctaccgatgg gatcttcgag acctttacca ttgaaattat tgattccaat aggttgcctg
 4801 agactgtgga atataatata tctggtgctg aacgaaactgc ccataatctc gggctacccc
 4861 ctagtactga ttttattgtc tacctctctg gaacttgcct cagcatccgg accaaaacca
 4921 tcagtgccac agccacgaca gaggccctgc cccttctgga aaacetaacc atttccgaca
 4981 ttaatcccta cgggttcaca gtttctgga tggcatcgga gaatgccttt gacagctttc
 5041 tagtaacggg ggtggattct gggaaactgc tggaccccca ggaattcaca ctttcaggaa
 5101 cccagaggaa gctggagctt agaggcctca taactggcat tggctatgag gttatggtct
 5161 ctggcttcac ccaagggcat caaaccaagc ccttgagggc tgagattgtt acagaagccg
 5221 aaccggaagt tgacaacctt ctggtttcag atgccacccc agacgggttc cgtctgtcct
 5281 ggacagctga tgaaggggtc ttcgacaatt ttgttctcaa aatcagagat accaaaaagc
 5341 agtctgagcc actggaata accctacttg ccccgaacg taccagggac ataacaggtc
 5401 tcagagaggc tactgaatac gaaattgaac tctatggaat aagcaaagga aggcgatccc
 5461 agacagtcag tgctatagca acaacagcca tgggctcccc aaaggaagtc attttctcag
 5521 acatcactga aaattcggct actgtcagct ggagggcacc cacagcccaa gtggagagct
 5581 tccggattac ctatgtgccc attacaggag gtacaccctc catggtaact gtggacggaa
 5641 ccaagactca gaccaggctg gtgaaactca tacctggcgt ggagtacctt gtcagcatca
 5701 tcgccatgaa gggctttgag gaaagtgaac ctgtctcagg gtcattcacc acagctctgg
 5761 atggcccatc tggcctgggt acagccaaca tcaactgactc agaagccttg gccaggtggc
 5821 agccagccat tgccactgtg gacagttatg tcatctccta cacaggcgag aaagtgccag
 5881 aaattacacg cacgggtgtc gggaaacacag tggagtatgc tctgaccgac ctcgagcctg
 5941 ccacggaata cacactgaga atctttgcag agaaagggcc ccagaagagc tcaaccatca

Figura 14 (continuación)

6001 ctgccaaagtt cacaacagac ctcgattctc caagagactt gactgctact gaggttcagt
 6061 cggaaactgc cctccttacc tggcgacccc cccgggcatac agtcaccggg tacctgctgg
 6121 tctatgaatc agtggatggc acagtcaagg aagtcattgt gggccagat accacctcct
 6181 acagcctggc agacctgagc ccatccaccc actacacagc caagatccag gcactcaatg
 6241 ggcccctgag gagcaatatg atccagacca tcttcaccac aattggactc ctgtaccctt
 6301 tccccaaagga ctgctcccaa gcaatgctga atggagacac gacctctggc ctctacacca
 6361 tttatctgaa tggtgataag gctgaggcgc tgggaagtctt ctgtgacatg acctctgatg
 6421 ggggtggatg gattgtgttc ctgagacgca aaaacggacg cgagaacttc taccaaaaact
 6481 ggaaggcata tgctgctgga tttggggacc gcagagaaga attctggctt gggctggaca
 6541 acctgaacaa aatcacagcc caggggcagt acgagctccg ggtggacctg cgggacctatg
 6601 gggagacagc ctttgctgtc tatgacaagt tcagcgtggg agatgccaaag actcgtctaca
 6661 agctgaaggt ggaggggtac agtgggacag caggtgactc catggcctac cacaatggca
 6721 gatecttctc cacctttgac aaggacacag attcagccat caccaactgt gctctgtcct
 6781 acaaaggggc tttctggtag aggaactgtc accgtgtcaa cctgatgggg agatatgggg
 6841 acaataacca cagtcagggc gttaactggt tccactggaa gggccacgaa cactcaatcc
 6901 agtttgctga gatgaagctg agaccaagca acttcagaaa tcttgaaggc aggcgcaaac
 6961 gggcataaat tccagggacc actgggtgag agaggaataa ggcccagagc gaggaaagga
 7021 ttttaccaaa gcatcaatac aaccagccca accatcggtc cacacctggg catttgggtga
 7081 gagtcaaagc tgacctatgga tccttggggc caacggcaac agcatgggccc tcacctctc
 7141 tgtgatttct ttctttgcac caaagacatc agtctccaac atgtttctgt tttgttgtt
 7201 gattcagcaa aaatctccca gtgacaacat cgcaatagtt ttttacttct cttaggtggc
 7261 tctgggaatg ggagaggggt aggatgtaca ggggtagttt gttttagaac cagccgtatt
 7321 ttacatgaag ctgtataatt aattgtcatt atttttgtta gcaaagatta aatgtgtcat
 7381 tgggaagccat cctttttttt acatttcata caacagaaac cagaaaagca atactgtttc
 7441 cattttaagg atatgattaa tattattaat ataataatga tgatgatgat gatgaaaact
 7501 aaggatTTTT caagagatct ttctttccaa aacattttctg gacagtacct gattgtattt
 7561 tttttttaa taaaagcaca agtacttttg agtttgttaa aaaaaaaaaa aaaaaa

Figura 14 (continuación)

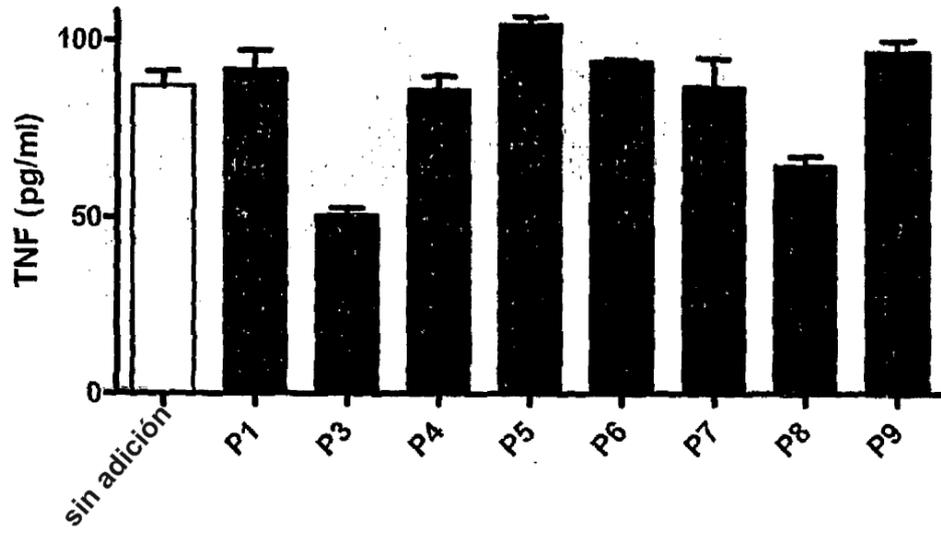


Figura 15

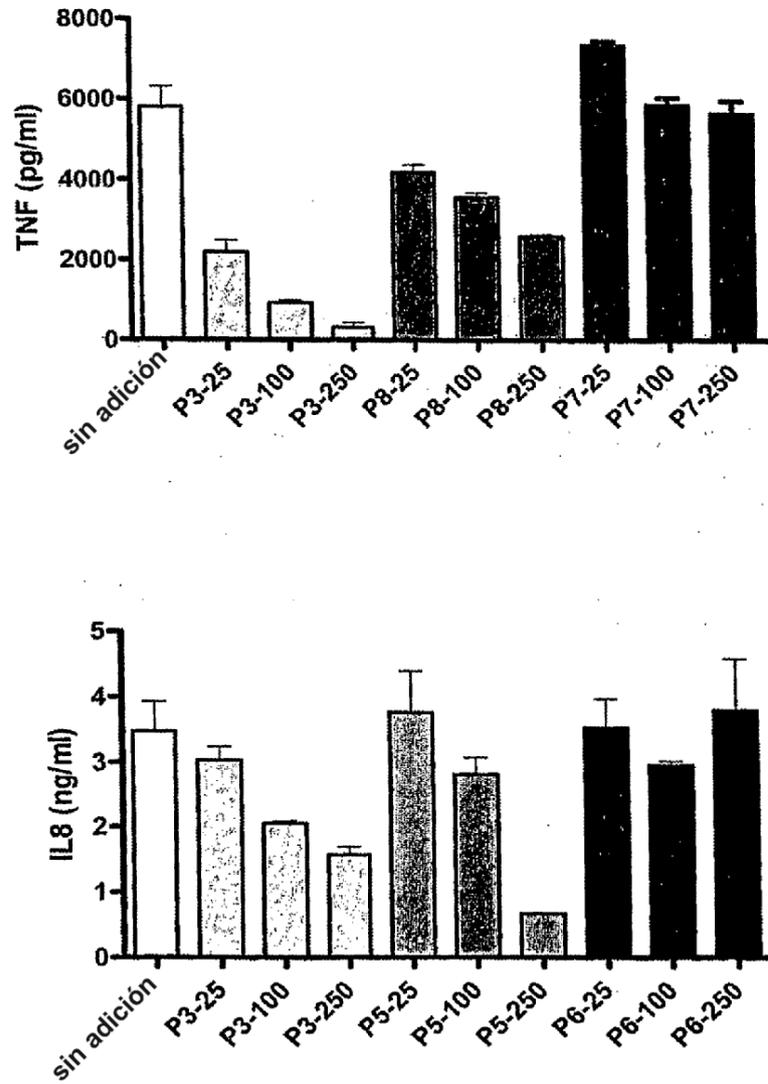


Figura 16

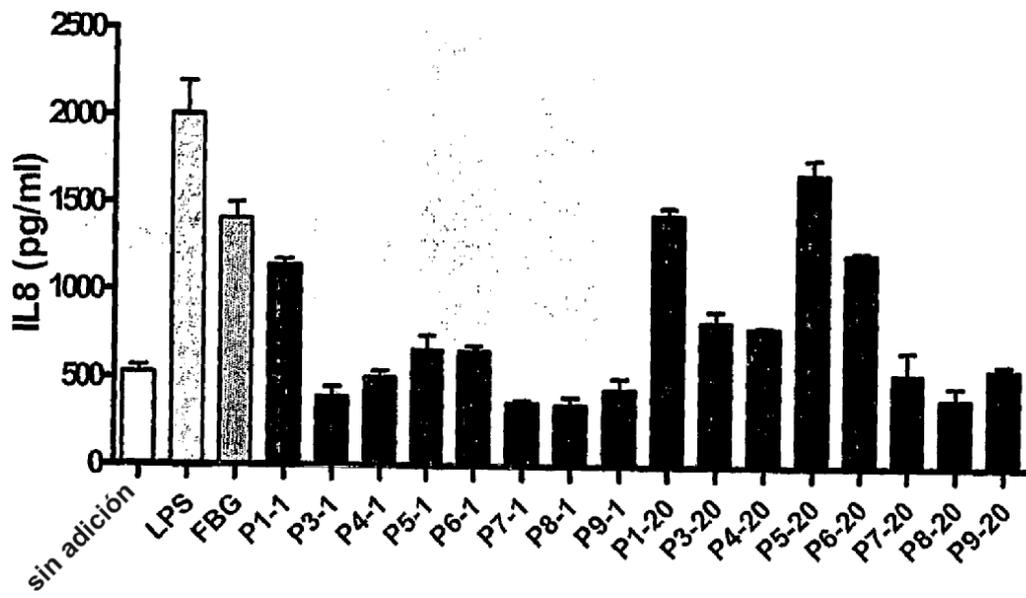


Figura 17

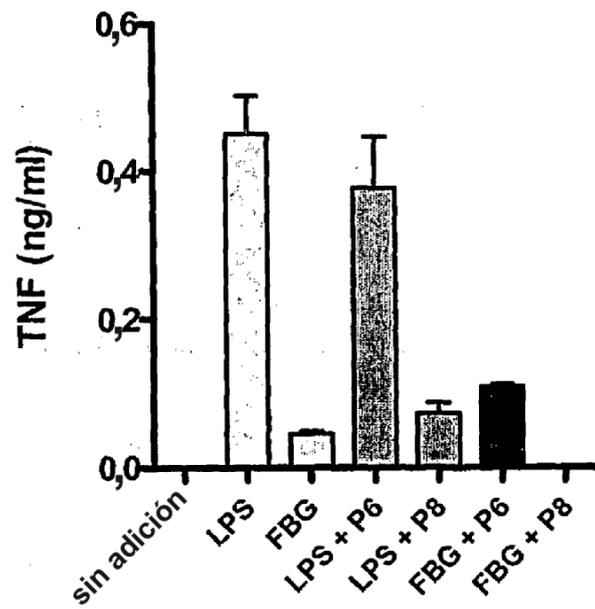
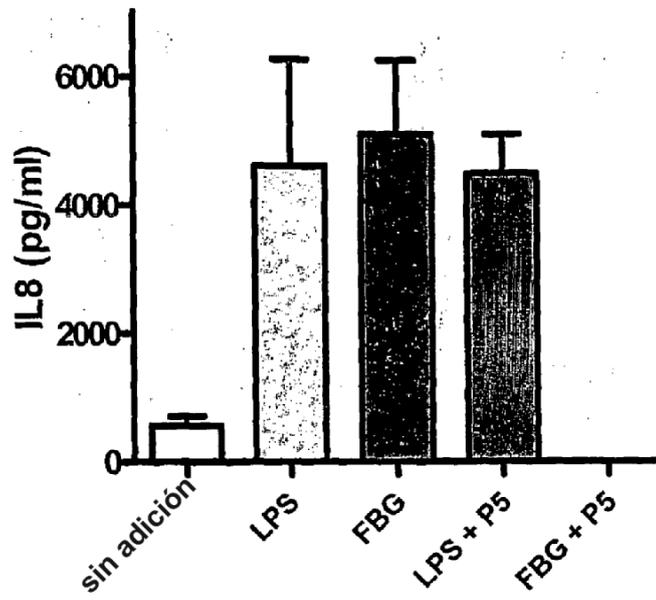


Figura 18

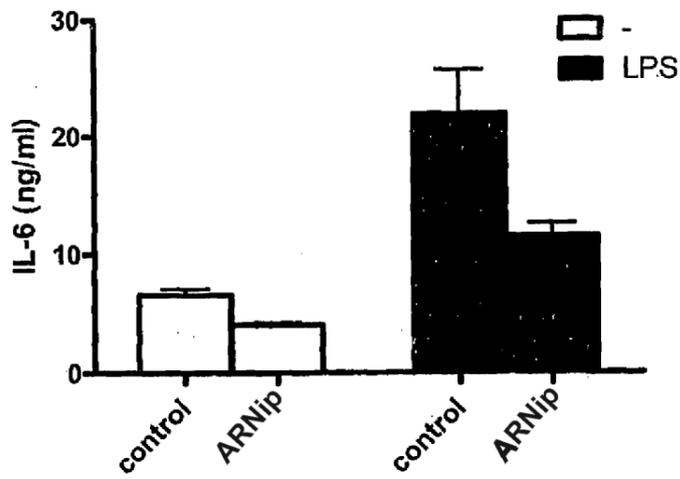
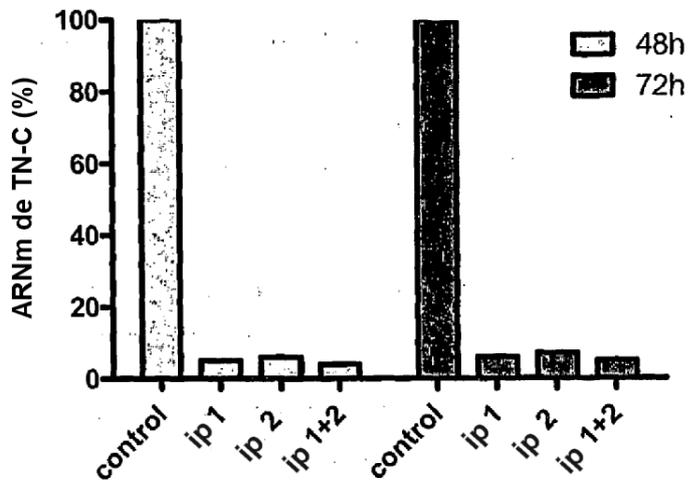


Figura 19