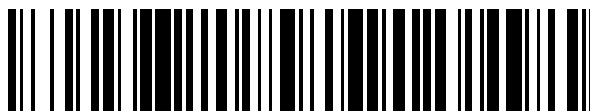


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 041**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2011 E 11764844 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2621948**

54 Título: **Anticuerpo que se une específicamente a la microvasculatura sinovial de pacientes con artritis**

30 Prioridad:

30.09.2010 GB 201016494

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

08.09.2016

73 Titular/es:

**QUEEN MARY & WESTFIELD COLLEGE,
UNIVERSITY OF LONDON (100.0%)
Mile End Road
London E1 4NS, GB**

72 Inventor/es:

PITZALIS, COSTANTINO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 582 041 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

Anticuerpo que se une específicamente a la microvasculatura sinovial de pacientes con artritis

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un polipéptido de unión a antígeno que se dirige especialmente a la microvasculatura sinovial de pacientes con artritis. El polipéptido, y conjugados del mismo, pueden usarse en la formación de imágenes de la vasculatura de articulaciones y para el diagnóstico y tratamiento de la artritis.

10

Antecedentes de la invención

La artritis reumatoide (AR) es una de las enfermedades autoinmunitarias más comunes y una causa principal de dolor crónico que solo en Europa afecta a más de tres millones de personas. La artritis reumatoide afecta del 1 al 2 % de la población. De acuerdo con los datos del *Medical Expenditure Panel Survey* (MEPS), en los Estados Unidos el coste total incurrido para el tratamiento de la artritis reumatoide y artritis relacionada en 2003 fue de 128 mil millones de dólares; el coste promedio persona es actualmente de 8.500 dólares. Cada año, la artritis y sus complicaciones asociadas ocasionan más de 750.000 hospitalizaciones y 36 millones de visitas ambulatorias. Hasta el 15 % de las personas afligidas por cualquier tipo de artritis padece una reducción en la cantidad de actividades físicas que pueden realizar. Típicamente, cuando la actividad física se reduce los pacientes tienden a desarrollar depresión debido a la ausencia de independencia y libertad.

En el Reino Unido (UK) hay aproximadamente 400.000 personas adultas con artritis reumatoide y la artritis es la afección más común para que las personas reciban *Disability Living Allowance* (prestación de subsistencia por discapacidad). Más del medio millón de personas recibe DLA (*Disability Living Allowance*) como resultado de la artritis (lo que representa más del 18 % de todos los solicitantes de DLA), que es más que el total combinado de cardiopatía, ictus, enfermedad respiratoria y cáncer.

La AR es una enfermedad inflamatoria de las articulaciones sinoviales, que generalmente afecta a las muñecas, dedos, rodillas, pies y tobillos de ambos lados del cuerpo. La AR causa inflamación de las membranas sinoviales que recubren y protegen las articulaciones y tendones, y permiten el movimiento uniforme y libre de las articulaciones. La inflamación de las membranas sinoviales causa inflamación de las articulaciones afectadas y eventualmente conduce a destrucción progresiva del cartílago y a desgaste de hueso, alterando el campo de acción del movimiento y conduciendo a deformidad.

La AR es actualmente, una enfermedad progresiva actual que también afecta a otros órganos del cuerpo y que puede dar como resultado una discapacidad profunda y complicaciones potencialmente mortales. Por tanto, la AR es una causa principal de discapacidad con una morbilidad y mortalidad significativas asociadas.

La edad de aparición de la AR es variable, variando desde niños a individuos con 90 años. La frecuencia de la AR en poblaciones de Europa occidental y en Estados Unidos es de aproximadamente el 1 % siendo la relación de mujeres con respecto a hombres de 3:1. Adicionalmente, el impacto económico anual total de la artritis reumatoide se estima en aproximadamente 35 billones de libras en Europa occidental.

A un nivel celular, la membrana sinovial está constituida por una matriz bien organizada que contiene agregados de proteoglicano, una red de capilares y vasos linfáticos y fibroblastos residentes y células similares a macrófagos. Sin embargo, en la AR, la membrana sinovial comienza a infiltrarse por células T auxiliares, células B, macrófagos y células plasmáticas. Además, la membrana sinovial se vuelve hiperplásica y localmente invasiva en la interfaz entre el cartílago y el hueso causando la destrucción del cartílago articular, hueso subcondral y tejido blando periarticular dando como resultado, a la larga, daño articular, deformidad y discapacidad profunda (véase la Figura 1).

Ahora está bien establecido que la angiogénesis (crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes) en la membrana sinovial tiene una contribución significativa con respecto a la etiología y progresión de esta enfermedad. De hecho, la angiogénesis sinovial puede preceder a otras características patológicas de AR dado que la hiper celularidad sinovial necesita un incremento compensatorio en el número y densidad de vasos sanguíneos sinoviales.

Los últimos objetivos del tratamiento de la artritis reumatoide son, la prevención del daño articular, prevención de la pérdida de función y disminución del dolor asociado con AR. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) son actualmente las formas principales de tratamiento para la AR, pero estos frecuentemente tienen efectos secundarios significativos. Los AINE pueden producir irritación de estómago, úlceras gastrointestinales y daño renal. Los efectos secundarios de los FARME dependen del tipo de fármaco que se utilice. La azatioprina aumenta el riesgo de infección, daño hepático, alopecia y diarrea. La ciclosporina produce daño renal, hipertensión y gingivitis. El grupo de la cloroquinina causa gastritis, diarrea y problemas en la vista. La sal de oro puede causar glositis, encías sangrantes, irritación de la piel y daño renal. El metotrexato puede causar daño hepático y supresión de la médula ósea. La sulfasalacina puede causar

molestias gastrointestinales y reacciones alérgicas. Los recientes modificadores de la respuesta biológica deprimen el sistema inmunitario y pueden causar reactivación de infecciones latentes como la tuberculosis.

5 La terapia para la AR ha mejorado significativamente en la última década por la introducción de anticuerpos recombinantes que se dirigen a una serie de citocinas, células T y B.

10 Desde la aprobación inicial de Etanercept, y poco después de Infliximab, se han autorizado tres anticuerpos neutralizantes de TNF adicionales (Adalimumab, Certulizumab pegol y Golimumab). Además, anticuerpos recombinantes que se dirigen a células T [y/o a células dendríticas], (Abatacept), a células B, (Rituximab), y el receptor de citocina IL-6, (Tocilizumab) también han sido autorizados por la FDA para el tratamiento de la AR (Taylor y Feldmann 2009 Nat Rev Rheumatol 5(10): 578-582), (Isaacs 2009 Arthritis Res Ther 11(3): 225).

15 KAMPERIDIS P S ET AL, 2007 ("Identification of single-chain antibody fragments specific for human synovial microvascular endothelium by *in vivo* phage display", ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, vol. 66, n.º Suplemento 1 (2007-03=01), páginas A12-A13: resumen 023) desvelan un método para aislar anticuerpos que se dirigen específicamente a la microvasculatura sinovial de sujetos humanos.

20 Sin embargo, a pesar del impacto obvio de las terapias actuales, no se ha obtenido remisión prolongada sin tratamiento. Una minoría consigue una respuesta clínica sostenida y de alta magnitud (Taylor y Feldmann 2009, mencionados anteriormente) y aproximadamente el 20-40 % de los pacientes no responde a terapia con anticitocinas (Kremer 2001 Annals of Internal Medicine 134 (8): 695-706). Además, las terapias actuales presentan diversos efectos secundarios asociados, tales como riesgos aumentados de infecciones y neoplasias malignas que hacen que su administración persistente no sea deseable (Taylor y Feldmann 2009, mencionados anteriormente).

25 Por lo tanto, sigue habiendo una importante necesidad clínica insatisfecha en la AR y se requieren opciones terapéuticas alternativas que tengan una mayor frecuencia de inducción de remisión y un perfil de seguridad mejorado con menos toxicidad sistémica.

30 Descripción de las Figuras

Figura 1 – Comparación de una articulación normal y de una articulación con artritis reumatoide
 En la articulación sana (a) la fina membrana sinovial reviste los aspectos de la articulación que no soportan peso. En la artritis reumatoide (b) la membrana sinovial se vuelve hiperplásica e infiltrada por células inflamatorias crónicas. Finalmente se desarrolla en paño sinovial ("pannus"), que migra sobre y hacia el interior del cartílago articular y hueso subyacente.

Figura 2 – Análisis inmunohistológico de reactividad *in vitro* del anticuerpo scFv A7 con tejido sinovial. La reactividad de scFv A7 con secciones de tejido sinovial se examinó usando scFv 7 biotinilado.

40 Figura 3 – Caracterización de la reactividad celular de scFv A7 dentro de la microvasculatura sinovial. La reactividad de scFv con componentes celulares de la microvasculatura sinovial se examinó mediante tinción doble de tejido sinovial humano congelado de pacientes con AR con marcadores específicos endoteliales, factor de von Willebrand (vWF) y CD 31 y el marcador específico de pericitos, NG2. La unión de scFv A7 se detectó a través de su etiqueta biotinilada usando anticuerpo avidina-rojo Texas. La unión de vWF, CD 31 y NG2 se detectó con Alexa 488 (color verde) o Alexa 594 (color rojo).

50 Figura 4 – Direccionamiento *in vivo* de tejido sinovial humano con I^{125} scFv A7. La capacidad de scFv para dirigirse preferencialmente a la microvasculatura de xenoinjertos sinoviales *in vivo* se examinó inyectando scFv yodado a ratones SCID portadores de xenoinjertos dobles de membrana sinovial y piel. Se examinó tejido injertado 4 horas y 24 horas después de la administración del anticuerpo para recuento γ . Los resultados se corrigieron posteriormente con respecto al peso tisular y a la radioactividad de fondo en el conjunto sanguíneo y tejido expresado con respecto a la proporción de sangre del porcentaje de la dosis inyectada. N = 5 para cada condición. Como control negativo se usó scFv HEL yodado.

55 Figura 5 – Perfil de expresión de reactividad de clones de scFv A7 con tejido humano normal evaluado por inmunohistoquímica.

60 Se examinó la reactividad de scFv A7 con tejido humano normal usando micromatrices tisulares incluidas en parafina de tejido humano normal de diversos órganos. El anticuerpo scFv A7 biotinilado unido se detectó a través de avidina conjugada con HRP (color marrón). Para detectar la presencia de vasos sanguíneos en las secciones tisulares se usó el anti factor von Willebrand. Barra de escala = 20 μ m.

Figura 6 – Secuencias de aminoácidos de CDR2 y CDR3 de las cadenas pesada y ligera de scFv A7
 Los dominios de aminoácidos variables se muestran en rojo. Todos los clones de anticuerpos presentes en la biblioteca varían únicamente en estas posiciones y son de otro modo idénticos.

Figura 7 – Secuencia de scFv A7

(A) Diagrama esquemático de scFv A7. (B) Secuencia de ADN de scFv A7. (C) Secuencia de aminoácidos prevista de scFv A7. La secuencia enlazadora peptídica (color rojo) y las secuencias de las regiones CDR (color marrón) se han resaltado.

5 Figura 8 – Inmunohistoquímica de scFv A7 en tejidos humanos normales
 Reactividad de scFv A7 con tejido sinovial humano normal. Secciones secuenciales muestran vasos sanguíneos que se tiñen con vWF y α -actina. No se observa reactividad usando anticuerpo scFv A7. Las imágenes mostradas son representativas de las 11 muestras examinadas independientes. Barra de escala = 50 μ m.

10 A: vWF
 B: α -Actina
 C: scFv A7

15 Figura 9 – Reactividad del anticuerpo scFv A7 con la microvasculatura de tejidos inflamatorios.
 Se evaluó la reactividad de scFv A7 con colon normal, colon con enfermedad de Crohn, piel normal y piel soriásica. La presencia de microvasculatura se visualizó usando anticuerpo anti vWF humano. El scFv A7 biotinilado se detectó con ABC-HRP. La reactividad del anticuerpo vWF se detectó usando un anticuerpo secundario marcado con HRP. Las imágenes mostradas son representativas de las 5 muestras de colon normal, 7 muestras de colon con enfermedad de Crohn y 5 muestras de piel examinadas. Barra de escala = 100 μ m.

20 Figura 10 – Reactividad de scFv A7 con células PC3
 Se usó inmunohistoquímica para examinar la reactividad de scFv A7 con la superficie celular de la línea celular de cáncer de próstata PC3. La reactividad con la superficie celular se examinó usando formaldehído fijado pero sin células permeabilizadas. La unión de scFv A7 se detectó a través de su etiqueta Myc usando anticuerpo anti c-Myc seguido de Alexa 488.

Sumario de aspectos de la invención

30 Los autores de la presente invención han identificado un anticuerpo scFv que exhibe reactividad peri vascular con la microvasculatura del tejido sinovial de pacientes con AR, con poca o ninguna reactividad con tejido normal.

En un primer aspecto la presente invención proporciona un polipéptido de unión a antígeno que se dirige específicamente a la microvasculatura sinovial de pacientes con artritis y que comprende:

35 (i) una secuencia VH como se muestra en la SEQ ID NO. 9 o una variante de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 %; y
 (ii) una secuencia VL como se muestra en la SEQ ID NO. 10 o una variante de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 %.

40 El polipéptido de unión a antígeno puede comprender una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a 4.

45 El polipéptido de unión a antígeno puede comprender una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO 5 a 8.

El polipéptido de unión a antígeno puede reaccionar con el compartimento estromal de la microvasculatura y/o con pericitos y puede exhibir reactividad perivascular.

50 El polipéptido de unión a antígeno puede comprender una secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO. 9 y/o una secuencia VL como se muestra en la SEQ ID NO. 10.

El polipéptido de unión a antígeno puede ser un scFv.

55 El polipéptido de unión a antígeno puede ser completamente humano.

El polipéptido de unión a antígeno puede dirigirse específicamente a la microvasculatura sinovial de pacientes con artrosis y/o artritis reumatoide.

60 El polipéptido de unión a antígeno puede asociarse con otro agente. El polipéptido de unión a antígeno puede conjugarse, por ejemplo, con el otro agente. El agente puede comprender uno o más de lo siguiente: una citocina terapéutica, un agente antiangiogénico, un fármaco antirreumático; un agente fotosensible o una nanopartícula magnética.

65 La presente invención también proporciona un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la invención o un conjugado del mismo, para su uso en el tratamiento de AR; para su uso en la formación de imágenes de la vasculatura de articulaciones y/o para su uso en el diagnóstico, monitorización o pronóstico de

artritis.

El polipéptido de unión a antígeno puede usarse en un tratamiento que comprende las siguientes etapas:

- 5 (i) administración a un sujeto de un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la invención, conjugado con un agente fotosensible;
(ii) direccionamiento del conjugado a la vasculatura sinovial de una articulación;
(ii) aplicación de luz a la articulación para activar el agente fotosensible dentro de la vasculatura sinovial.

10 El polipéptido de unión a antígeno puede usarse en un tratamiento que comprende las siguientes etapas:

- (i) administración a un sujeto de un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la invención, conjugado con nanopartículas magnéticas;
(ii) direccionamiento del conjugado a la vasculatura sinovial de una articulación;
15 (ii) aplicación de un campo magnético a la articulación para activar las nanopartículas magnéticas dentro de la vasculatura sinovial.

En dichos métodos, la activación del agente puede conducir a la alteración de la vasculatura existente.

20 El método de tratamiento puede ser un método de combinación, que implica el uso simultáneo, individual o secuencial de otro agente terapéutico. Por ejemplo, el tratamiento también puede implicar la administración de agentes terapéuticos bloqueantes de TNF- α .

El método de tratamiento puede ser para el tratamiento de la artrosis y/o artritis reumatoide.

25 En un tercer aspecto la presente invención proporciona un método *in vitro* para la producción de un agente que, cuando se administra a un paciente, se dirige a la microvasculatura sinovial, cuyo método *in vitro* comprende la etapa de conjugar el agente con un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Cuando el agente/ polipéptido de unión a antígeno se administra a un paciente con artritis, el agente
30 puede acumularse selectivamente en sitios neovasculares.

El agente puede ser un agente terapéutico, un agente formador de imágenes o de diagnóstico. Por ejemplo, el agente puede ser una citocina terapéutica, un agente antiangiogénico, un fármaco antirreumático, un agente fotosensible o una nanopartícula magnética.

35 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la invención o un conjugado del mismo.

40 La secuencia de ácido nucleico puede comprender la secuencia mostrada como SEQ ID NO 12 o una variante de la misma.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención.

45 En un sexto aspecto, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención o un vector de acuerdo con el quinto aspecto de la invención.

El polipéptido de unión a anticuerpo de la presente invención representa una herramienta única, que sirve como un agente de direccionamiento vascular versátil que puede usarse, por ejemplo, en compuestos biofarmacéuticos selectivos para el tratamiento de la enfermedad reumatoide.

50 El polipéptido de unión a antígeno de la presente invención responde a muchos de los problemas asociados con terapias de anticuerpos recombinantes existentes para el tratamiento de la artritis. Por ejemplo, debido al hecho de que el polipéptido exhibe reactividad perivascular dentro del tejido sinovial sin reactividad significativa con tejido normal, este puede usarse para suministrar una concentración más alta de fármacos convencionales o biológicos al lugar de la enfermedad.

Descripción detallada

60 POLIPÉPTIDO DE UNIÓN A ANTÍGENO

El primer aspecto de la invención se refiere a un polipéptido de unión a antígeno.

65 La expresión "polipéptido de unión a antígeno" se usa para referirse a un polipéptido que comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y que se une a un antígeno de la misma manera que un anticuerpo o una molécula similar a un anticuerpo.

Una molécula de anticuerpo clásica comprende cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (H, *heavy*); y dos cadenas ligeras (L, *light*) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena está constituida por una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está constituida por tres dominios CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está constituida por una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está constituida por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementareidad (CDR) intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR, *framework*). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

En una molécula de anticuerpo clásica, el emparejamiento de las cadenas pesada y ligera une entre sí las CDR de cada cadena para crear una sola superficie hipervariable que forma el sitio de unión con el antígeno en el extremo de cada uno de los brazos Fab. Esto es común solo para un subconjunto de las seis CDR totales que contribuye a la unión antigénica. Por ejemplo cuando el anticuerpo MOPC 603 se une a fosfocloro la región variable de cadena ligera solo contribuye al sitio de unión con CDR3, mientras que las tres CDR de la cadena pesada están implicadas.

El polipéptido de unión a antígeno puede comprender 2, 3, o 4 CDR del grupo mostrado como SEQ ID NO: 1-4.

También es posible que una sola cadena VH o VL se una al antígeno, por ejemplo, en anticuerpos de dominio (dAb – véase más adelante). El polipéptido de unión a antígeno puede comprender tanto las CDR VH (SEQ ID NO: 1 y 2) y/o como las CDR VL (SEQ ID NO: 3 y 4).

El término “anticuerpo” incluye anticuerpos intactos, fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')₂ y anticuerpos y fragmentos intactos en los que se han producido mutaciones bien en su región constante y/o en su región variable (por ejemplo, mutaciones que producen anticuerpos quiméricos, parcialmente humanizados o completamente humanizados, así como anticuerpos que tengan un rasgo deseado, por ejemplo, unión potenciada a IL 13 y/o unión reducida a FcR).

El término “fragmento” se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos restos de aminoácidos que un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Pueden obtenerse fragmentos mediante tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. También pueden obtenerse fragmentos por medios recombinantes. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fd, dAb, Fv, cadenas sencillas, anticuerpos monocatenarios, por ejemplo, scFv, anticuerpos de un solo dominio (Muldermans *et al.*, 2001 J Biotechnol. 26: 230-5), y una región determinante de la complementareidad (CDR) aislada.

Un fragmento Fab es un fragmento monovalente que consta de los dominios VL, VH, CL y CH1. Un fragmento F(ab')₂ es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente de disulfuro en la región bisagra. Un fragmento Fab consta de los dominios VH y CH 1, y un fragmento Fv consta de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo.

Un fragmento dAb consta de un solo dominio VH o dominio VL que puede unirse en solitario a un anticuerpo (documentos WO 90/05144; WO 03/002609). También se incluyen otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica pero usando un enlazador que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, obligando de este modo a que los dominios se emparejen con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión antigénica (véase, por ejemplo, Holliger, *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444- 6448).

El polipéptido de unión a antígeno descrito en los ejemplos es un fragmento scFv. En una molécula de anticuerpo clásica, los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes distintos. Sin embargo pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que los permite formar una sola cadena proteica conocida como Fv monocatenario (scFv) en el que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (Bird *et al.*, 1988, Science 242: 423-426).

Las moléculas similares a anticuerpos incluyen el uso de las CDR por separado o en combinación en moléculas sintéticas tales como SMIP y miméticos de anticuerpos pequeños. Las regiones determinantes de especificidad (SDR) son restos dentro de las CDR que interaccionan directamente con el antígeno. Las SDR corresponden a restos hipervariables. Véase (Padlan *et al.* (1995) FASEB J. 9: 133-139). Las CDR también pueden utilizarse en miméticos de anticuerpos pequeños, que comprenden dos regiones CDR y una región marco conservada (Qui *et al.* Nature Biotechnology Vol 25; 921-929; agosto 2007).

Un anticuerpo o parte de unión del mismo también puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión más grande formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o parte del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos distintos. Los ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región núcleo de

El polipéptido de unión a antígeno comprende una región VH como se muestra en la SEQ ID NO. 9 o una variante de la misma que tiene, por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 95 o 99 %.

SEQ ID NO 9:

5

MAEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIY
TSGNSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNASNFYDW
GQGT LVTV

El polipéptido de unión a antígeno comprende una región VL como se muestra en la SEQ ID NO. 10 o una variante de la misma que tiene, por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 95 o 99 %.

10

SEQ ID NO 10:

TDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTCRASQSIS SYLNWYQQKPGKAPKLLIYSASNLQS
GVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGSDAPATFGQGTKVEIKRAAA

15

Para ambas regiones VH y VL, las variaciones en la secuencia pueden concentrarse en las regiones marco conservadas del polipéptido (es decir aquellas partes mostradas en negrita en la Figura 7B). Las CDR (que corresponden a las partes mostradas en color marrón) pueden comprender relativamente pocas sustituciones de aminoácidos. Las CDR solo deben comprender sustituciones en las posiciones correspondientes a las mostradas en rojo en la Figura 9, es decir, las representadas por el aminoácido X en las SEQ ID NO 1-4 y no en las otras posiciones CDR (las mostradas en negrita en la Figura 6).

20

SCFV

El polipéptido de unión a antígeno puede ser un scFv que tiene una secuencia mostrada como SEQ ID NO 11 o una variante de la misma que tiene, por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 70, 80, 90, 95 o 99 %.

25

SEQ ID NO 11:

MAEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIY
TSGNSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNASNFYDW
GQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTCRASQSIS
SYLNWYQQKPGKAPKLLIYSASNLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYC
QQGSDAPATFGQGTKVEIKRAAA

30

De nuevo, las variaciones en la secuencia pueden concentrarse en las regiones marco conservadas y en la región enlazadora del polipéptido (es decir las partes mostradas en negrita y en rojo respectivamente en la Figura 7B). Las CDR (correspondientes a las partes mostradas en marrón) pueden comprender relativamente pocas sustituciones de aminoácidos. Las CDR pueden comprender solo sustituciones en las posiciones correspondientes a las mostradas en rojo en la Figura 6, es decir, las representadas por el aminoácido X en las SEQ ID NO 1-4.

35

COMPARACIONES DE SECUENCIAS

40

Las comparaciones de identidad pueden realizarse visualmente, o más normalmente, usando programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles en el comercio pueden calcular el % de identidad entre dos o más secuencias. Un programa informático adecuado para realizar dicho alineamiento es el paquete GCG (*Genetic Computer Center*) Bestfit de Wisconsin (Universidad de Wisconsin, Estados Unidos; Devereux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Research* 12: 387). Los ejemplos de otros programas informáticos que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete BLAST (véase Ausubel *et al.*, 1999 citado anteriormente – capítulo 18), FASTA (Atschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.*, 403-410) y la serie GENEWORKS de herramientas de comparación. Tanto BLAST como FASTA se encuentran disponibles en búsquedas fuera de línea (*offline*) y en línea (*online*) (véase Ausubel *et al.*, 1999 citados anteriormente, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere el uso del programa GCG Bestfit. También se dispone de una nueva herramienta, denominada BLAST 2 Sequences, para la comparación de secuencias de proteínas y nucleótidos (véase FEMS *Microbiol Lett* 1999 174 (2): 247-50; FEMS *Microbiol Lett* 1999 177 (1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

50

- La secuencia puede tener una o más deleciones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y da como resultado una molécula funcionalmente equivalente. Pueden realizarse sustituciones deliberadas de aminoácidos en función de la similitud en cuanto a polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o a la naturaleza anfipática de los restos siempre que se conserve la actividad.
- 5 Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polar no cargados que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparragina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina, y tirosina.
- 10 Pueden realizarse sustituciones conservativas, por ejemplo, de acuerdo con la siguiente Tabla. Los aminoácidos que están en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

ALIFÁTICOS	No polares	G A P
		I L V
	Polares - sin carga	C S T M
		N Q
	Polares - con carga	D E
		K R
AROMÁTICOS		H F W Y

15 ANTICUERPO HUMANO

El polipéptido de unión a antígeno puede ser no humano, quimérico, humanizado o completamente humano.

- 20 Los anticuerpos no humanos incluyen preparaciones de anticuerpos policlonales o monoclonales de ratón, rata, conejo, oveja, cabra y otros mamíferos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo derivado de una población clonal de células productoras de anticuerpos (por ejemplo, linfocitos B o células B) que es homogénea en cuanto a estructura y especificidad antigénica. La expresión "anticuerpo policlonal" se refiere a una pluralidad de anticuerpos que se originan a partir de diferentes poblaciones de clones de células productoras de anticuerpos que son heterogéneas en cuanto a su estructura y especificidad epitópica pero que reconocen un antígeno común. Inmunizando a un animal con un antígeno puede obtenerse una preparación en bruto de anticuerpo policlonal.

- 30 Los anticuerpos quiméricos comprenden secuencias de al menos dos especies diferentes. Como un ejemplo, pueden usarse técnicas de clonación recombinantes para incluir regiones variables, que contengan los sitios de unión antigénica, de un anticuerpo no humano (es decir, un anticuerpo preparado en una especie no humana inmunizada con el antígeno) y regiones constantes derivadas de una inmunoglobulina humana.

35 El polipéptido de unión a antígeno puede ser humanizado.

- Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como un ratón, rata, conejo o primate no humano que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los restos FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente el anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana.

- 50 El polipéptido de unión a antígeno puede ser completamente humano, como es el caso del scFv descrito en los Ejemplos.

La expresión "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que corresponden a secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana, como las que describen Kabat *et al.* (Véase Kabat, *et al.* (1991) Sequences of proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human

Services, Publicación NIH No. 91-3242). Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo mutaciones introducidas por mutagénesis al azar o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y en particular en la CDR3. Las mutaciones pueden introducirse, por ejemplo, usando una estrategia de mutagénesis selectiva. Un anticuerpo humano puede tener al menos una posición reemplazada por un resto de aminoácido, por ejemplo, un resto de aminoácido que potencie la actividad, que no está codificado por la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Un anticuerpo humano puede tener algunos cambios de aminoácidos dentro de las regiones CDR. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano" como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que se hayan injertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias marco conservadas humanas.

Es probable que los anticuerpos recombinantes completamente humanos sean considerablemente menos inmunogénicos que los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos), quiméricos o humanizados, cuando se usan para terapia ya que, efectivamente, no comprenden secuencias extrañas.

REACTIVIDAD

El polipéptido de unión a antígeno de la presente invención se dirige específicamente a la microvasculatura de pacientes con artritis. Por ejemplo, el polipéptido de unión a antígeno puede dirigirse a la microvasculatura de pacientes con artrosis o artritis reumatoide (AR).

Como se muestra en la Figura 1, en una articulación normal, la membrana sinovial reviste los aspectos de la articulación que no soportan peso. En la artritis, la membrana sinovial comienza a infiltrarse por células T auxiliares, células B, macrófagos y células plasmáticas. La angiogénesis extensiva se produce en la membrana sinovial, aumentando significativamente la microvasculatura. El polipéptido de unión a antígeno de la presente invención exhibe reactividad específica con esta microvasculatura sinovial.

El polipéptido de unión a antígeno puede reaccionar con el compartimento estromal (es decir, tejido conectivo) de la microvasculatura. El compartimento estromal de la microvasculatura es atractivo para aplicaciones de direccionamiento basadas en anticuerpos, dado que el compartimento es estable y está presente en abundancia.

El polipéptido de unión a antígeno puede reaccionar con pericitos. Los pericitos, también conocidos como células de Rouget o células murales, están asociados en la superficie abluminal con todos los capilares vasculares y vénulas postcapilares. La especificidad de los pericitos puede investigarse por tinción doble con un marcador específico de pericitos, tal como NG2, como se describe en los Ejemplos.

El polipéptido de unión a antígeno puede unirse a la superficie celular de las células de la musculatura lisa encontradas en la microvasculatura sinovial.

El polipéptido de unión a antígeno puede exhibir reactividad perivascular, es decir, puede unirse preferencialmente a sitios alrededor de los vasos sanguíneos dentro de la microvasculatura sinovial. El polipéptido de unión a antígeno de la presente invención "se dirige específicamente" a la microvasculatura sinovial de pacientes con artritis en el sentido de que, después de la administración a un paciente, el polipéptido de unión a antígeno exhibe una capacidad de unión preferencial con la membrana sinovial, a diferencia de otros tejidos (por ejemplo piel). El polipéptido de unión a antígeno puede exhibir una capacidad de unión preferencial de dos, tres o cuatro veces, para la membrana sinovial artrítica con otros tejidos.

El polipéptido de unión a anticuerpo de la presente invención no debe exhibir reactividad significativa con órganos vitales, tales como corazón, hígado, pulmón, páncreas, corteza cerebral y sistema digestivo.

El polipéptido de unión a anticuerpo de la presente invención no debe exhibir reactividad significativa con tejido normal tal como tejido linfático, timo, glándula adrenal, ovario y testículo.

El polipéptido de unión a anticuerpo de la presente invención no debe dirigirse significativamente a articulaciones normales, no artríticas. Por ejemplo, cuando se administra a un paciente con artritis que tiene una combinación de articulaciones artríticas y normales, el polipéptido de unión a anticuerpo debe dirigirse preferencialmente a las articulaciones artríticas. El polipéptido de unión a anticuerpo puede dirigirse y/o acumularse preferencialmente en las articulaciones que muestran la cantidad más alta de angiogénesis sinovial.

Se considera que la reactividad y/o el direccionamiento son "significativos" si representa un producto de diagnóstico basado en el polipéptido de unión a anticuerpo inadecuado para su uso debido a niveles altos de fondo, o representa un producto terapéutico basado en el polipéptido de unión a antígeno no seguro o ineficaz para su uso debido a bajos niveles de especificidad.

COMPLEJO/ CONJUGADO

El polipéptido de unión a antígeno puede asociarse con otro agente para su uso en el diagnóstico y/o tratamiento de enfermedad reumatoide o formación de imágenes en la vasculatura de articulaciones.

5 La asociación es tal que, cuando el complejo polipéptido de unión a antígeno/agente se administra a un sujeto artrítico, el agente se dirige a la microvasculatura sinovial en virtud de su asociación con el polipéptido de unión a antígeno.

10 El agente puede ser parte de un nanotransportador, tal como una nanopartícula o un liposoma, o incluirse en el mismo. El nanotransportador puede asociarse con, por ejemplo, revestirse con el polipéptido de unión a antígeno (Petros y DeSimone 2010 Nature Reviews Drug Discovery 9, p 615-627; Torchilin The AAPS Journal 2007; 9 (2) p 129-1470).

15 Como alternativa, el polipéptido de unión a antígeno puede conjugarse con uno o más agentes. En el campo técnico se conocen técnicas de conjugación de proteínas. Por ejemplo, el polipéptido de unión a antígeno y un agente pueden ligarse mediante un enlazador, generalmente un enlazador flexible (tal como una cadena polipeptídica) o mediante un grupo de enlace químico.

20 El polipéptido de unión a antígeno y el agente pueden estar codificados por una sola secuencia de ácido nucleico y expresarse conjuntamente como una proteína de fusión. Como alternativa, el polipéptido de unión a antígeno y el agente pueden expresarse por separado y posteriormente ligarse entre sí, por ejemplo, usando agentes de enlace químico.

25 Cuando el agente es en sí mismo un anticuerpo o parte del mismo, el polipéptido de unión a antígeno de la invención y el agente pueden asociarse como un ligando específico doble, tal como un anticuerpo bifuncional. El agente puede basarse, por ejemplo, en un anticuerpo normalmente usado para el tratamiento de la AR, tal como Adalimumab, Certalizumab pegol, Golimumab, Abatacept, Rituximab o Tocilizumab.

30 El agente puede ser uno o más de los siguientes: una citocina terapéutica, un agente antiangiogénico, un fármaco antirreumático, un agente fotosensible o una nanopartícula magnética.

El agente puede tener la capacidad de bloquear una o más citocinas. Por ejemplo, el agente puede tener la capacidad de bloquear TNF α , IL-1, IL-6, IL-15, IL-12/23, IL-17, IL-18, IL-27 o IL-32.

35 El agente puede interactuar con la citocina directamente o con su receptor (por ejemplo siendo un agonista de receptor de citocina).

40 Los agentes antiangiogénicos actúan bloqueando el crecimiento de vasos sanguíneos de una de las tres maneras siguientes: (i) bloqueando que el factor de crecimiento alcance la célula; (ii) bloqueando la señalización dentro de la célula; (iii) interfiriendo con la señalización entre células.

45 El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es responsable del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Promueve su crecimiento estimulando las células endoteliales que forman las paredes de los vasos y transportan nutrientes y oxígeno a los tejidos. El bloqueo del VEGF, inhibe por tanto el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Bevacizumab (Avastin) es un anticuerpo terapéutico monoclonal aprobado clínicamente que bloquea el VEGF.

Otros tratamientos bloquean la señalización intracelular dentro de las células endoteliales, lo que podría de otro modo conducir a angiogénesis. Un tipo de fármaco tal son los inhibidores de tirosina quinasa (TKI) tal como Sunitinib (Sutent).

50 Otro tratamiento que afecta a la formación de vasos sanguíneos es la talidomina, que interfiere con la señalización celular. La lenalidomida (Revlimid) es un fármaco de talidomida desarrollado que tiene pocos efectos secundarios.

55 Las clases principales de fármacos antirreumáticos incluyen: fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE); corticosteroides; fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (FARME); fármacos antirreumáticos de acción lenta (FARAL); y fármacos citotóxicos inmunosupresores.

60 Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) aportan alivio sintomático tanto de inflamación como del dolor, pero tienen un efecto limitado sobre la pérdida progresiva de hueso y cartilago asociada con la artritis reumatoide. Actúan disminuyendo la producción de prostaglandinas en el organismo. Los AINE comunes incluyen: ibuprofeno (Motrin, Nuprin o Advil), naproxeno (Naprosyn, Aleve) e indometacina (Indocin).

65 Los corticoesteroides son agentes antiinflamatorios muy fuertes. Son los análogos sintéticos de la cortisona, producida por el organismo. Los corticoesteroides se usan para reducir la inflamación y suprimir la actividad del sistema inmunitario. La prednisona y la dexametasona son lo que se recetan más habitualmente.

Los fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (FARME) influyen sobre el propio proceso de la

enfermedad en lugar de solo sobre los síntomas del tratamiento. Los FARME también tienen efectos antiinflamatorios y la mayoría derivaron del tratamiento de otras enfermedades, tales como cáncer y malaria. Los FARME antimaláricos incluyen cloroquina (Aralen) e hidroxiclороquina (Plaquenil). Los FARME fuertes incluyen: metotrexato (Rheumatrex), sulfasalazina, ciclosporina, azatioprina (Imuran) y ciclofosfamida (Cytosan), azatioprina, sulfasalazina, penicilamina, y compuestos de oro orgánico tales como aurotioglucosa (Solganol), tiomalato sódico de oro (Aurolate) y auranofina (Ridaura).

Los fármacos antirreumáticos de acción lenta (FARAL) son una clase especial de FARME y el efecto de estos fármacos es una acción lenta y no tan rápidamente aparente como la de los AINE. Los ejemplos son hidroxiclороquina y aurotioglucosa.

Si el tratamiento con AINE y FARAL no tienen efecto pueden usarse fármacos citotóxicos inmunosupresores. Los fármacos inmunosupresores tienen un efecto estabilizante sobre el sistema inmunitario. Dado que la inflamación asociada con la artritis crónica se debe a un funcionamiento incorrecto del sistema inmunitario, se ha mostrado que el uso de esta clase de fármacos es beneficioso también para el tratamiento de la artritis reumatoide. Son ejemplos: metotrexato, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo y azatioprina.

El agente puede ser una enzima, tal como una enzima activadora de profármacos.

Un agente fotosensible es uno que, cuando está presente en la membrana sinovial y se activa con luz, causa la alteración de la vasculatura existente. En la técnica se conocen ejemplos de dicho agente, tales como los que se describen en Dolmans *et al* Nature Reviews Cancer 2003, 3, 380-387; Huang, Technol Cancer Res Treat. 2005, 4 (3): 283-293; Hendrich *et al* Knee Surg, Sports Traumatol, Arthrosc (2000) 8:190-194.

Los fotosensibilizadores son moléculas que, con radiación y en presencia de oxígeno, liberan agentes difusibles tóxicos tales como oxígeno singlete o radicales reactivos. El fragmento de anticuerpo scFv(L19) anti-ED-B se localiza selectivamente en vasos sanguíneos recién formados en un modelo de conejo de angiogénesis ocular. Cuando se acopla químicamente a un fotosensibilizador y se irradia con luz roja, este inmunoconjugado actúa como mediador en la oclusión completa y selectiva de la neovascularización ocular y promueve la apoptosis de las células endoteliales correspondientes. Los fotosensibilizadores ya se están utilizando en centros médicos para la terapia fotodinámica de determinadas formas de degeneración macular relacionada con la edad.

El agente puede ser, o puede comprender, una nanopartícula magnética. Cuando el agente se activa mediante un campo magnético, puede tener la capacidad de alterar la microvasculatura sinovial existente. En la técnica se conocen nanopartículas magnéticas adecuadas, tales como las descritas en Vigor *et al* Biomaterials. Feb. 2010; 31 (6): 1307-15.

La presente invención también proporciona un complejo, tal como un conjugado, que comprende un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la invención y un agente.

El complejo puede ser para uso terapéutico y/o diagnóstico.

SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO

La presente invención también proporciona una secuencia de nucleótidos con capacidad de codificar un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con la presente invención o un conjugado del mismo.

La secuencia de ácido nucleico puede comprender toda o parte de la secuencia mostrada como SEQ ID NO 12 o una variante de la misma, que tiene una identidad de secuencia de al menos 70, 80, 90, 95 o 99 %.

SEQ ID NO. 12

```
GCAGCCAGCCGCCATGGCCGAGGTCCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG
GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCC
AGGCTCCTGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTTATACTAGTGGTAATTCTACATCTTACGCAG
ACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGGCTGTATCTGCAAAATGAAC
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATAITACTGTGCGAAAAATGCTAGTAATTTGACTACTGGGGC
CAGGAAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTACGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTG
GCGGGTCCGACGGACATCCAGATGACCCAGTCTOCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG
AGTCCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAAITGGTATCAGCAGAAAC
CAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATTCTGCA1CCAATTTGCAAAAGTGGGGTCCCATCAAGG
TTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTT
TGCAACTTACTACTGTCAACAGGGTTCTGATGCTCCTGCTACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGG
AAATCAAACGGGCGGCCGCA
```

La secuencia de nucleótidos puede ser natural, sintética o recombinante. Puede ser mono o bicatenaria, puede ser ADN o ARN o combinaciones de los mismos. También puede ser, por ejemplo, ADNc, productos de PCR, una secuencia genómica o ARNm.

- 5 La secuencia de nucleótidos puede estar optimizada por codones para la producción en el hospedador/célula hospedadora de elección.

Puede estar aislada, o formar parte de un plásmido, un vector o una célula hospedadora.

- 10 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse comparando una posición en cada secuencia que puede alinearse con fines comparativos. La expresión tal como un porcentaje de identidad se refiere a una función del número de ácidos nucleicos idénticos en posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Pueden utilizarse diversos algoritmos y/o programas de alineamiento, incluyendo FASTA, BLAST o ENTREZ. FASTA y BLAST se encuentran disponibles como parte del paquete de análisis de secuencias GCG (University of Wisconsin, Madison, WIs.), y puede usarse, por ejemplo, con parámetros por defecto. ENTREZ está disponible a través del National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md. El porcentaje de identidad de dos secuencias puede determinarse mediante el programa GCG con un peso por hueco de 1, por ejemplo, cada hueco se pondera como si fuera un emparejamiento erróneo de un solo nucleótido entre las dos secuencias.

- 20 La secuencia variante puede comprender una o más sustituciones, inserciones o deleciones de nucleótidos. Las inserciones y deleciones pueden ser de tal manera que, en general, la mayor parte de la secuencia codificante este "en fase" con referencia a la SEQ ID NO. 12. Las sustituciones de nucleótidos pueden ser "silenciosas", de tal manera que, debido a la degeneración del código genético, el codón codifica el mismo aminoácido.

- 25 Cuando las sustituciones de nucleótidos causan un cambio en la secuencia de aminoácidos codificada, estas pueden concentrarse en las regiones marco conservadas y en la región enlazadora del polipéptido (es decir, las partes mostradas en negrita y en rojo respectivamente en la Figura 7B). Las regiones que codifican las CDR (correspondientes a las partes mostradas en color marrón en la Figura 7B) pueden comprender relativamente pocas mutaciones. Las regiones que codifican las CDR deben comprender solo mutaciones que afecten a los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las mostradas en rojo en la Figura 6, es decir, las representadas por el aminoácido X en las SEQ ID NO 1-4, y no en los otros restos de la CDR.

VECTOR

- 35 El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico con capacidad de transportar otro ácido nucleico con el que se ha ligado. Un tipo de vector es un episoma, es decir, un ácido nucleico con capacidad de replicación extracromosómica. Otro tipo de vector es un vector integrativo que se diseña para recombinar con el material genético de una célula hospedadora. Los vectores pueden ser tanto integrativos como tener capacidad de replicación autónoma, y las propiedades de un vector pueden diferir dependiendo del contexto celular (es decir, un vector puede replicarse de manera autónoma en un tipo de célula hospedadora y puede ser puramente integrativo en otro tipo de célula hospedadora). Los vectores con capacidad de dirigir la expresión de ácidos nucleicos que pueden expresarse, con los que están unidos operativamente, se denominan "vectores de expresión".

- 45 Un plásmido es una molécula de ADN extracromosómica separada del ADN cromosómico que tiene la capacidad de replicarse de manera independiente del ADN cromosómico. Normalmente, los plásmidos son circulares y bicatenarios.

- 50 Los plásmidos pueden usarse para expresar una proteína en una célula hospedadora. Por ejemplo, una célula hospedadora bacteriana puede transfectarse con un plásmido con capacidad de codificar una proteína particular, para expresar esa proteína. El término también incluye cromosomas artificiales de levaduras y cromosomas artificiales de bacterias, que tienen la capacidad de albergar partes más largas de ADN.

CÉLULA HOSPEDADORA

- 55 La presente invención proporciona adicionalmente células y líneas celulares con capacidad de producir los polipéptidos de unión a antígeno de la invención. Las células hospedadoras representativas incluyen células de bacterias, de levaduras, de mamíferos y de seres humanos, tales como células CHO, células HEK-293, células HeLa, células CV-1 y células COS. En la técnica se conocen métodos para generar una línea celular estable después de la transformación de una construcción heteróloga en una célula hospedadora. Las células hospedadoras representativas que no son de mamífero incluyen células de insecto (Potter *et al.* (1993) *Int. Rev. Immunol.* 10 (2-3): 103-112). Los anticuerpos también puede producirse en animales transgénicos (Houdebine (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (6): 625-629) y en plantas transgénicas (Schillberg *et al.* (2003) *Cell Mol. Life Sci.* 60 (3): 433-45).

MÉTODO TERAPÉUTICO

- 65 El polipéptido de unión a antígeno de la presente invención puede usarse en el tratamiento de artritis o

enfermedades reumáticas.

5 La artritis es un término general relacionado con enfermedades caracterizadas por una inflamación aguda o crónica de una o más articulaciones, normalmente acompañada con dolor y rigidez, dando como resultado infección, traumatismo, cambios degenerativos, enfermedad autoinmunitaria u otras causas.

10 La artrosis, también conocida como artritis degenerativa o enfermedad degenerativa articular, es un grupo de anomalías mecánicas que implica la degradación de articulaciones, incluyendo cartílago articular y hueso subcondral. Los síntomas pueden incluir artralgia, dolor con la palpación, rigidez, inmovilización, y algunas veces derrame. Una variedad de causas hereditarias, evolutivas, metabólicas y mecánicas pueden iniciar los procesos que conducen a la pérdida de cartílago.

15 La artritis reumatoide (AR) es un trastorno crónico, sistémico, inflamatorio que puede afectar a muchos tejidos y órganos, pero principalmente ataca a las articulaciones sinoviales. El proceso produce una respuesta inflamatoria de membrana sinovial (sinovitis) secundaria a hiperplasia de células sinoviales, exceso de líquido sinovial y desarrollo de paño sinovial en la membrana sinovial. La patología del proceso de la enfermedad a menudo conduce a la destrucción de cartílago articular y al anquilosamiento de las articulaciones. La artritis reumatoide también puede producir inflamación difusa en los pulmones, pericardio, pleura y esclerosis, y también lesiones nodulares más comunes en tejido subcutáneo bajo la piel. Aunque la causa de la artritis reumatoide se desconoce, la autoinmunidad desempeña una función importante tanto en su cronicidad como en su progresión, y la AR está considerada como una enfermedad autoinmunitaria sistémica.

25 El polipéptido de unión a antígeno de la presente invención puede usarse en solitario en el tratamiento de la artritis. El polipéptido de unión a antígeno puede tener actividad antiangiogénica intrínseca, por ejemplo, puede tener la capacidad de bloquear mediadores esenciales de proliferación vascular. Los ejemplos de dichos agentes actualmente en ensayos clínicos son fármacos con la capacidad de neutralizar anticuerpos anti – VEGF y anticuerpos dirigidos contra un receptor de VEGF o la integrina $\alpha v\beta 3$.

30 Como alternativa el polipéptido de unión a antígeno puede usarse como un complejo, por ejemplo, un conjugado, o en una terapia de combinación con otro agente (véase más adelante).

ALTERACIÓN DE LA VASCULATURA

35 La presente divulgación también se refiere a métodos que implican la alteración de la microvasculatura sinovial existente.

40 El método puede implicar el direccionamiento de un agente a la microvasculatura sinovial usando un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con la presente invención, teniendo el agente la capacidad de alterar la microvasculatura existente.

45 Para impedir el daño a tejidos normales y a vasos sanguíneos, el agente puede activarse selectivamente de manera que puede activarse *in situ* después del direccionamiento a la microvasculatura sinovial. Por ejemplo, el agente puede ser fotosensible y activarse con luz; o el agente puede comprender una nanopartícula magnética y activarse con un campo magnético.

TERAPIAS DE COMBINACIÓN

50 El polipéptido de unión a antígeno de la presente invención, o un complejo de su conjugado, puede usarse en combinación con otra terapia. Los dos agentes terapéuticos pueden administrarse individualmente, posteriormente o simultáneamente.

La otra terapia puede comprender una citocina terapéutica, un agente antiangiogénico o un fármaco antirreumático como se ha descrito anteriormente.

55 El polipéptido de unión a antígeno de la presente invención puede usarse en combinación con otro anticuerpo recombinante usado para el tratamiento de la artritis.

60 Actualmente, para el tratamiento de la artritis reumatoide, se están utilizando diversos anticuerpos recombinantes que se dirigen a una serie de citocinas, células T y células B. Desde la aprobación inicial de Etanercept, y poco después de Infliximab, se han autorizado tres anticuerpos neutralizantes de TNF adicionales (Adalimumab, Certulizumab pegol y Golimumab). Además, los anticuerpos recombinantes que se dirigen a células T [y/o a células dendríticas], (Abatacept), a células B, (Rituximab), y al receptor de citocina IL-6, (Tocilizumab) también han sido autorizados por la FDA para el tratamiento de la AR (Taylor y Feldmann 2009, Isaacs 2009, ambos citados anteriormente).

65 El otro tratamiento puede implicar el bloqueo de una ruta del factor de necrosis tumoral (TNF). El TNF promueve la

respuesta inflamatoria que, a su vez, causa muchos de los problemas clínicos asociados con trastornos autoinmunitarios, tales como la artritis reumatoide.

5 La inhibición del TNF puede conseguirse con un anticuerpo monoclonal tal como infliximab (Remicade), adalimumab (Humira), certolizumab pegol (Cimzia), y golimumab (Simponi), o con una proteína de fusión receptora en circulación tal como etanercept (Enbrel).

10 Aunque los inhibidores de TNF más útiles desde el punto de vista clínico son los anticuerpos monoclonales, algunos son moléculas simples tales como derivados de xantina (por ejemplo, pentoxifilina) y Bupropión.

15 El uso de terapia vascular dirigida junto con agentes terapéuticos de bloqueo de TNF- α recombinantes de segunda generación, puede demostrar ser más eficaz en el tratamiento de la AR en comparación con la terapia actualmente posible con un solo agente inmunoterapéutico.

15 KITS

La presente divulgación también proporciona un kit que comprende un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o complejo o conjugado del mismo.

20 El kit también puede comprender un agente para la asociación con el polipéptido de unión a antígeno antes de la administración a un sujeto. El polipéptido de unión a antígeno/ agente asociados pueden después dirigirse a la microvasculatura sinovial tras su administración al sujeto.

25 Cuando el polipéptido de unión a antígeno es para un uso diagnóstico, el kit también puede comprender adicionalmente reactivos y/o equipos formadores de imágenes.

Cuando el kit es para su uso en una terapia de combinación, el kit también puede comprender un segundo agente terapéutico para la administración simultánea, posterior o individual.

30 FORMACIÓN DE IMÁGENES

El polipéptido de unión a antígeno puede usarse en aplicaciones de formación de imágenes, por ejemplo, en la formación de imágenes de la vasculatura de articulaciones artríticas.

35 Hasta ahora, se conocen solo algunos marcadores de angiogénesis de buena calidad, bien en células endoteliales o en la ECM modificada. El problema más importante con muchos de los marcadores es que carecen de suficiente expresión específica o regulación positiva significativa en tejidos que experimentan angiogénesis.

40 Algunas integrinas, en particular $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$, se han propuesto como marcadores y como mediadores funcionales de angiogénesis en tumores y en trastornos neovasculares oculares. La expresión de la integrina $\alpha v \beta 3$ también se mostró que aumentaba en vasos sanguíneos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide. Sin embargo, en recientes estudios inmunohistoquímicos, se observó que la vasculatura en tejido aparentemente normal, así como en diversos tipos de células extravasculares, se teñía positiva para $\alpha v \beta 3$, aunque a menor intensidad que en tejidos que experimentaban angiogénesis.

45 Muchos estudios recientes han descrito la endoglina (CD105), un componente del complejo de receptor del factor β de crecimiento transformante, como un marcador atractivo de neovascularización. La endoglina muestra una expresión considerablemente aumentada sobre el endotelio en proliferación, pero también tiñe débilmente células endoteliales en la mayoría de tejidos normales, sanos y adultos de origen tanto de ser humano como de ratón. Se han caracterizado diversos anticuerpos monoclonales contra endoglina y se han ensayado recientemente como agentes de direccionamiento para terapia y formación de imágenes de tumores. Inesperadamente, los resultados de direccionamiento obtenidos en ratones fueron relativamente moderados, a pesar de la localización accesible del antígeno en células endoteliales.

50 Por lo tanto hay una necesidad de agentes mejorados para la formación de imágenes de la microvasculatura de articulaciones artríticas.

55 El polipéptido de unión a antígeno de la invención puede marcarse para técnicas de formación de imágenes, por ejemplo, con un marcador fluorescente o radioactivo.

60 Las técnicas de formación de imágenes *in vivo* usando anticuerpos son muy conocidas en la materia, incluyendo formación de imágenes bioluminiscentes (IBL) y formación de imágenes biofluorescentes (IBF).

65 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

La presente divulgación también proporciona un método para el diagnóstico de una enfermedad usando un

polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

5 La presente invención también proporciona un método para monitorizar la progresión de una enfermedad y un método para evaluar la eficacia de un tratamiento farmacológico usando un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

La enfermedad puede asociarse con un cambio, por ejemplo un aumento, en la microvasculatura sinovial. La enfermedad puede ser una forma de artritis, tal como artrosis o artritis reumatoide.

10 Como se ha explicado en la sección anterior, es posible que la angiogénesis sinovial preceda a otras características patológicas de la AR, de manera que el polipéptido de unión a antígeno de la presente invención puede ser útil para el diagnóstico de AR en una fase temprana, antes de la aparición de otros síntomas.

15 El método también puede implicar la formación de imágenes en la microvasculatura sinovial de una articulación del paciente en uno o en una pluralidad de momentos.

MÉTODO DE DIRECCIONAMIENTO

20 La presente divulgación también proporciona un método para el direccionamiento de un agente a la microvasculatura sinovial que comprende la etapa de asociar el agente con un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con la presente invención *in vitro*.

25 La asociación puede ser tal que cuando el polipéptido de unión a antígeno/agente asociado se administre a un paciente con artritis, el agente se dirige a la microvasculatura sinovial. Después, el agente puede acumularse selectivamente en sitios neovasculares.

El agente puede, por ejemplo, conjugarse con el polipéptido de unión a antígeno.

30 La invención se describirá ahora a modo de ejemplos, destinados para ayudar a un experto habitual en la técnica a llevar a cabo la invención y no pretende de ningún modo limitar el alcance de la misma.

Ejemplos

35 Ejemplo 1 - Selección por presentación en fagos *in vivo* de clones de anticuerpos scFv

Los autores de la presente invención emplearon un modelo de xenoinjerto sinovial en ratones SCID en una exploración por presentación en fagos *in vivo* de la biblioteca Tomlinson para generar clones de anticuerpos scFv con especificidad por la vasculatura sinovial humana contenida en los xenoinjertos.

40 La fagoteca Tomlinson nativa se inyectó mediante la vena de la cola y se permitió que circulara durante 15 minutos. El fago inespecífico, no unido, se retiró de la circulación mediante perfusión cardiaca del animal con solución salina normal. Después, se extrajo el trasplante sinovial del animal y se procesó para la recuperación de fagos y titulación. Para la exploración, como tejido de control se usaron xenoinjertos de tejido de piel realizados en los ratones simultáneamente. El fago recuperado solo del injerto sinovial se amplificó después en TG1 de *E. coli*, se rescató y se preparó para rondas de selección posteriores *in vivo*. Este proceso de selección por afinidad se repitió tres rondas más el enriquecimiento de los anticuerpos con especificidad por la membrana sinovial.

45 Ejemplo 2 – Reactividad de scFv A7 con tejido sinovial humano

50 Usando análisis inmunohistológico los autores de la presente invención han demostrado que scFv A7 exhibe reactividad específica con la microvasculatura de tejido sinovial de artrosis y artritis reumatoide (Figura 2).

55 Ejemplo 3 – Identificación del tipo de célula diana para scFv A7 dentro de la microvasculatura sinovial

Para determinar específicamente qué tipos de células dentro de la microvasculatura podían reaccionar con este anticuerpo, los autores de la presente invención realizaron tinción doble de tejido sinovial con AR usando scFv A7 junto con los marcadores endoteliales, factor de Von Willebrand (vWF) y CD 31, y el marcador específico de pericitos, NG2. Los resultados demuestran claramente que la tinción doble de este tejido con scFv A7 y el marcador de pericitos NG2, muestra solapamiento completo en el patrón de tinción celular observado, demostrando que scFv A7 tiene reactividad con pericitos y con el componente estromal de la microvasculatura de tejido sinovial con AR (Figura 3). Los componentes del compartimento estromal de la microvasculatura son atractivos para aplicaciones de direccionamiento basadas en anticuerpos, dado que este compartimento es estable y está presente en abundancia.

65 Ejemplo 4 – Direccionamiento *in vivo* de tejido sinovial por scFv A7

Para confirmar la especificidad de la reactividad de scFv A7 soluble *in vivo*, se examinó la capacidad de scFv A7 yodado para dirigirse a xenoinjertos de tejido sinovial humano *in vivo*. Los datos demuestran que 4 horas después de la inyección, el scFv A7 radiomarcado exhibía una capacidad de unión preferencial tres veces mayor con el membrana sinovial humano a diferencia de la piel humana trasplantada en ratones SCID, conservando la especificidad sinovial de su clon fago parental. Además, a pesar de una reducción aparente en la actividad de scFv A7 en la membrana sinovial a las 24 horas, este tejido sigue conservando un diferencial significativo en reactividad cuando se compara con la piel (Figura 4).

Ejemplo 5 – Especificidad de reactividad de scFv A7

Para examinar la especificidad de la reactividad de scFv A7 los autores de la invención examinaron la reactividad de este anticuerpo con una serie de tejidos humanos normales usando una matriz de tejidos encuesta normal de todo el cuerpo. Los datos presentados en la Figura 5 demuestran que scFv A7 no exhibe reactividad detectable con órganos vitales tales como corazón, pulmón, hígado, páncreas, corteza cerebral y componentes del tracto digestivo. Adicionalmente, el anticuerpo no muestra reactividad con el tejido linfático, timo, glándula adrenal, ovario y testículo, confirmando adicionalmente su exquisita especificidad tisular sinovial.

Ejemplo 6 – reactividad de scFv A7 con la membrana sinovial humana normal

Habiendo establecido que scFv A7 no exhibe reactividad con los componentes celulares ni con la microvasculatura de una serie amplia de tejidos normales, los estudios de especificidad de reactividad de scFv A7 con tejido normal se ampliaron examinando la reactividad de este anticuerpo con la microvasculatura de tejido sinovial humano normal. Para ello, se obtuvo tejido sinovial humano normal de sujetos sometidos a artroscopia articular por un dolor de rodilla prolongado, inexplicable, que no se desarrolló en afección artrítica durante una encuesta de seguimiento de 5 años. Los resultados presentados en la Figura 8 son representativos de once muestras y demuestran que la microvasculatura encontrada en el membrana sinovial humana normal, detectada por reactividad con vWF, contiene un componente vascular estromal, detectado por reactividad con alfa actina del músculo liso. Sin embargo, scFv A7 no muestra reactividad con la microvasculatura encontrada en estas muestras de membrana sinovial.

Ejemplo 7 – Reactividad de scFv A7 con tejidos de otras enfermedades inflamatorias

Para establecer si la reactividad de scFv A7 era específica de la microvasculatura de membrana sinovial artrítica o, una característica común de neovasculogénesis relacionada con la presencia de inflamación, se examinó la tinción de scFv A7 en muestras de tejidos de pacientes con enfermedad de Crohn (n = 7) y soriasis (n= 5), donde la presencia de microvasculatura se detectó usando anti-vWF humano. Los resultados presentados en la Figura 9 demuestran que scFv no exhibe reactividad detectable con la microvasculatura encontrada ni en tejidos de Crohn ni en soriásicos.

Estos resultados demuestran que el epítipo diana para scFv A7 está ausente en los tejidos humanos normales y en la microvasculatura y que no está expresado en la neovasculogénesis observada en afecciones inflamatorias. En su conjunto estos resultados confirman también la conclusión de que scFv A7 es específico para la microvasculatura encontrada en membrana sinovial artrítica.

MÉTODOS Y MATERIALES

Fagoteca de ScFv

Las bibliotecas I + J de ScFv humano de plegado sencillo I + J (Tomlinson I + J) se obtuvieron en el MRC (Medical Research Council) Resource Centre (Cambridge, Reino Unido) y la selección se realizó de acuerdo con las instrucciones del proveedor (en línea en: <http://www.lifesciences.sourcebioscience.com/clone-products/proteomic-resources/human-single-fold-scfv-libraries-i-plus-j.aspx>).

Las bibliotecas Tomlinson I + J son semisintéticas y se basan en un armazón humano para VH (V3-23/DP- 477 y JH4b) y Vk (O12/02/ DPK9 y Jk1), que codifica la estructura canónica humana más común. La CDR3 de la cadena pesada se diseña para que sea lo más corta posible pero para que no obstante pueda formar una superficie de unión antigénica. Adicionalmente, las regiones CDR1 se mantienen constantes mientras que la diversidad de la cadena lateral se incorpora en las regiones CDR y CDR2 en posiciones que establecen contacto con los antígenos y que son muy diversas en sus repertorios nativos maduros. El tamaño de las dos bibliotecas es de aproximadamente $1,4 \times 10^8$ y el gen DP47 de la línea germinal de VH confiere unión con la proteína A.

Trasplante de tejido humano en ratones SCID

En este estudio se usaron ratones color beige, SCID CB-17, de 4 a 10 semanas de vida. Se trasplantaron tejidos humanos (membrana sinovial y piel) por vía subcutánea en una posición dorsal distal a las articulaciones del hombro (dos trasplantes por animal) como se ha descrito anteriormente (Wahid, Blades *et al.* 2000 Clin Exp Immunol 122: 133-142). Los ratones se inspeccionaron diariamente y el trabajo con los animales se realizó según el Project

License (PPL 70-6109).

Se obtuvo tejido sinovial humano de pacientes con AR o artrosis (OA, *osteoarthritis*) que se sometieron a reemplazo articular. El tejido de piel humana se obtuvo de pacientes que se sometieron a cirugía cosmética. Se obtuvo el consentimiento informado de pacientes individuales. Adicionalmente, la aprobación ética para utilizar tejido humano de membrana sinovial y de piel para fines de investigación se obtuvo en el Comité de Ética del King's College Hospital (LREC n 05/Q0703/198).

Selección *in vivo* de fagos específicos de membrana sinovial

El fago específico de membrana sinovial se aisló después de cuatro rondas de enriquecimiento en ratones SCID portadores de tejido sinovial artrítico humano y xenoinjertos de tejido de piel, en un modelo experimental similar a uno previamente descrito para una peptidoteca (Lee, Buckley *et al.* 2002 *Arthritis Rheum* 46: 2109-2120). Resumiendo, cuatro semanas después del trasplante con tejido humano sinovial y de piel, 10^{11} ut (unidades transformantes) de la fagoteca Tomlinson constituida en 200 μ l de solución salina estéril, se inyectaron en la vena de la cola de ratones SCID. Se dejó que el fago circulase durante 15 min, después de los cuales el animal se anestesió terminalmente. Los fagos no unidos inespecíficos se retiraron de la circulación por perfusión cardiaca del animal con solución salina normal. Después, los trasplantes (y ocasionalmente, los órganos del ratón) se extirparon y se procesaron para la recuperación (usando tripsina) y titulación de los fagos. Los fagos recuperados solo de los injertos sinoviales, se amplificaron en TG1 de *E. coli*, se rescataron y se prepararon para rondas de selección *in vivo* posteriores. La integridad del fragmento scFv expresado por las partículas de fago de la última ronda de selección se evaluó por PCR. Los clones que conservaron expresión del fragmento scFv completo se rescataron después para la expresión de la proteína scFv soluble.

Localización *in vivo* del fago scFv A7

El clon del fago scFv A7 se inyectó en dos ratones SCID portadores de xenoinjertos de tejido humano sinovial y de piel, a 10^{11} ut, cuatro semanas después del trasplante. Se dejó que las partículas de fago circularan durante 15 min, después de los cuales, los animales se perfundieron y los números de fagos retenidos en los dos injertos se determinó por titulación del eluato homogeneizado. Posteriormente se cuantificó la localización diferencial de los fagos entre los injertos de piel y membrana sinovial.

Secuenciación de genes de scFv

Los clones seleccionados de la ronda de enriquecimiento final se secuenciaron para determinar las secuencias de ADN que codificaban los insertos de scFv del fago aislado. La secuenciación de los clones de scFv se realizó usando cebadores específicos de inserto de scFv LMB3 (CAG GAA ACA GCT ATG AC) y pHEN seq (CTA TGC GGC CCC ATT CA). La secuenciación se realizó usando el kit Cycle Sequencing de Big Dye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems) en un analizador genético ABI PRISM 3130.

Producción de fragmentos de anticuerpos scFv solubles

Los fragmentos de scFv rescatados del fago en la última ronda de selección se expresaron en HB2151 de *E. coli* para la producción de fragmentos de scFv solubles en el sobrenadante. La eficiencia de la producción de la proteína scFv de cada clon se evaluó en un ensayo ELISA monoclonal. Posteriormente, la proteína scFv se purificó del sobrenadante del cultivo mediante cromatografía por afinidad usando resina de flujo rápido con sefarosa proteína A (GE Healthcare). Los anticuerpos purificados se analizaron mediante SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño en columnas Superdex 75 HR10/30 (Amersham Biosciences), el scFv A7 soluble se purificó como una proteína monomérica a rendimientos de 0,5-1 mg/ml.

Biotinilación de fragmentos de anticuerpo scFv

Los anticuerpos scFv se biotinilaron usando el kit de biotinilación EZ-Link Sulfo-NHS-SS (Perbio, Cramlington, Reino Unido). En resumen, la concentración de scFv deseada para la biotinilación se diluyó en PBS 0,5-2 ml, se añadió a un exceso molar de 20 veces de sulfo-NHS-SS-biotina 10 mM y se incubó en hielo durante 1 h. Posteriormente la proteína biotinilada se aisló usando columnas desalinizadoras de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Yodación de fragmentos de anticuerpo scFv

Los fragmentos de anticuerpo scFv se radiomarcaron con Na^{125}I usando el método de Yodogen. Se usaron tubos de yodación de Pierce previamente cubiertos con Yodogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Perbio, Cramlington Reino Unido). Típicamente, 25 μ g de scFv purificado en 150 μ l se radiomarcaron para actividades específicas de 0,15- 0.2 MBq/ μ g. La eficiencia del marcado se ensayó mediante cromatografía de capa fina instantánea (típicamente más del 90 %) aunque la pureza de scFv marcado se determinó por HPLC de fase inversa.

Localización *in vivo* del fragmento de anticuerpo scFv A7 soluble

5 Dos ratones SCID, portadores de xenoinjertos dobles de tejido humano de piel y sinovial artrítico (dos injertos de membrana sinovial artrítica y dos de piel humana por animal), recibieron inyección de 6 ug de scFv A7 biotinilado, cuatro semanas después del trasplante. El fragmento de anticuerpo anti lisozima de huevo de gallina biotinilado, scFv HEL (*hen egg lysozyme*), se usó como control negativo de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo biotinilados se administraron mediante la vena de la cola en un volumen total de 200 µl y se dejaron circular durante 15 min después de lo cual los ratones se perfundieron con anestesia terminal. Posteriormente, los injertos humanos junto con los tejidos murinos se recogieron e inmediatamente se congelaron de manera instantánea para su examen histológico. La localización específica de tejido de scFv A7 soluble en la microvasculatura de injertos de tejido sinovial artrítico se examinó por detección inmunohistoquímica de scFv A7 biotinilado en secciones tisulares, usando el complejo de avidina- biotina- HRP (ABC-HRP) (Dako Ltd, Ely Reino Unido). La reactividad de scFv A7 añadido *in vitro*, también se examinó en estas muestras.

15 Capacidad de direccionamiento *in vivo* del fragmento de anticuerpo scFv A7 yodado

Cinco ratones SCID con doble trasplante (dos injertos de membrana sinovial artrítica y dos de piel humana por animal) recibieron inyección de anticuerpo scFv yodado cuatro semanas después del trasplante. La dosis de inyección por animal fue de un volumen total de 200 µl constituido en solución salina estéril, que contenía 1,25 µg de scFv con una radioactividad total de 0,2 Mbq. Los fragmentos de anticuerpo marcados se administraron mediante la vena de la cola. Los ratones se sacrificaron a las 4 h y 24 h post inyección, y los injertos, así como los órganos de los ratones, se recogieron para el recuento gamma. Los resultados se corrigieron posteriormente con respecto al peso tisular y a la radioactividad de fondo en el conjunto sanguíneo, y se expresaron como porcentaje de la dosis inyectada total. El scFv HEL iodado se usó como anticuerpo de control negativo.

25 Análisis inmunohistoquímico

30 Secciones congeladas de tejido se fijaron en acetona enfriada con hielo y se tiñeron con 1 ug de scFv A7 biotinilado. Los tejidos incluidos en parafina se desparafinaron y posteriormente se trataron con proteinasa K (Dako Ltd, Reino Unido) durante 4 min a temperatura ambiente para la recuperación del antígeno. Se usó scFv A7 a 4 ug y se detectó a través de su marcador biotina usando el complejo avidina- biotina- HRP (ABC-HRP) (Dako Ltd, Reino Unido). La presencia de vasos sanguíneos humanos en las secciones de tejido se representó usando anti vWF humano (Dako) seguido de un anticuerpo anti ratón conjugado con HRP. El anti CD 31 de ratón se usó para detectar vasos sanguíneos endoteliales de ratón en tejido murino. Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina de contraste, se montaron con medio de montaje Depex (Dako) y se analizaron usando un microscopio óptico (Olympus, Watford, Reino Unido).

Análisis inmunofluorescente

40 Secciones congeladas de tejido se fijaron en acetona enfriada con hielo antes de la tinción del anticuerpo. La reactividad de scFv A7 biotinilado se detectó usando neutravidina conjugada con rojo Texas (Invitrogen). La reactividad del anticuerpo anti vWF humano (Dako), anti CD 31 humano (Sigma) y anti NG2 (Millipore) se detectó usando Alexa 488 o Alexa 594 (Invitrogen). Las secciones se montaron posteriormente en medio de montaje fluorescente Vectashield con DAPI (Vector Labs. Reino Unido) para la tinción por contraste de los núcleos y se examinaron con un microscopio Axioskop 2 (Carl Zeiss Ltd, Reino Unido). Se tomaron imágenes con una cámara de color digital AxioCam usando un programa informático de análisis de imágenes KS300 (Zeiss, Reino Unido).

Evaluación y cuantificación de la vasculatura humana en injertos tisulares

50 Para evaluar el grado de vascularización de los injertos humanos, la superficie endotelial humana se determinó inmunohistológicamente usando anti vWF humano. En resumen, secciones de injerto de piel y de membrana sinovial humana se tiñeron con anticuerpo anti-vWF y la fracción de volumen (Vv) de los vasos humanos inmunoteñidos se determinó al microscopio usando un método de recuento puntual como se ha descrito anteriormente (Lee, Buckley *et al.* 2002, indicado anteriormente).

55 Resultados estadísticos

60 Los resultados se expresan como la media y la desviación típica (DT), o error típico de la media (ETM). Los análisis paramétricos e realizaron usando el programa informático Graphpad Prism (Graphpad Software, San Diego Estados Unidos), habitualmente mediante ensayo de la t bilateral no emparejado.

LISTADO DE SECUENCIAS

65 <110> Queen Mary Innovation Ltd

<120> POLIPÉPTIDO

<130> P041365WO

<150> GB 1016494.5
 5 <151> 30-09-2010

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (11)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

40 <400> 1

Ala	Xaa	Tyr	Thr	Ser	Xaa	Asn	Ser	Xaa	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10					15	

Xaa

<210> 2
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Región determinante de la complementariedad (CDR)

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

55 <400> 2

Asn	Ala	Ser	Asn	Xaa	Xaa	Xaa
1				5		

ES 2 582 041 T3

Ala Ile Tyr Thr Ser Gly Asn Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Región determinante de la complementariedad (CDR)

<400> 6

Asn Ala Ser Asn Phe Asp Tyr
1 5

15 <210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Región determinante de la complementariedad (CDR)

<400>7

Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

25

30 <210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región determinante de la complementariedad (CDR)

35 <400> 8

Gln Gln Gly Ser Asp Ala Pro Ala Thr
1 5

40 <210> 9
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Región VH del polipéptido de unión a antígeno

<400> 9

ES 2 582 041 T3

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

<210> 10
 <211> 112
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Región VL del polipéptido de unión a antígeno
 10 <400> 10

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

ES 2 582 041 T3

<210> 11
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido de unión a antígeno (scFv)

<400> 11

```

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

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

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

Trp Val Ser Ala Ile Tyr Thr Ser Gly Asn Ser Thr Ser Tyr Ala Asp
                50           55           60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65           70           75           80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85           90           95

Tyr Cys Ala Lys Asn Ala Ser Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
                100           105           110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
                115           120           125

Gly Gly Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
130           135           140

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
145           150           155           160

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
                165           170           175

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val
                180           185           190

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
                195           200           205

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
                210           215           220

Gly Ser Asp Ala Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
225           230           235           240

Lys Arg Ala Ala Ala
                245
    
```

10

ES 2 582 041 T3

5
 <210> 12
 <211> 750
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos con capacidad de codificar un polipéptido de unión a antígeno

10
 <400> 12

```

gcggcccagc cggccatggc cgaggtgcag ctgttggagt ctgggggagg cttggtacag      60
cctgggggggt cctgagact ctctctgtgca gcctctggat tcaccttag cagctatgcc      120
atgagctggg tccgccagc tctgggaag gggctggagt ggtctcagc tatttatact      180
agtggtaatt ctacatctta cgcagactcc gtgaagggcc ggttcacat ctccagagac      240
aattccaaga acacgctgta tctgcaaag aacagcctga gagccgagga cacggccgta      300
tattactgtg cgaaaaatgc tagtaatctt gactactggg gccagggaac cctggtcacc      360
gtctcgagcg gtggaggcgg ttcaggcggg ggtggcagcg gcggtggcgg gtcgacggac      420
atccagatga cccagtctcc atcctccctg tctgcatctg taggagacag agtcaccatc      480
acttgccggg caagtcagag cattagcagc tatttaaat ggtatcagca gaaaccaggg      540
aaagccccta agctcctgat ctattctgca tccaatttgc aaagtggggc cccatcaagg      600
ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc actctcacca tcagcagtct gcaacctgaa      660
gattttgcaa cttactactg tcaacagggt tctgatgctc ctgctacgtt cggccaaggg      720
accaaggtgg aaatcaaacg ggcggccgca      750
    
```

15
 <210> 13
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20
 <220>
 <223> Cebador

<400> 13
 caggaacag ctatgac 17

25
 <210> 14
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30
 <220>
 <223> Cebador

<400> 14
 ctatgcgcc ccattca 17

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido de unión a antígeno que se dirige específicamente a la microvasculatura sinovial de pacientes con artritis y que comprende:
- (i) una secuencia VH como se muestra en la SEQ ID NO. 9 o una variante de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 %; y
- 10 (ii) una secuencia VL como se muestra en la SEQ ID NO. 10 o una variante de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 %.
2. Un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a 4.
- 15 3. Un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO 5 a 8.
4. Un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende una secuencia VH como se muestra en la SEQ ID NO. 9.
- 20 5. Un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende una secuencia VL como se muestra en la SEQ ID NO. 10.
6. Un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que es un scFv.
- 25 7. Un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que se dirige específicamente a la microvasculatura sinovial de pacientes con artrosis y/o artritis reumatoide.
- 30 8. Un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que está conjugado con uno o más de lo siguiente: una citocina terapéutica, un agente antiangiogénico, un fármaco antirreumático: un agente fotosensible o una partícula magnética.
9. Un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para su uso en el tratamiento de artritis reumatoide.
- 35 10. Un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en la formación de imágenes de la vasculatura de articulaciones.
- 40 11. Un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 8, para su uso en el diagnóstico, monitorización o pronóstico de artritis.
12. Un método *in vitro* para la producción de un agente que, cuando se administra a un paciente, se dirige a la microvasculatura sinovial, cuyo método *in vitro* comprende la etapa de conjugar el agente con un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 45 13. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
14. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13.
- 50 15. Una célula hospedadora que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 14.

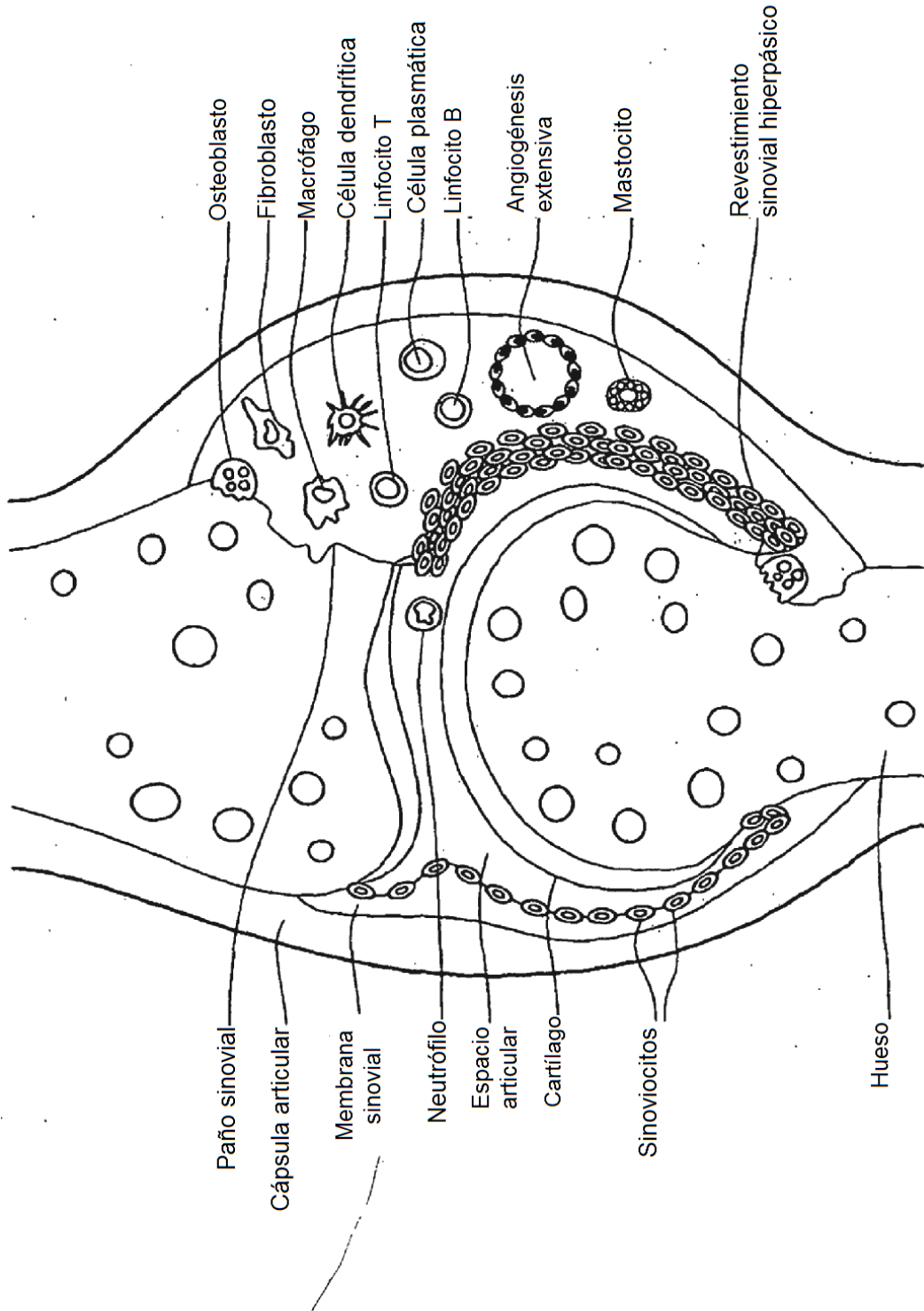


FIG. 1

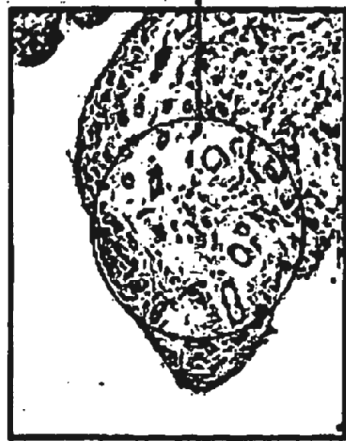


FIG. 2

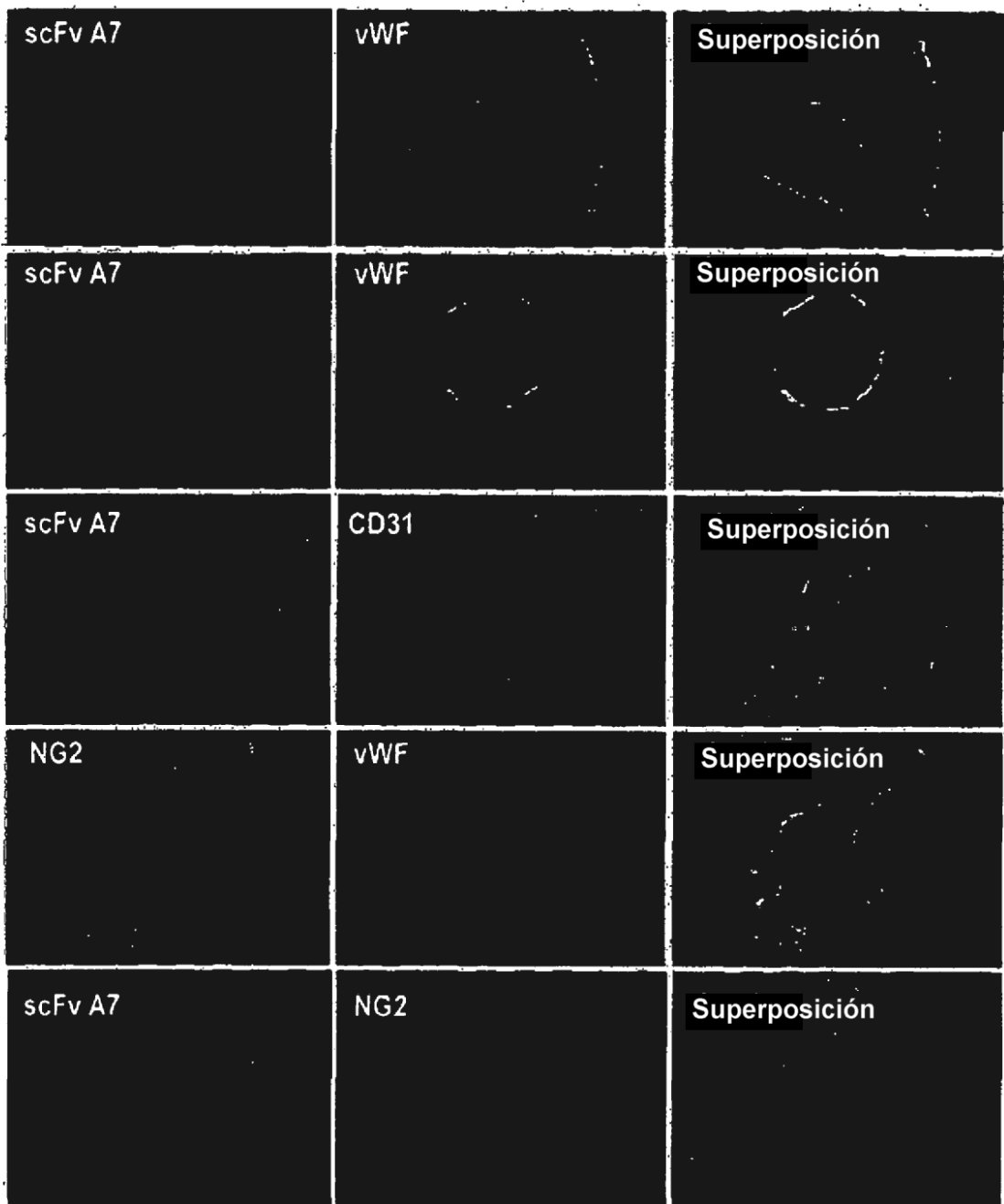


FIG. 3

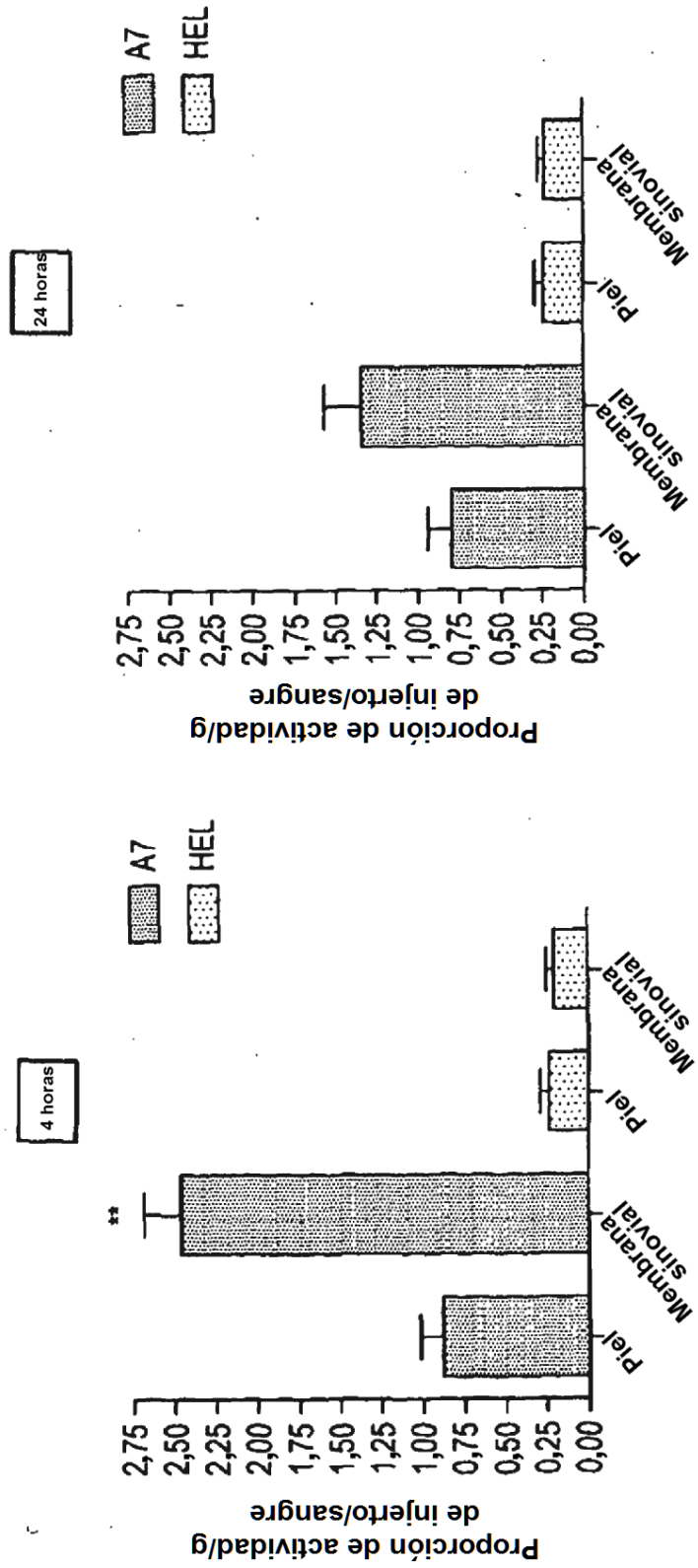


FIG. 4

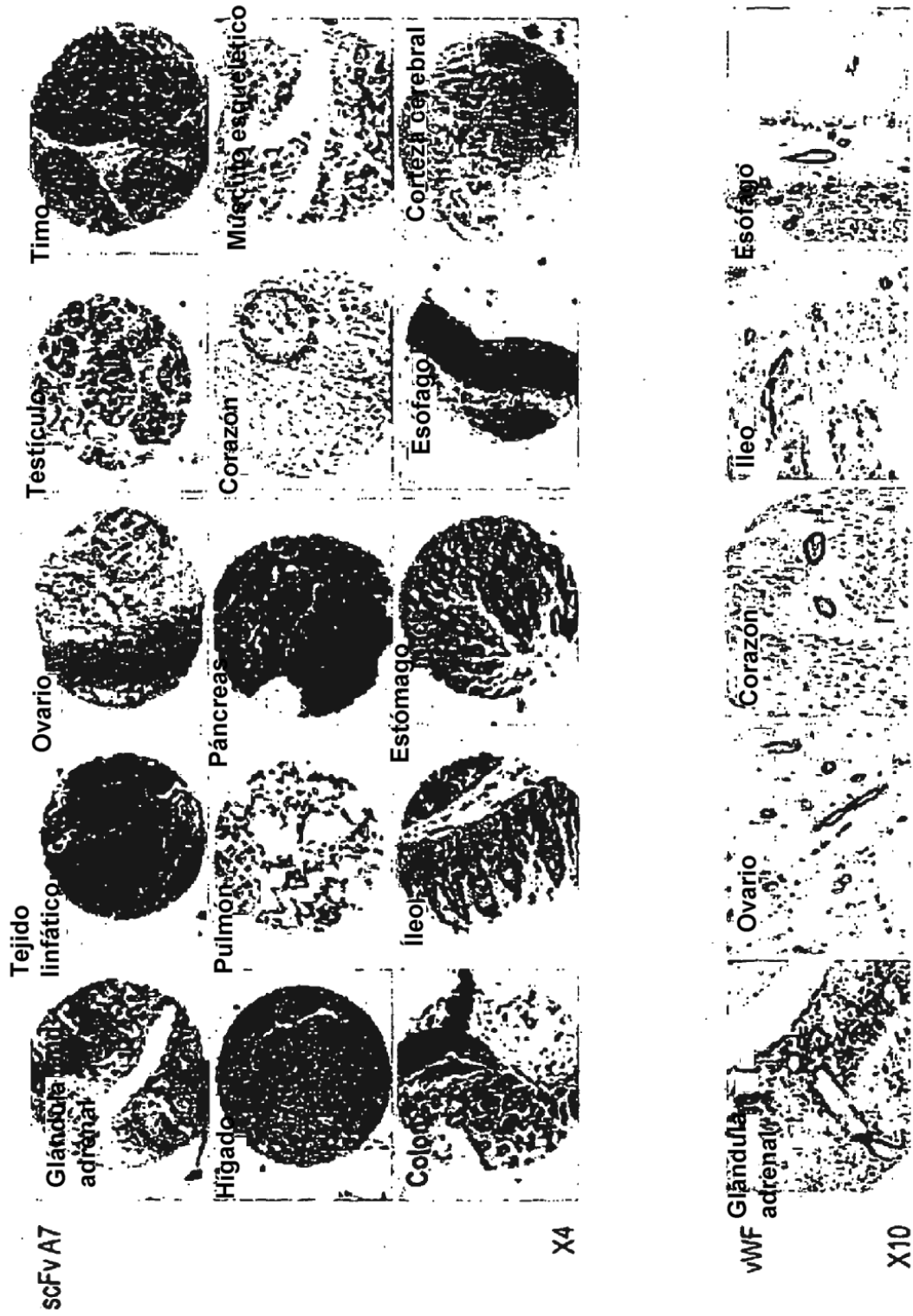


FIG. 5

Cadena pesada		Cadena ligera	
CDR2	CDR3	CDR2	CDR3
AIYTS GNSTSYADSVKG	NASN FDY	SASNL QS	QQGSD APAT

Los dominios de aminoácidos variables se muestran en negrita

FIG. 6

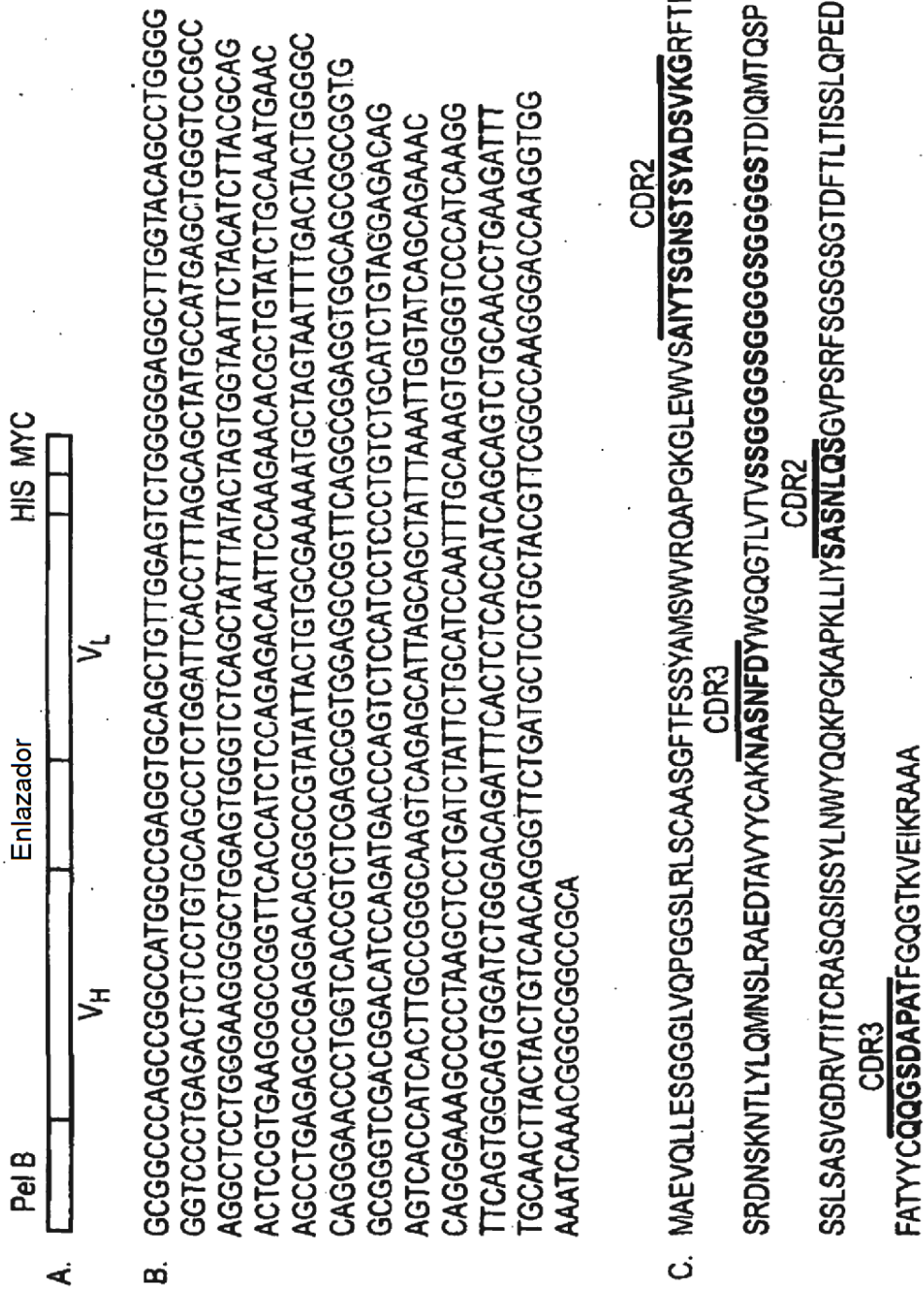


FIG. 7

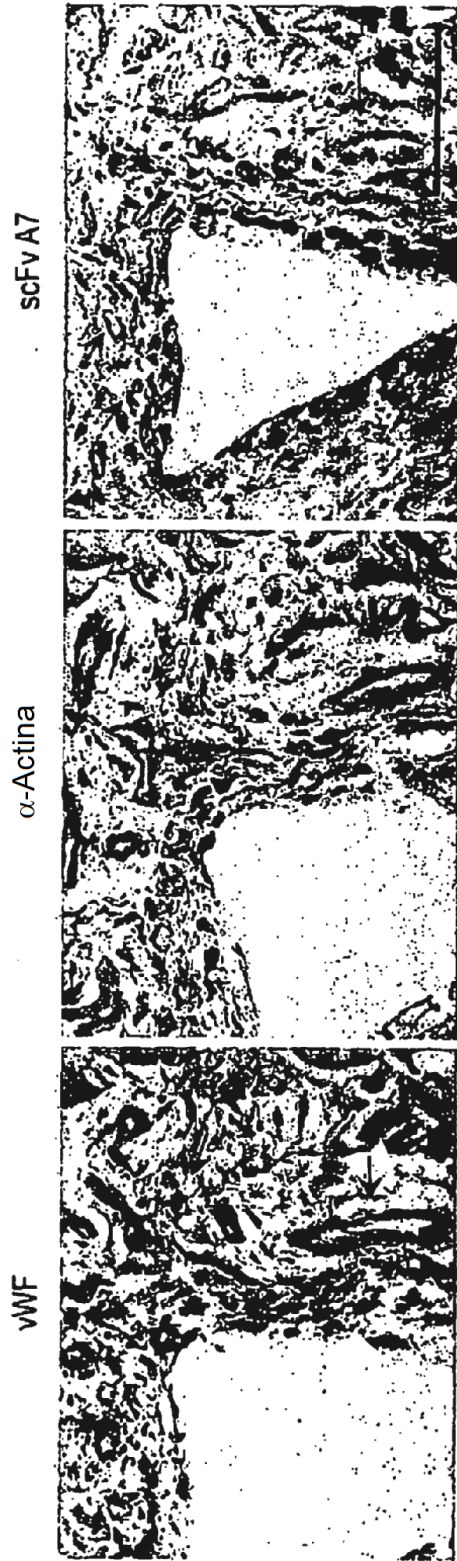


FIG. 8

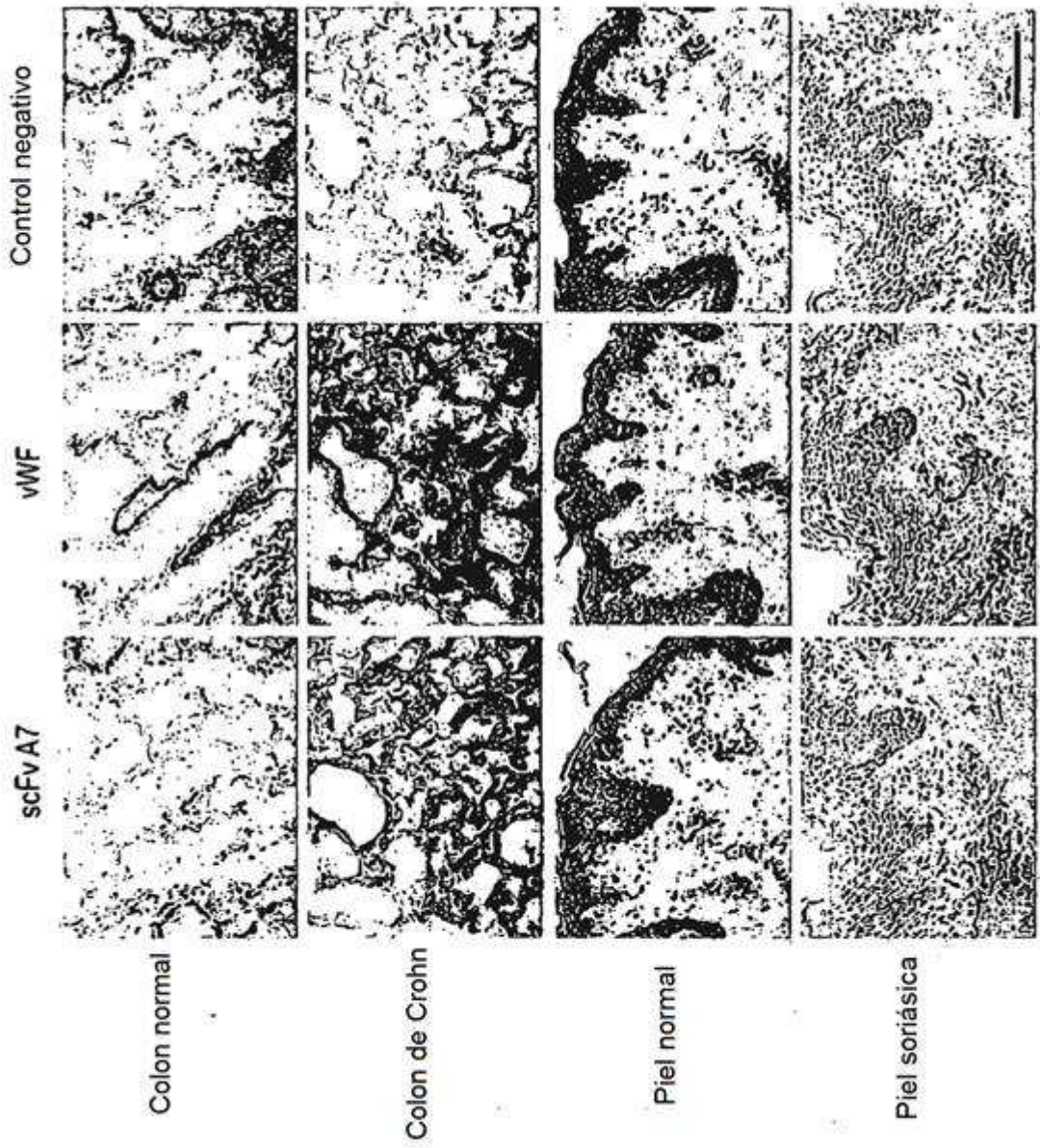


FIG. 9

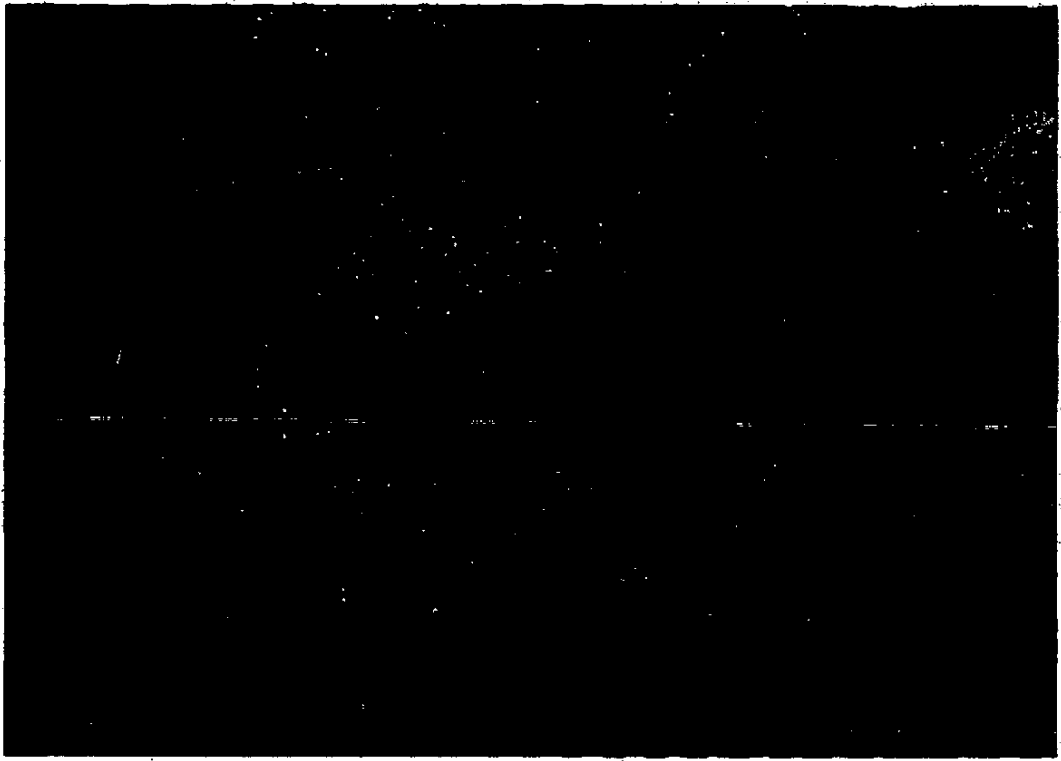


FIG. 10