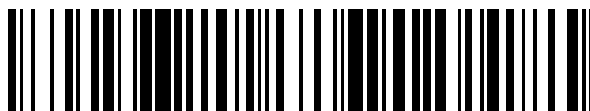


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 381**

51 Int. Cl.:

A61P 19/02 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 47/68 (2007.01)

A61K 51/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2008 PCT/GB2008/001526**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2008 WO08135734**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2008 E 08737154 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2155256**

54 Título: **Nuevo anticuerpo y su uso en el diagnóstico y terapia de artropatías**

30 Prioridad:

03.05.2007 GB 0708585

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

12.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NISSIM, AHUVA;
CHERNAJOVSKY, YUTI;
FAURHOLM, BJARNE;
PERRETT, DAVID;
WINYARD, PAUL;
HUGHES, CHRISTOPHER;
MATHER, STEPHEN y
DELL'ACCIO, FRANCESCO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 663 381 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

Nuevo anticuerpo y su uso en el diagnóstico y terapia de artropatías

- 5 La presente invención se refiere a un nuevo anticuerpo y a su uso en el diagnóstico y terapia de enfermedades inflamatorias de las articulaciones, tales como la artritis reumatoide (AR) y la osteoartritis (OA).

Introducción

- 10 El resultado final de la mayoría de las afecciones reumáticas, la principal causa de discapacidad en el mundo occidental, es la destrucción del cartílago articular. Esta destrucción es el resultado final de episodios inflamatorios tanto en la artritis reumatoide (AR) como en la artrosis (OA), mediadas por la afluencia de leucocitos activados (AR) o de condrocitos activados (OA). Por lo tanto, para tratar afecciones artríticas, principalmente la RA, actualmente se utiliza el bloqueo de citocinas proinflamatorias, tal como anti-TNFa e IL-1Ra. Sin embargo, estos tratamientos no son eficaces de forma consistente y el número de pacientes que fracasan con la terapia anti-TNF está en aumento. Especialmente para el tratamiento anti-TNFa, existe un riesgo de infecciones graves y de cánceres. Estos efectos secundarios sistémicos podrían minimizarse mediante el desarrollo de tecnologías para dirigir agentes terapéuticos a los tejidos inflamados de forma específica, pero hasta ahora se ha visto impedido por la falta de un epítipo (o epítipos) diana apropiado que estaría presente de forma exclusiva en la articulación afectada y no en la articulación sana.

- 25 La AR es una forma inflamatoria clásica de la artritis, que es una enfermedad autoinmunitaria crónica con inflamación sinovial extensa. La afluencia de leucocitos activados que infiltran la membrana sinovial inflamada da como resultado la regulación por aumento de citocinas inflamatorias tales como TNFa, interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), lo que conduce al aumento de los niveles de metaloproteasas de matriz (MMP). Además, las células inflamatorias infiltradas consumen cantidades aumentadas de oxígeno, lo que da como resultado la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que incluyen radicales superóxido (O₂), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radicales hidroxilo (OH), ácido hipocloroso (HOCl), óxido nítrico (NO) y peroxinitrito (ONOO). Además, las reacciones oxidativas secuenciales generan oxidantes reactivos tales como productos finales de la glucación avanzada (AGE). Las actividades combinadas de las MMP y las ROS pueden ser la causa de la excesiva degradación de la matriz extracelular, lo que conduce a la destrucción del cartílago.

- 35 Recientemente se han estudiado los episodios inmunopatológicos que siguen a la reactividad de las ROS con la proteína colágeno de tipo II (CII) específica de cartílago. Se ha demostrado un aumento sustancial de la unión de sueros de AR al CII después de la modificación química postraduccional *in vitro* por ROS, en comparación con la unión al CII nativo no modificado, que es significativamente mayor que en los sueros que no son de RA. La modificación postraduccional por ROS en la inflamación aguda y crónica también se ha postulado por la presencia de otras proteínas dañadas por ROS, y de autoanticuerpos frente a otros autoantígenos modificados de forma postraduccional por ROS. La generación de epítipos neoantigénicos en el CII modificado se ha informado en Nissim *et al.* Arthritis & Rheumatism, volumen 52 (12) páginas 3829-3838 (2005). También se han observado anticuerpos frente a IgG-AGE y una respuesta de linfocitos T frente a IgG modificadas por HOCl y peroxinitrito. FERRARI-LACRAZ SYLVIE *ET AL.*; JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 173, (2004-11-01), páginas 5818-5826, enseña que tener como objetivo células portadoras del receptor de IL-15 con una proteína IL-15/Fc mutante antagonista previene el desarrollo de la enfermedad y la progresión en la artritis inducida por colágeno murina.

- 45 Aunque en la OA la inflamación sinovial no es tan extensa como en la AR, y las células inflamatorias no son significativas en números, la sinovitis leve es una característica casi constante en la OA. La fuerza mecánica anómala parece estimular a los condrocitos para que produzcan los mismos mediadores inflamatorios y las ROS que los leucocitos infiltrados presentes en las articulaciones inflamadas por RA, conduciendo a modificaciones postraducionales del CII. Hay un informe de niveles elevados de péptido CII nitrado en sueros de pacientes con OA. La presencia de una fuerte tinción de nitrotirosina y de baja capacidad antioxidante en la región degenerativa del cartílago en la OA, en comparación con la región intacta de la misma muestra, sugiere una posible correlación entre el daño oxidativo y la degradación del cartílago. Como en la AR, la implicación indirecta del estrés oxidativo también se ha evidenciado en la OA por el hecho de que: la OA está fuertemente vinculada a la edad y en el cartílago envejecido hay acumulación de AGE; y (ii) hay acumulación de producto de peroxidación lipídica y nitrotirosina.

Existe una necesidad de medios mejorados para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias de las articulaciones y de terapias mejoradas para artropatías tales como artritis reumatoide (AR) y osteoartritis (OA).

- 60 Se ha descubierto que un anticuerpo producido frente al colágeno II (CII) modificado de forma postraduccional puede dirigir de forma específica el anticuerpo a los sitios de inflamación en las articulaciones. Este grado de especificidad es importante dado que el CII nativa puede estar presente también en las articulaciones inflamadas y en las sanas.

- 65 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo frente al colágeno II (CII) oxidado, en la cual el anticuerpo o fragmento del mismo está conjugado con una fracción farmacéuticamente activa de acuerdo con las reivindicaciones. Por lo tanto, la

presente invención proporciona una nueva estrategia al direccionamiento de fármacos a epítomos propios en el colágeno II, que es un componente normal del tejido pero que se vuelve inmunogénico después de la modificación postraduccional por radicales libres como parte de un proceso patológico que afecta al colágeno II.

- 5 El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Puede ser un anticuerpo humano o humanizado, o quimérico, con secuencias, restos o dominios procedentes de más de una especie animal. Los fragmentos de anticuerpos incluyen Fc, Fab, scFv, anticuerpo de único dominio (dAb), diacuerpo, minicuerpos y fragmentos scFv-Fc.
- 10 En una realización de la invención, el anticuerpo comprende las secuencias de CDR en las cadenas pesadas variables (VH) y cadenas ligeras variables (VL), como se muestra en la Tabla 1. CDRH2 y CDRH3 están en la cadena VH y CDRL2 y CDRL3 están en la cadena VL.

Tabla 1

| CDRH2 | CDRH3 | CDRL2 | CDRL3 |
|--------------------|---------|---------|-----------|
| DISSTGSYTAYADSVKG | GAGSFDY | AASALQS | QQSSSTPTT |
| AISAAGTATAYADSVKG | GYDTFDY | AASSLQS | QQNYGYPNT |
| SISNSGSYTDYADSVKG | GYGSFDY | AASTLQS | QQANSSPDT |
| SINNYGSNTAYADSVKG | GYSSFDY | AASYLQS | QQTSSSPDT |
| SINNYGSNTAYADSVKG | GYSSFDY | AASYLQS | QQTSSSPDT |
| SISYTGNSTDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| SISYTGNSTDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| SISYTGNSTDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| SISYTGNSTDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| SISYTGNSTDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| NIATDGTTTTYYADSVKG | NSTYFDY | SASTLQS | QQAATSPTT |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISYTGDESTYYADSVKG | NYSAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| SINDSGTTTTYYADSVKG | NYSAFDY | AASDLQS | QQSDSAPTT |
| SIDSAGASTYYADSVKG | NYSAFDY | NASSLQS | QQSDTYPST |
| SISYTGDESTYYADSVKG | NYSAFDY | TASNLQS | QQSYASPTT |
| SISYTGDESTYYADSVKG | NYSAFDY | TASNLQS | QQSYASPTT |
| SISYTGDESTYYADSVKG | NYSAFDY | TASNLQS | QQTGSYPTT |
| SINATGYGTYADSVKG | NYSDFDY | SASALQS | QQGDSYPTT |
| SINSNGTDTYYADSVKG | NYSDFDY | TASALQS | QQGYGAPTT |
| SISATGSSTYYADSVKG | NYSDFDY | SASDLQS | QQSSYPTT |
| SISATGSSTYYADSVKG | NYSDFDY | SASDLQS | QQSSYPTT |
| SIDDSGATYYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQAANYPTT |

ES 2 663 381 T3

| CDRH2 | CDRH3 | CDRL2 | CDRL3 |
|-------------------|---------|---------|------------|
| SIDDSGATYYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQAANYPTT |
| SIDDSGATYYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQAANYPTT |
| SIDDSGATYYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQAANYPTT |
| SIASGDSTYYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SIASGDSTYYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SIASGDSTYYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SIASGDSTYYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SIASGDSTYYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SIASGDSTYYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SIASGDSTYYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SISTNGSSTYYADSVKG | NYSSFDY | DASGLQS | QQGDTSPPT |
| SISTNGSSTYYADSVKG | NYSSFDY | DASGLQS | QQGDTSPPT |
| SISTNGSSTYYADSVKG | NYSSFDY | DASGLQS | QQGDTSPPT |
| SISTNGSSTYYADSVKG | NYSSFDY | DASGLQS | QQGDTSPPT |
| SIDTTGTTTYFADSVKG | NYSSFDY | SASYLQS | QQGYSAPTT |
| TISYSGNNTYYADSVKG | NYSSFDY | TASSLQS | QQGYTSPPT |
| SIDAGNGTYADSVKG | NYSSFDY | TASNLS | QQNNYPTT |
| SIDAGNGTYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQSDAYPTT |
| SIDAGNGTYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQSDAYPTT |
| SIDAGNGTYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQSDAYPTT |
| SIDAGNGTYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQSDAYPTT |
| SIDAGNGTYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQSDAYPTT |
| SIDSAGNATYYADSVKG | NYSSFDY | AASLQS | TSNYPTTQQ |
| SITDSGDTTYADSVKG | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| SITDSGDTTYADSVKG | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| SITDSGDTTYADSVKG | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| SITDSGDTTYADSVKG | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| SITDSGDTTYADSVKG | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| SIATTGDNTYYADSVKG | NYSYFDY | TASTLQS | QQAAGNPTT |
| AINAYGGSTYYADSVKG | NYSYFDY | AASSLQS | QQGSDYPTT |
| AINAYGGSTYYADSVKG | NYSYFDY | AASSLQS | QQGSDYPTT |
| SIATTGTSTTYADSVKG | NYSYFDY | TASSLQS | QQGST APTT |
| SIATTGTSTTYADSVKG | NYSYFDY | TASSLQS | QQGSTAPTT |
| TIDTAGSYTDYADSVKG | NYSYFDY | GASTLQS | QQSTASPST |
| SISNNGSSTYYADSVKG | NYSYFDY | AASNLS | QQTSSYPTT |
| SIAYGGAGTDYADSVKG | NYTAFDY | AASYLQS | QQGAGSPST |
| AIANTGSATNYADSVKG | NYTAFDY | DASTLQS | QQRNTSPPT |
| SISTAGTYTDYADSVKG | NYTDFDY | SASYLQS | QQSNTSPAT |
| SISTAGTYTDYADSVKG | NYTDFDY | SASYLQS | QQSNTSPAT |
| SINDTYGTYADSVKG | NYTYFDY | TASTLQS | QQAYTAPTT |

| CDRH2 | CDRH3 | CDRL2 | CDRL3 |
|-------------------|---------|---------|-----------|
| SIASSGTTTYYADSVKG | SYADFDY | AASNLQS | QQADTYPTT |
| TITSTGAATAYADSVKG | SYATFDY | AASYLQS | QQAANSPTD |
| AIDGTGYGTAYADSVKG | SYDTFDY | GASSLQS | QQTSDYPNT |
| SIANAGTATYYADSVKG | SYSNFDY | SASTLQS | QQASTSPTT |
| SIDSAGDSTYYADSVKG | SYSYFDY | TASYLQS | QQASDYPTT |
| SISSSGDTTYYADSVKG | SYSYFDY | TASTLQS | QQSSSNPTT |
| SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| SIDASGANTAYADSVKG | TYGTFDY | SASYLQS | QQSATTPTD |

En una realización de la invención, el anticuerpo puede ser un scFv seleccionado del grupo que consiste en:

5 3-11A, 6-6E, 1-7G, 3-7B, 6-9D, 1-1C, 1-8D, 1-3G, 4-12C, 6-3E, 6-9A, 1-12A, 4-6A, 4-8A, 4-9F, 4-4H, 3-3A, 3-6F, 6-10H, 12E, 3-5G, 3-4D, 3-5D, 6-4E, 3-6B, 3-6G, 4-11F, 6-7H, 1-11E, 1-2F, 1-6H, 3-8D, 1-4D, 4-2F, 3-3B, 3-5C, 6-9C, 4G, 3-12F, 3-4G, 6-11F, 6-11H, 3-2C, 5B, 6-10G, 1-4H, 4-5A, 4-1B, 4-12D, 6-4B, 1-2E, 1-7F, 1-10F, 1-9G, 4-1C, 6-7G, 3-7H, 6-1F, 6-3B, 4H, 3-9A, 6-10D, 3-5H, 3-2F, 1-6G, 3-11H, 6-9F, 3-9D, 4-3H, 3-3E, 3-10C, 3-11E, 6-8C, 6-11D, 4-5H, 6-5F, 6-7F, 1-10D

10 Estos scFv se enumeran en la Tabla 3 en las Ejemplos a continuación y comprenden las secuencias de CDRH2, CDRH3, CDRL2 y CDRL3 mostradas en la Tabla 1.

En una realización de la invención, el scFv puede comprender una secuencia como se muestra en la Tabla 2.

15

Tabla 2

| I. D. del clon | VH-CDR2 | VH-CDR3 | VL-CDR2 | VL-CDR3 |
|----------------|--------------------|---------|---------|------------|
| 1-2E | SITDSGDTTYYADSVKG | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| 1-11E | SIDDSGATTYYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQAANYPTT |
| 1-4D | SIASTGDSTYYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| 1-12A | SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| 12E | SINDSGTTTYYADSVKG | NYSAFDY | AASDLQS | QQSDSAPTT |
| 3-9A | TIDTAGSYTDYADSVKG | NYSYFDY | GASTLQS | QQSTASPST |
| 3-5C | SIASTGDSTYYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| 3-11E | SIDSAGDSTYYADSVKG | SYSYFDY | TASYLQS | QQASDYPTT |
| 3-2F | AIA NTGSATNYADSVKG | NYTAFDY | DASTLQS | QQRNTSPTT |
| 3-6G | SINSNGTDTYYADSVKG | NYSDFDY | TASALQS | QQGYGAPTT |
| 3-9D | SIASSGTTTYYADSVKG | SYADFDY | AASNLQS | QQADTYPTT |
| 6-3B | SIATTGTSTTYADSVKG | NYSYFDY | TASSLQS | QQGST APTT |
| 6-11D | SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| 6-9F | SINDTGYTTYADSVKG | NYTYFDY | TASTLQS | QQAYTAPTT |
| 6-7G | SIATTGDNTYYADSVKG | NYSYFDY | TASTLQS | QQAAGNPTT |

Normalmente, el scFv es 1-11E.

El colágeno II (CII) oxidado es colágeno II (CII) modificado de forma postraducciona que se ha oxidado mediante glucación no enzimática o mediante especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden incluir radicales superóxido (O₂), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radical hidroxilo (OH), ácido hipocloroso (HOCl), óxido nítrico (NO) y peroxinitrito (ONOO).

5

Por lo tanto, el antígeno puede ser HOCl-colágeno II o Ribosa-colágeno II.

El anticuerpo o fragmento del mismo se conjuga con la fracción farmacéuticamente activa, la cual puede ser un péptido o una molécula basada en péptidos, mediante cualquier medio adecuado. Cuando la fracción farmacéuticamente activa es un péptido o una molécula basada en péptidos, la conjugación puede ser mediante un enlace peptídico, que incluye la inserción de uno o más restos de aminoácidos.

10

La conjugación de un péptido o una molécula basada en péptidos se puede lograr mediante cualquier medio químico o medio biológico generalmente conveniente (véase, por ejemplo, Wu y Senter, *Nature Biotechnology*, volumen 23 (9) páginas 1137-1146 (2005); "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking" por S. S. Wong, CRC Press Inc.(1991)).

15

La conjugación química normalmente utiliza un reactivo químico bifuncional, por ejemplo, el glutaraldehído puede enlazar moléculas al extremo N de un péptido, la carbodiimida puede enlazar moléculas al extremo C de un péptido, los ésteres de succinimida (por ejemplo, MBS, SMCC) pueden unirse a grupos amino libres y a restos de cisteína, los enlaces de bencidina a residuos de tirosina, el peroydato se une a grupos hidrato de carbono y el isotiocianato también pueden enlazar moléculas a anticuerpos.

20

Como alternativa, se puede sintetizar una proteína de fusión utilizando técnicas de biología molecular recombinantes convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª edición, CSHL Press, (2001); Trachsel *et al.* *Arthritis Research & Therapy*, volumen 9 (1) R9 (2007); Nagai *Arthritis & Rheumatism*, volumen 54 (10) páginas 3126-3134 (2006). Los métodos para producir proteínas de fusión se describen en los ejemplos en el presente documento.

25

En determinadas realizaciones de la invención, la inserción de restos de aminoácido adicionales entre el anticuerpo o fragmento del mismo y la fracción farmacéuticamente activa, puede representar un sitio para la escisión mediante una proteasa. El sitio de escisión proteolítica puede comprender cualquier sitio de escisión específico de proteasa. El sitio de escisión proteolítica puede incluir, pero sin limitación, un sitio de escisión de metaloproteína de matriz (MMP), un sitio de escisión de serina proteasa, un sitio escindible mediante una proteasa parasitaria obtenida de un organismo patógeno (Zhang *et al.*, *J. Mol. Biol.* 289, 1239-1251 (1999); Voth *et al.*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 93, 31-41 (1998); Yoshioka *et al.*, *Folia Pharmacologica Japonica*, 110, 347-355 (1997); Tort *et al.*, *Advances in Parasitology*, 43, 161-266 (1999); McKerrow, *International Journal for Parasitology*, 29, 833-837 (1999); Young *et al.*, *International Journal for Parasitology*, 29, 861-867 (1999); Coombs y Mottram, *Parasitology*, 114, 61-80 (1997)) o un sitio escindible por las proteínas de la cascada del complemento (Carroll, *Annu. Rev. Immunol.* 16, 545-568 (1998); Williams *et al.*, *Ann. Allergy*, 60, 293-300 (1988)).

30

35

40

El sitio de escisión de MMP puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos que sea escindible por una MMP. La secuencia de aminoácidos del sitio de escisión de MMP puede estar codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de MMP, como se muestra en Figura 5, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 50 %, 60 %, 70%, 80%, 90%, 95 % o 99 % de identidad, utilizando los parámetros predeterminados del programa informático BLAST proporcionado por HGMP, con la misma. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico que codifica el sitio de escisión de MMP comprende el número mínimo de restos necesarios para el reconocimiento y escisión por la MMP.

45

Un sitio de escisión de MMP puede comprender varios restos de aminoácido reconocibles por una MMP. Además, los aminoácidos del sitio para MMP pueden estar enlazados por uno o más enlaces peptídicos que sean escindibles, proteolíticamente, por la MMP. Las MMP que pueden escindir el sitio de MMP incluyen, pero sin limitación, MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9 o MMP10 (Yu y Stamenkovic, *Genes and Dev.* 14, 163-176 (2000); Nagase y Fields, *Biopolymers*, 40, 399-416 (1996); Massova *et al.*, *J. Mol. Model.* 3, 17-30 (1997); revisado en Vu y Werb, *Genes and Dev.* 14, 2123-2133 (2000)). Las secuencias de los sitios de escisión de proteína de MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9 y MMP10 se muestran en la Figura 5.

50

55

Preferentemente, el sitio de escisión proteolítica de la presente invención se escinde en sitios de inflamación y remodelado tisular. Más preferentemente, el sitio de escisión proteolítica de la presente invención es un sitio de escisión de MMP, por ejemplo, una cualquiera o más de MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9 o MMP10, como se muestra en la Figura 5.

60

La fracción farmacéuticamente activa puede comprender una o más moléculas que pueden ser iguales o distintas, uno o más radioisótopos que pueden ser iguales o distintos, o uno o más elementos no radioactivos que pueden ser iguales o distintos.

65

En algunas realizaciones de la invención, la fracción farmacéuticamente activa puede comprender un polipéptido o una molécula no polipeptídica. Las referencias a un polipéptido incluyen un péptido, y viceversa, a menos que el contexto especifique lo contrario.

5 El polipéptido puede ser un anticuerpo o un fragmento del mismo, tal como un anticuerpo monoclonal anti-TNF alfa (por ejemplo, infliximab o adalimumab), una molécula de receptor p75 de TNF soluble (por ejemplo, etanercept) o un antagonista del receptor de IL-1 (por ejemplo, anakinra). En tales realizaciones de la invención, la composición comprenderá, por lo tanto, un anticuerpo biespecífico que puede ser un diacuerpo (un scFv con un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre VH y VL, y por lo tanto, los dominios están forzados a emparejarse con el dominio complementario de otro scFv para crear dos sitios de unión a antígeno), un minicuerpo (compuesto por dos fracciones scFv unidas a través una región constante de la cadena pesada (CH3)), una molécula scFv-Fc o una molécula de anticuerpo intacta que contiene las dos regiones de unión separadas.

10 Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico puede comprender una primera región de unión específica para el colágeno II (CII) modificado y una segunda región de unión específica para anti-TNFa.

15 En una realización, el polipéptido es una proteína de fusión de anticuerpo de receptor de TNF (TNFR), normalmente una proteína de fusión TNFR2-Fc.

20 Un anticuerpo biespecífico de la invención también puede comprender adicionalmente otra fracción farmacéuticamente activa. Por ejemplo, una composición de la invención puede comprender una primera región de unión específica para el colágeno II modificado, una segunda región de unión específica para CD64 y una toxina, tal como Ricina A.

25 Como alternativa, el polipéptido puede ser un factor de crecimiento (por ejemplo, TGF β , factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor estimulante de colonias (CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento insulínico, factor de crecimiento placentario); factor de diferenciación, molécula de citocina, por ejemplo, una interleucina, (por ejemplo, IL1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20 o IL-21, ya sea α o β), un interferón (por ejemplo, IFN- α , IFN- β y IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TNF), factor inductor de IFN- γ (IGIF), una proteína morfogenética ósea (BMP); una quimiocina (por ejemplo, una MIP (proteína inflamatoria de macrófagos), por ejemplo, MIP1 α y MIP1 β); una MCP (proteína quimiotáctica de monocitos), por ejemplo, MCP1, 2 o 3; RANTES (acrónimo de *regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*: regulado tras la activación de linfocitos T normales expresados y secretados)); un factor trófico; un inhibidor de citocina; un receptor de citocina (por ejemplo, CD20, CD40, CD40L, CD64); una enzima de eliminación de radicales libres (por ejemplo, superóxido dismutasa o catalasa), o una toxina (por ejemplo, toxina Ricina A, o exotoxina A de *Pseudomonas*), o un fragmento activo o porción de las mismas. Normalmente, el polipéptido es un interferón, normalmente IFN- β .

30 Véase, por ejemplo, Trachsel *et al.* Arthritis Research & Therapy, volumen 9 (1) R9 (2007), que informan sobre una proteína de fusión anticuerpo-IL10; Nagai Arthritis & Rheumatism, volumen 54 (10) páginas 3126-3134 (2006), que informa sobre una proteína de fusión anticuerpo-toxina. Otros ejemplos de proteínas de fusión de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, proteínas de fusión de anticuerpo-TNF alfa, anticuerpo-GM-CSF y anticuerpo-IL2.

40 El polipéptido farmacéuticamente activo puede proceder de la especie a tratar, por ejemplo, de origen humano, para el tratamiento de seres humanos.

45 La composición también puede comprender secuencias de péptidos adicionales que pueden dirigir la composición hacia dentro de una célula. Dichas secuencias de direccionamiento intracelular incluyen, pero sin limitación, la secuencia de TAT YGRKKRQRRR (véase, por ejemplo, Cohen-Saidon *et al.* Blood, volumen 102 (7), páginas 2506-2512 (2003)).

50 Como se usa en el presente documento, "peptidomiméticos" incluye, pero sin limitación, agentes que tienen una conformación de la estructura peptídica deseada incluida en un esqueleto no peptídico que mantiene el péptido en una conformación particular. Los peptidomiméticos, que no tienen algunas de las desventajas de los péptidos, son de interés en los casos en que los péptidos no son adecuados en medicina.

55 Los peptidomiméticos pueden comprender una estructura peptídica que tiene la conformación L o D. Los ejemplos de peptidomiméticos incluyen la melanocortina, la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) y otros peptidomiméticos que desempeñan un papel en el sistema nervioso central, el sistema endocrino, en la transducción de señales y en la infección e inmunidad.

60 El agente farmacéuticamente activo puede comprender un compuesto químico tal como un agente quimioterapéutico u otro fármaco sintético. Como alternativa, el agente farmacéuticamente activo puede comprender una secuencia de ácido peptidónucleico (PNA), por ejemplo, una secuencia de poli-lisina que se une a ácidos nucleicos y permeabiliza

65

bicapas lipídicas (Wyman *et al.*, Biological Chemistry, 379, 1045-1052 (1998)) o un péptido KALA que facilita la transferencia a través de bicapas lipídicas (Wyman *et al.*, Biochemistry, 36, 3008-3017 (1997)).

5 La molécula no polipeptídica puede ser una molécula de glucosaminoglucano, como glucosamina (adecuadamente, HCl de glucosamina) o condroitina. Como alternativa, la molécula no polipeptídica puede ser un fármaco antiinflamatorio no esteroide (AINE) tal como un AINE no selectivo o un AINE selectivo. Los ejemplos de AINE no selectivos incluyen aspirina, ibuprofeno y naproxeno. Los ejemplos de AINE selectivos (también llamados inhibidores de la COX-2) incluyen celecoxib (Celebrex®), rofecoxib (Vioxx®) y valdecoxib (Bextra®). Otras sustancias pueden incluir esteroides, como cortisol, o moléculas poliméricas tales como hialuronato de sodio o ácido hialurónico (por ejemplo, hialuronano (Hyalgan®) e hylan-GF-20 (Synvisc®)), o sustancias farmacéuticas tales como colchicina o hidroxicloroquina (Plaquenil®).

15 Las moléculas no polipeptídicas pueden conjugarse con el anticuerpo o fragmento del mismo, utilizando un enlazador que puede ser un enlace inestable, para permitir la liberación de la sustancia farmacéuticamente activa. Por ejemplo, se puede utilizar un enlace de hidrazona cuando el fármaco se libera en condiciones ácidas, o un enlace disulfuro que se reduce para liberar el fármaco, o también un enlace peptídico que se escinde enzimáticamente mediante una proteasa, como se describe anteriormente.

20 En algunas realizaciones, la composición puede comprender un elemento radioactivo o un elemento no radioactivo. El radioisótopo puede ser un radionúclido emisor de partículas alfa, tal como ^{213}Bi o ^{211}At , un radionúclido emisor de partículas beta, tal como ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu o ^{67}Cu , un radionúclido emisor de partículas gamma, tal como $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I o ^{111}In , o un emisor de positrones, tal como ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y o ^{124}I . Se pueden utilizar radioisótopos para marcar a la composición de manera detectable, para usos diagnósticos de la composición.

25 Como alternativa, el elemento no radioactivo puede ser Au, Fe, Cu, Pt o Ag.

También se pueden incluir como se desee combinaciones de los diversos elementos y sustancias descritos anteriormente.

30 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición del primer aspecto para uso en medicina. Este aspecto de la invención incluye una composición del primer aspecto para uso en el tratamiento de una artropatía, tal como artritis reumatoide (AR) y osteoartritis (OA). Este aspecto de la invención se extiende, por lo tanto, a un método de tratamiento de una artropatía, tal como artritis reumatoide (AR) y osteoartritis (OA), que comprende la etapa de administrar a un sujeto una composición del primer aspecto de la invención. Por lo tanto, la presente invención también incluye el uso de una composición del primer aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una artropatía, tal como artritis reumatoide (AR) y osteoartritis (OA).

35 Una composición del primer aspecto de la invención es una composición farmacéutica. De manera adecuada, una composición farmacéutica puede comprender un diluyente, un excipiente, un adyuvante y/o tampón fisiológicamente aceptable.

45 La composición farmacéutica puede administrarse de cualquier modo eficaz y conveniente, eficaz para tratar una enfermedad como se describe anteriormente, por ejemplo, la administración por vía oral, tópica, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intranasal o intradérmica, entre otras. En una terapia o como profiláctico, la composición de la invención se puede administrar a un individuo como una composición inyectable, por ejemplo como una dispersión acuosa estéril, preferentemente isotónica. La inyección puede hacerse de forma adecuada en la articulación afectada por la enfermedad.

50 Para la administración a mamíferos, y particularmente a seres humanos, se espera que la dosificación diaria de la composición de la invención sea de 0,01 mg/kg de peso corporal, normalmente de alrededor de 1 mg/kg. En cualquier caso, el médico determinará la dosificación real que será la más adecuada para un individuo, lo que dependerá de factores que incluyen la edad, el peso, el sexo y la respuesta del individuo. Las dosificaciones anteriores son ejemplares del caso promedio. Puede haber, por supuesto, casos en los que se necesiten dosificaciones mayores o menores, y estas están dentro del alcance de la presente invención.

55 De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se divulga un método para el diagnóstico de una artropatía, tal como artritis reumatoide (AR) y osteoartritis (OA), que comprende las etapas de administrar a un sujeto una composición marcada de forma detectable que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo frente a colágeno II (CII) oxidado y posteriormente detectar la composición. Por lo tanto, este aspecto de la invención se extiende a una composición marcada de forma detectable que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo frente a colágeno II (CII) oxidado, para su uso en el diagnóstico de una artropatía, tal como artritis reumatoide (AR) y osteoartritis (OA). Dichas realizaciones también se extienden al uso de tales composiciones en la fabricación de un agente para el diagnóstico de una artropatía, tal como artritis reumatoide (AR) y osteoartritis (OA).

65 El marcador detectable puede ser un marcador radioactivo o fluorescente. En algunas realizaciones, el radioisótopo puede ser un radionúclido emisor de partículas alfa, tal como ^{213}Bi o ^{211}At , un radionúclido emisor de partículas beta,

tal como ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu o ^{67}Cu , un radionúclido emisor de partículas gamma, tal como $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I o ^{111}In , o un emisor de positrones, tal como ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y o ^{124}I . Se pueden utilizar radioisótopos para marcar a la composición de manera detectable, para usos diagnósticos de la composición.

- 5 Para fines diagnósticos, también se podrían utilizar colorantes fluorescentes tales como Alexa Fluor 488 o el éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) monofuncional de Cy3.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo frente al colágeno II (CII) oxidado de acuerdo con las reivindicaciones, y un marcador detectable.

La AR es la enfermedad autoinmunitaria inflamatoria crónica más común, y la discapacidad se presente habitualmente al cabo de 10 años. La activación excesiva de la ruta inflamatoria conduce a sinovitis, daño articular y destrucción. Los componentes clave en la inflamación de las articulaciones son las citoquinas inflamatorias tales como TNF α e IL-1. La eficacia de los anticuerpos monoclonales anti-TNF α (Infliximab y Adalimumab), los antagonistas de los receptores de TNF p75 solubles (Etanercept) y del receptor de IL-1 (Anakinra) en el tratamiento de pacientes con AR resistentes a la terapia tradicional está ahora bien establecida, pero desafortunadamente podrían estar asociados con un aumento de infecciones graves y neoplasias. Por lo tanto, es muy importante desarrollar un suministro dirigido de fármacos anti-proinflamatorios a la articulación inflamada más que la administración sistémica, debido a que las citoquinas ejercen su función como factores auto o paracrin, con altas concentraciones, solo en la proximidad de la célula productora. La administración sistémica de suficientes agentes bloqueantes que puedan bloquear la alta concentración fisiológica local probablemente provoque efectos secundarios graves.

Aunque el CII es el mejor candidato para dirigir la terapia a la articulación, se necesita encontrar una manera de dirigir los fármacos únicamente a las articulaciones inflamadas. Los presentes estudios muestran el desarrollo de un anticuerpo de direccionamiento que reconocerá específicamente el colágeno tipo II que ha sido modificado por las ROS presentes en la articulación inflamada, que permita entonces el direccionamiento a la articulación del daño inflamatorio, independientemente de la etiología.

Empleando una biblioteca de anticuerpos humanos de presentación en fagos se desarrolló un panel de scFv humanos (Fig. 1) que se unen solo a CII modificado *in vitro* por HOCl o glucación, oxidantes reactivos conocidos en la RA. De manera más importante, este scFv se une solo al cartílago dañado y no al cartílago normal (Fig. 3), y correlaciona de forma inversa con la tinción de safranina-O para la integridad del proteoglicano específico del cartílago. De manera más importante, cuando se indujo inflamación en una sola pata en ratones CH3 con un modelo de artritis inducida por antígeno, el diacuerpo 1-11E se localizó solo en la pata inflamada sin ningún fondo para ninguna de las otras patas sanas (Fig. 4). Esto apoya fuertemente la especificidad de 1-11E por el CII dañado *in vivo* en un contexto de la inflamación y, por lo tanto, tiene potencial para el direccionamiento anti-TNF α , de otro bloqueo de citoquinas proinflamatorias o de factores regeneradores de cartílago a las articulaciones inflamadas. Esta estrategia es significativamente distinta del direccionamiento de péptidos citrulinados, que aparecen como un buen biomarcador de enfermedad en la AR, pero que no pueden utilizarse como una molécula de direccionamiento dado que su expresión tisular no es específica de las articulaciones.

En una realización, una composición de la invención comprende interferón beta de ratón (IFN- β), el scFv 1-11E y un sitio de escisión de MMP. Dicha composición se puede producir creando un pFastBac1.AH cortando un fragmento BamHI/HindIII que contiene múltiples sitios de clonación (MCS) de pFastBac1 (Invitrogen) y reemplazando este fragmento con un enlazador para proporcionar otro MCS de BamHI-KpnI-HindIII-ApaI, clonando el interferón b de ratón (IFNbr) en los sitios HindIII-EcoRI y clonando la MMP y 1-11E en los sitios NotI y ApaI, como se muestra en la Figura 10A.

El interferón beta de ratón se amplifica normalmente utilizando cebadores que tienen las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 129 (directo) y la SEQ ID NO: 130 (inverso). 1-11E se amplifica normalmente utilizando cebadores que tienen las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 131 (directo) y la SEQ ID NO: 132 (inverso), en donde 1-11E se amplifica con los extremos NotI/ApaI para incluir una etiqueta de histidina (His).

Normalmente, después se clona 1-11E en FastBac1.AH IFN-br/MMP/SP/His y se corta con Not/Apa para liberar SP/His. La construcción IFN-beta/His se clona normalmente amplificando IFN-br con HindIII/ApaI, utilizando cebadores que tienen la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 129 (directo) y la SEQ ID NO: 133 (inverso).

Después, las construcciones normalmente se transforman en células DHIOBac (Invitrogen).

En otra realización, una composición de la invención comprende el receptor de TNF 2-Fc (TNFR2Fc), un scFv (ya sea 1-11E o C7, como control negativo) y un sitio de escisión de MMP. Dicha composición puede producirse creando un pFastBac1.AH a partir de pFastBac1 (Invitrogen), cortando un fragmento BamHI/HindIII que contiene múltiples sitios de clonación (MCS) y reemplazando este fragmento con un enlazador para dar otro MCS de BamHI-KpnI-

HindIII-ApaI, clonando TNFR2Fc en los sitios HindIII-EcoRI y clonando un sitio de escisión de MMP y scFv (1-11E o C7) en los sitios NotI y ApaI, como se muestra en la Figura 10B.

5 TNFR2-Fc de ratón se amplifica normalmente utilizando cebadores que tienen las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 141 (directo) y la SEQ ID NO: 142 (inverso). 1-11E se amplifica normalmente utilizando cebadores que tienen las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 131 (directo) y la SEQ ID NO: 132 (inverso), en donde 1-11E se amplifica con los extremos NotI/ApaI para incluir una etiqueta de histidina (His).

La expresión de las construcciones normalmente se lleva a cabo utilizando el protocolo expuesto en la Figura 11. Tal protocolo normalmente implica las siguientes etapas:

- 10
1. Transformar las construcciones en células competentes DHIOBac (Invitrogen) para generar vectores de báculo.
 2. Confirmar los vectores de báculo recombinantes mediante exploración por azul-blanco y PCR, normalmente de acuerdo con las instrucciones de Invitrogen.
 - 15 3. Transfectar el DNA de báculo en células de insecto Sf9, utilizando cellfectina, normalmente de acuerdo con las instrucciones de Invitrogen.
 4. Recoger baculovirus (P1) del sobrenadante de células transfectadas.
 5. Utilizar el baculovirus recogido para infectar células Sf9 recién preparadas para amplificar las reservas de virus.
 - 20 6. Utilizar el virus P3 para infectar células de insecto High 5, normalmente durante 72 horas.

En una realización, las células High 5 infectadas se cultivan durante 3 días a 27 °C.

El sobrenadante normalmente se recoge y se procesa en un gel de SDS-PAGE.

25 Las proteínas recombinantes se pueden detectar mediante transferencia de Western, por ejemplo utilizando un anticuerpo anti-tetra-His (Qiagen) y HRP anti-ratón (Sigma).

30 La invención se describirá ahora por medio de la referencia a los siguientes ejemplos, que están presentes solo con fines de ilustración y no deben interpretarse como limitativos de la presente invención. Además, en los Ejemplos se hace referencia a los siguientes dibujos, en las cuales:

La Figura 1 muestra un ELISA representativo de los scFv exclusivos

35 La Figura 2 muestra una transferencia de Western con sonda de scFv 1-11E

La Figura 3 muestra en las fotografías (A) a (H) la unión específica a tejido cartilaginoso humano dañado por el scFv anti-CII-modificado por ROS en pacientes con OA.

40 La Figura 4 muestra el emplazamiento del scFv 1-11E en la pata inflamada.

La Figura 5 muestra las secuencias de los sitios de escisión de proteína de MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9 y MMP10.

45 La Figura 6 muestra la unión específica a tejido cartilaginoso humano dañado por el scFv anti-CII-modificado por ROS en pacientes con OA.

La Figura 7 muestra la unión específica a tejido cartilaginoso humano dañado por el scFv anti-CII-modificado por ROS en pacientes con AR.

50 La Figura 8 muestra: (A) y (B) la tinción histológica de la pata derecha; (C) y (D) 1-11E la tinción del cartílago de la pata; (E) tinción con un scFv no relevante; todo en un modelo de AR de ratón.

La Figura 9 muestra la tinción de una lesión en la superficie de la articulación en un modelo de OA de ratón.

55 La Figura 10 muestra la construcción de (A) una proteína de fusión IPN-β/1-11E; y (B) una proteína de fusión TNFR2Fc/scFv.

La Figura 11 muestra el protocolo utilizado para la expresión de la proteína de fusión IPN-β/1-11E y la proteína de fusión TNFR2Fc/scFv.

60 La Figura 12 es una transferencia de Western de la proteína de fusión IPN-β/1-11E.

La Figura 13 es una transferencia de Western de (A) y (B), de proteínas de fusión TNFR2Fc/1-11E; (C) un proteína de fusión TNFR2Fc/C7

65

Ejemplo 1: Preparación y modificación de CII

El CII se preparó a partir de cartilago bovino como en Miller (Miller, *Biochemistry* 11(26): 4903-4909, 1972) y posteriormente se expuso a sistemas de generación de oxígeno reactivo tal como se describió previamente (Nissim A, 2005). Brevemente, se modificó CII con (OH), HOCl (Hawkins CL, 2001; Hawkins CL, 2002), (ONOO⁻) o ribosa 2M por incubación durante la noche a 37 °C. También se modificó seroalbúmina bovina (BSA, Sigma) como anteriormente y se utilizó como antígeno de control.

Ejemplo 2: Selección de un scFv anti-CII modificado a partir de una biblioteca de presentación en fagos

Se utilizó la tecnología de anticuerpos de presentación en fagos (Winter G *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-455, 1994) para generar un fragmento monocatenario (scFv) variable que se una solo a CII que se ha modificado de forma postraduccional mediante radicales libres.

Se empleó una biblioteca de scFv semisintética humana construida a partir de un único armazón humano para V_H (DP-47 y JH4) y V_L (DPK9 y JK1), en el cual se incorporó diversidad en CDR3 y CDR2 (de Wildt RM *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 18(9): 989-994, 2000). Para seleccionar por la unión del fago a CII modificado y no a CII nativo no modificado, se realizó selección sustractiva utilizando CII nativo no modificado para la sustracción. El CII modificado con HOC1 se utilizó como diana para la selección debido a que la unión a CII modificado con HOC1 era más fuerte en los sueros de AR (Nissim A, 2005). En paralelo se utilizó CII glucado. Brevemente, se recubrieron inmunotubos (tubos Nunc-Immuno, Maxi-Sorp, Nunc, Dinamarca) con CII 10 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después del bloqueo con marvel al 2% en PBS (MPBS), se expusieron los tubos recubiertos durante 2 horas a 10¹⁵ unidades transformantes (ut) de la biblioteca de fagos en MPBS al 2%. El fago no unido se transfirió después a un segundo inmunotubo recubierto previamente con CII modificado con HOC1 o ribosa durante 2 horas adicionales de incubación a temperatura ambiente. Los fagos unidos a CII modificado se utilizaron después para infectar *E. coli* TG-1 y se rescataron mediante el fago auxiliar como se describe (Harrison J. L, 1996). El proceso de análisis se repitió tres veces y se infectó *E. coli* TG-1 con el fago final eluido después de la tercera ronda, y se seleccionaron colonias resistentes a la ampicilina individuales (clones de fago) para su análisis posterior.

Ejemplo 3: Exploración y secuenciación de clones de fagos específicos para CII modificado

La exploración de clones de fagos anti-CII modificado positivos se realizó en primer lugar mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), tal como se describe anteriormente (Harrison J. L, 1996). Se recubrieron pocillos de una placa de microtitulación (Nunc, Paisley, Reino Unido) con 10 µg/ml de CII nativo o modificado, y se incubaron durante 90 minutos con 100 µl de suspensión de fago. Además, se utilizó BSA nativa y modificada como control negativo. Después de la eliminación de los sobrenadantes, la cantidad de fago unido se determinó utilizando anticuerpos anti-M13 marcados con peroxidasa (GE Healthcare Ltd, Little Chalfont, Buckinghamshire) y se reveló utilizando como sustrato 3,3',5,5' tetrametilbencidina (TMB) 100 mM. La reacción se controló en un lector de ELISA a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 650 nm, utilizando el lector de placas GENios (TECAN, Theale Court, Reading UK) y el programa informático Magellan (TECAN, Theale Court, Reading RU)

El fragmento de ADN de scFv completo de cada clon de fago unido a CII modificado se secuenció utilizando los cebadores LMB-3 (5'-CAGGAAACAGCTATGAC) y Fd-Seq (5'-GAATTTTCTGTATGAGG). Las secuencias se analizaron utilizando Chromas (Technelysium Pty Ltd) y VBASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>), para identificar secuencias de scFv exclusivas, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

| Clon | Antígeno | CDRH2 | CDRH3 | CDRL2 | CDRL3 |
|-------|------------|-------------------|---------|---------|-----------|
| 3-11A | CII-HOCl | DISSTGSYTAYADSVKG | GAGSFDY | AASALQS | QQSSSTPTT |
| 6-6E | CII-HOCl | AISAAGTATAYADSVKG | GYDTFDY | AASSLQS | QQNYGYPNT |
| 1-7G | CII-Ribosa | SISNSGSYTDYADSVKG | GYGSFDY | AASTLQS | QQANSSPDT |
| 3-7B | CII-HOCl | SINNYGSNTAYADSVKG | GYSSFDY | AASYLQS | QQTSSSPDT |
| 6-9D | CII-HOCl | SINNYGSNTAYADSVKG | GYSSFDY | AASYLQS | QQTSSSPDT |
| 1-1C | CII-Ribosa | SISYTGNSDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| 1-8D | CII-Ribosa | SISYTGNSDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| 1-3G | CII-Ribosa | SISYTGNSDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| 4-12C | CII-Ribosa | SISYTGNSDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |

ES 2 663 381 T3

| Clon | Antígeno | CDRH2 | CDRH3 | CDRL2 | CDRL3 |
|-------|-------------|-------------------|---------|---------|-----------|
| 6-3E | CII-HOCI | SISYTGNSDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| 6-9A | CII-HOCI | NIATDGTTTTYADSVKG | NSTYFDY | SASTLQS | QQAATSPTT |
| 1-12A | CII-Ribosa | SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| 4-6A | CII-Ribosa | SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| 4-8A | CII-Ribosa | SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| 4-9F | CII-Ribosa | SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| 4-4H | CII-Ribosa | SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| 3-3A | CII-HOCI | SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| 3-6F | CII-HOCI | SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| 6-10H | CII-HOCI | SISYTGDSYADSVKG | NYSAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| 12E | Desconocido | SINDSGTTTTYADSVKG | NYSAFDY | AASDLQS | QQSDSAPTT |
| 3-5G | CII-HOCI | SIDSAGASTYADSVKG | NYSAFDY | NASSLQS | QQSDTYPST |
| 3-4D | CII-HOCI | SISYTGDSYADSVKG | NYSAFDY | TASNLQS | QQSYASPTT |
| 3-5D | CII-HOCI | SISYTGDSYADSVKG | NYSAFDY | TASNLQS | QQSYASPTT |
| 6-4E | CII-HOCI | SISYTGDSYADSVKG | NYSAFDY | TASNLQS | QQTGSYPTT |
| 3-6B | CII-HOCI | SINATGYGTYADSVKG | NYSDFDY | SASALQS | QQGDSYPTT |
| 3-6G | CII-HOCI | SINSNGTDYADSVKG | NYSDFDY | TASALQS | QQGYGAPTT |
| 4-11F | CII-Ribosa | SISATGSSTYADSVKG | NYSDFDY | SASDLQS | QQSSYTPTT |
| 6-7H | CII-HOCI | SISATGSSTYADSVKG | NYSDFDY | SASDLQS | QQSSYTPTT |
| 1-11E | CII-Ribosa | SIDDSGATYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQAANYPTT |
| 1-2F | CII-Ribosa | SIDDSGATYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQAANYPTT |
| 1-6H | CII-Ribosa | SIDDSGATYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQAANYPTT |
| 3-8D | CII-HOCI | SIDDSGATYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQAANYPTT |
| 1-4D | CII-Ribosa | SIASGDYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| 4-2F | CII-Ribosa | SIASGDYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| 3-3B | CII-HOCI | SIASGDYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| 3-5C | CII-HOCI | SIASGDYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| 6-9C | CII-HOCI | SIASGDYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| 4G | Desconocido | SIASGDYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| 3-12F | CII-HOCI | SISTNGSSTYADSVKG | NYSSFDY | DASGLQS | QQGDTSPPT |
| 3-4G | CII-HOCI | SISTNGSSTYADSVKG | NYSSFDY | DASGLQS | QQGDTSPPT |
| 6-11F | CII-HOCI | SISTNGSSTYADSVKG | NYSSFDY | DASGLQS | QQGDTSPPT |
| 6-11H | CII-HOCI | SISTNGSSTYADSVKG | NYSSFDY | DASGLQS | QQGDTSPPT |
| 3-2C | CII-HOCI | SIDTTGTTTTYADSVKG | NYSSFDY | SASYLQS | QQGYSAPTT |
| 5B | Desconocido | TISYSGNNTYADSVKG | NYSSFDY | TASSLQS | QQGYTSPPT |
| 6-10G | CII-HOCI | SIDAGNGTYADSVKG | NYSSFDY | TASNLQS | QQNNYPTT |
| 1-4H | CII-Ribosa | SIDAGNGTYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQSDAYPTT |
| 4-5A | CII-HOCI | SIDAGNGTYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQSDAYPTT |

| Clon | Antígeno | CDRH2 | CDRH3 | CDRL2 | CDRL3 |
|-------|-------------|--------------------|---------|---------|-----------|
| 4-1B | CII-HOCI | SIDAGGNGTYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQSDAYPTT |
| 4-12D | CII-HOCI | SIDAGGNGTYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQSDAYPTT |
| 6-4B | CII-HOCI | SIDSAGNATYYADSVKG | NYSSFDY | AASLQS | TSNYPTTQQ |
| 1-2E | CII-Ribosa | SITDSGDTTYADSVKG | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| 1-7F | CII-Ribosa | SITDSGDTTYADSVKG | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| 1-10F | CII-Ribosa | SITDSGDTTYADSVKG | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| 1-9G | CII-Ribosa | SITDSGDTTYADSVKG | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| 4-1C | CII-Ribosa | SITDSGDTTYADSVKG | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| 6-7G | CII-HOCI | SIATTGDNTYYADSVKG | NYSYFDY | TASTLQS | QQAAGNPTT |
| 3-7H | CII-HOCI | AINAYGGSTYYADSVKG | NYSYFDY | AASSLQS | QQGSDYPTT |
| 6-1F | CII-HOCI | AINAYGGSTYYADSVKG | NYSYFDY | AASSLQS | QQGSDYPTT |
| 6-3B | CII-HOCI | SIATTGTSTTYADSVKG | NYSYFDY | TASSLQS | QQGSTAPTT |
| 4H | Desconocido | SIATTGTSTTYADSVKG | NYSYFDY | TASSLQS | QQGSTAPTT |
| 3-9A | CII-HOCI | TIDTAGSYTDYADSVKG | NYSYFDY | GASTLQS | QQSTASPST |
| 6-10D | CII-HOCI | SISNNGSSTYYADSVKG | NYSYFDY | AASNLQS | QQTSSYPTT |
| 3-5H | CII-HOCI | SIAYGGAGTDYADSVKG | NYTAFDY | AASYLQS | QQGAGSPST |
| 3-2F | CII-HOCI | AIANTGSATNYADSVKG | NYTAFDY | DASTLQS | QQRNTSPTT |
| 1-6G | CII-Ribosa | SISTAGTYTDYADSVKG | NYTDFDY | SASYLQS | QQSNTSPAT |
| 3-11H | CII-HOCI | SISTAGTYTDYADSVKG | NYTDFDY | SASYLQS | QQSNTSPAT |
| 6-9F | CII-HOCI | SINDTGTYTYADSVKG | NYTYFDY | TASTLQS | QQAYTAPTT |
| 3-9D | CII-HOCI | SIASSGTTTTYYADSVKG | SYADFDY | AASNLQS | QQADTYPTT |
| 4-3H | CII-Ribosa | TITSTGAATAYADSVKG | SYATFDY | AASYLQS | QQAANSPTD |
| 3-3E | CII-HOCI | AIDGTGYGTAYADSVKG | SYDTFDY | GASSLQS | QQTSDYPNT |
| 3-10C | CII-HOCI | SIANAGTATYYADSVKG | SYSNFDY | SASTLQS | QQASTSPTT |
| 3-11E | CII-HOCI | SIDSAGDSTYYADSVKG | SYSYFDY | TASYLQS | QQASDYPTT |
| 6-8C | CII-HOCI | SISSSGDTTYADSVKG | SYSYFDY | TASTLQS | QQSSSNPTT |
| 6-11D | CII-HOCI | SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| 4-5H | CII-Ribosa | SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| 6-5F | CII-HOCI | SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| 6-7F | CII-HOCI | SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| 1-10D | CII-Ribosa | SIDASGANTAYADSVKG | TYGTFDY | SASYLQS | QQSATTPTD |

Ejemplo 4: Producción y purificación de scFv anti-CII modificado

- 5 Los clones de fagos reactivos obtenidos de la bacteria *E. coli* TG-1 se utilizaron para infectar la cepa bacteriana no supresora *E. coli* HB2151, para obtener scFv soluble. Después de la inducción durante la noche con IPTG 1 mM a 30 °C, se recogieron fragmentos de anticuerpo, precedentes de la familia V_H3, a partir del sobrenadante y el espacio periplásmico como se describe (Harrison J. L, 1996) y se purificó en una columna de afinidad de proteína (GE Healthcare Ltd, Little Chalfont, Buckinghamshire). La unión de scFv purificado a CII modificado se analizó en primer lugar mediante ELISA como se indica anteriormente, con la excepción de que se usó un anticuerpo anti-etiqueta myc
- 10 de ratón (Santa Cruz Biotechnology, INC, Wembley, RU) seguido de un anti-ratón conjugado a HRP (Sigma, Dorset, RU) para analizar el scFv unido.

scFv anti-CII modificados producidos por la biblioteca de anticuerpos humanos de presentación en fagos

Después de tres rondas de selección sustractiva, se seleccionaron 82 clones de fagos específicos para CII glucado o CII modificado con HOCl, de los cuales 42 clones tenían secuencias exclusivas. Después, se seleccionaron para un análisis posterior 15 clones representativos con distintos patrones de unión pero con buena expresión (Fig. 1 y Tabla 1). Como se muestra en la Fig. 1, de estos 15 clones hubo 9 clones con unión más fuerte a CII modificado, 3 clones se unieron a todas las formas de CII y 3 clones no tenían reactividad de unión a ninguna forma de CII. Después, se estudiaron adicionalmente tres scFv que tienen distintas características de unión: el clon 1-11E que se une a CII modificado (glucado, con HOCl y, en cierta medida, CII peroxinitrado), el clon 6-11D que se une a CII nativo y modificado y el clon 12E que no se une a ninguna forma de CII. Ninguno de estos scFv se unió a BSA nativo o modificada con radicales libres, o a colágeno de tipo III (datos no mostrados).

Ejemplo 5: Transferencia de Western

La transferencia de Western utilizando un scFv como sonda y CII modificado o nativo como antígenos diana se realizó tal como se describe (Nissim A, 2005). Brevemente, se procesó CII nativo y modificado (2 µg de cada uno) en un gel desnaturalizante al 7,5 % con SDS y se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa. Después de bloquear con MPBS al 2 %, las membranas se incubaron con scFv purificado 10 µg/ml en MPBS al 2 % durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido de la incubación con etiqueta anti-myc de ratón (Santa Cruz Biotechnology, INC, Wembley, RU) y luego con anti-ratón-HRP (Sigma, Dorset). Las membranas se lavaron tres veces con PBS Tween al 0,1 % (5 min cada una) y tres veces con PBS (5 min cada una), antes del revelado con ECL (GE Healthcare Ltd, Little Chalfont, Buckinghamshire).

Análisis comparativo de suero de AR humano y de la unión de scFv a CII mediante transferencia de Western

1-11E se une a varios fragmentos de CII entre 50 y 150 kDa, así como a una banda >250 kDa que fue el resultado de la reticulación de CII debida a la reactividad de ROS (Fig. 2, calle 2-5). 1-11E también se une a CII nativo, que corresponde a una banda por debajo de 150 kDa (Fig. 2, calle 1). La unión a CII nativo en transferencia Western también se observó en sueros de pacientes con AR que no se unieron a CII nativo en ELISA, sino solo, en ELISA, a CII modificado por ROS (por ejemplo, suero 33 (Nissim A, 2005)).

Ejemplo 6: Inmunohistoquímica de cartílago de OA y AR humano utilizando el scFv anti-CII modificado seleccionado

Se obtuvo una muestra osteocondral del cóndilo femoral de un paciente (mujer, 63 años) sometida a artroplastia protésica de la rodilla por OA. Se obtuvo una muestra de cartílago humano normal cadavérico de un área conservada de una rodilla con OA unicompartimental sometida a artroplastia (mujer, 54 años). En ambos casos, el cartílago se fijó durante la noche a 4 °C en paraformaldehído al 4 %, se descalcificó durante 15 días en EDTA 0,5 M a 4 °C, se lavó en PBS y se incluyó en parafina de acuerdo con protocolos convencionales. La tinción con safranina O se realizó de acuerdo con protocolos convencionales (Rosenberg, 1971). Todas las muestras se obtuvieron en conformidad con las normas y regulaciones institucionales.

Para la inmunotinción, se cortaron cortes de 5 mm de espesor, se desparafinaron e hidrataron de acuerdo con protocolos convencionales. Después de la inactivación de la peroxidasa endógena en peróxido de hidrógeno al 0,5 % durante 15 minutos, se realizó la recuperación del antígeno mediante una incubación de 45 min de los portaobjetos con 3 mg/ml de pepsina (Zymed, Chandlers Ford, Hampshire, Reino Unido) a 37 °C, seguido de dos lavados con PBS. La actividad de avidina endógena se bloqueó utilizando un kit disponible en el mercado (Vector Laboratories, Orton Southgate, Peterborough, RU), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Esto fue seguido de 30 min de bloqueo con BSA al 0,5 %. La inmunotinción se realizó utilizando el scFv seleccionado (10 µg/ml y 1 µg/ml), así como anticuerpos de control comerciales anti-CII de ratón (diluidos 1:100 y una dilución de 1:1000; Chemicon International, Chandlers Ford, Hampshire, RU) y anticuerpos policlonales anti-CII (diluido 1:100, 1:1000) de ratones con artritis inducida por colágeno (AIC). Se añadieron ScFv o anticuerpos de control al portaobjetos en tampón de bloqueo (BSA al 0,5 % en PBS más azida sódica al 0,05 %), y se dejaron durante la noche a 4 °C. Cuando se utilizaron los scFv para la exploración, los portaobjetos se lavaron el día siguiente con PBS durante 2 minutos y se incubaron durante 30 minutos con anticuerpos de ratón anti-etiqueta myc para unirse a la etiqueta myc incorporada en el extremo carboxilo terminal del scFv (diluido 1:200, Santa Cruz Biotechnology Inc, Wembley, RU). Después de dos lavados como anteriormente, se añadieron anticuerpos biotinilados anti-ratón (kit de Vector PK-6102) seguido de dos lavados con PBS y el revelado con sustrato DAB (DAKO, Ely, Cambridgeshire, UK) y la contratinción nuclear con hematoxilina de Mayer. Para finalizar, los portaobjetos se deshidrataron y montaron con preparación de montaje DPX (BDH, Londres, RU)

Unión específica a tejido cartilaginoso humano dañado por el scFv anti-CII modificado por ROS.

La matriz extracelular del cartílago es una estructura compleja donde interactúan varias moléculas para formar una unidad estructural y funcional. Por lo tanto, existe la posibilidad de que la estructura terciaria y cuaternaria de los colágenos en el tejido intacto pueda modificar la especificidad de unión de los anticuerpos de fago que se han seleccionado *in vitro*. Para determinar la especificidad de unión en el tejido intacto, se analizó la capacidad del scFv

anti-CII modificado por ROS de unirse a CII dentro de la estructura compleja de la matriz y de presentar inmunorreactividad con cartílago de OA dañado, a diferencia del cartílago normal. 1-11E tiñó la matriz extracelular del tejido cartilaginoso, que presentaba características marcadas de OA (Fig. 3A, B) con tinción mayoritariamente pericelular (Fig. 3 B), con daño severo de la matriz extracelular determinado por la tinción reducida con safranina O (Fig. 3 C). No se detectó tinción por el scFv 1-11E cuando se utilizó cartílago histológicamente normal procedente de cartílago normal (Fig. 3D, E). Por el contrario, los anticuerpos policlonales de ratones con AIC se unieron fuertemente al cartílago de OA en regiones dañadas y no dañadas (Fig. 3 F) y teñidas débilmente con safranina O (Fig. 3 C). Un Acm anti-CII comercial no tiñó las zonas dañadas del cartílago teñidas por 1-11E en una sección adyacente (Fig. 3 G), pero tiñó de forma intensa un cartílago histológicamente normal (Fig. 3H), lo que sugiere que el epítipo reconocido por el anticuerpo comercial se pierde en el corte de OA.

La Figura 6 también muestra la tinción del cartílago de OA. Aunque en la OA la inflamación sinovial no es tan extensa como en la AR, y las células inflamatorias no son significativas en números, la sinovitis leve es una característica casi constante en la OA. La fuerza mecánica anómala parece estimular a los condrocitos a producir algunos de los mismos mediadores inflamatorios y las ROS que los leucocitos infiltrantes presentes en las articulaciones inflamadas de AR, dando lugar a modificaciones postraduccionales del CII en la OA. La Figura 6 confirma los resultados mostrados en la Figura 3 y muestra que la tinción del corte del cartílago de OA es solo pericelular, alrededor de los condrocitos.

Se obtuvo una muestra adicional de una paciente (mujer, 47 años) sometida a artroplastia protésica total de la rodilla por AR. Los protocolos de fijación y tinción fueron como se describe anteriormente.

La Figura 7 muestra la tinción del cartílago de AR. En la AR, las células inflamatorias infiltrantes consumen cantidades aumentadas de oxígeno, dando como resultado la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que pueden provocar una degradación excesiva de la matriz extracelular, lo que conduce a la destrucción del cartílago y la modificación química postraduccionales del CII por las ROS. Figura 7 muestra la tinción unilateral del cartílago de AR en todo el corte. Esto se debe a la alta afluencia de células inmunitarias que producen altos niveles de ROS.

Ejemplo 7: Construcción y expresión de un diacuerpo

A partir de los scFv exclusivos evaluados para la unión específica a CII modificado así como por la mejor expresión en bacterias, el scFv más prometedor, 1-11E, de 25 kDa, se diseñó técnicamente por ingeniería genética a un fragmento más grande de 55 kDa. El enlazador entre los V_H y V_L se acortó digiriendo el vector de fagémido con XhoI y Sall y religamiento. Esto da como resultado un diacuerpo bivalente, una molécula superior con una semivida aumentada (Hudson, 2005) construida a partir de dos scFv. La expresión y exploración de las moléculas de unión al diacuerpo se realizó como se indicó anteriormente. El perfil de peso molecular del diacuerpo expresado resultante se analizó mediante filtración en gel.

Ejemplo 8: Inducción de artritis en los modelos animales

Se utilizaron ratones C3H machos (edad 17-19 semanas). Se añadieron 100 mg de cepa de TB H37RA no viable desecada (Difco 231141) a 30 ml de adyuvante de Freund incompleto (AFI, Difco 263910) para formar adyuvante de Freund completo (AFC). Se añadió un volumen equivalente de AFC a una solución de BSA metilada (BSAm) 2 mg/ml (en PBS) (Sigma A1009). Después, la mezcla se emulsionó en hielo utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T25 a 13500-20500 rpm hasta que se obtuvo una consistencia blanquecina y esponjosa. Los ratones se anestesiaron con Hypnorm y se les inyectó 100 μ l BSAm 1 mg/ml (es decir 100 μ g) en ACF en 2-3 sitios distintos por vía intradérmica. Una semana más tarde, la inmunización se repitió como anteriormente, excepto que no se añadieron bacterias (es decir, AIC/BSAm). Dos semanas después de la 2^a inmunización, los ratones se anestesiaron con nitroso/oxígeno y halotano, y se indujo inflamación inyectando 50 μ l de BSAm 1 mg/ml (es decir, 50 μ g) en PBS en la pata trasera izquierda de los animales. Como control, se inyectaron 50 μ l de PBS en la pata trasera derecha. La inflamación se midió usando calibradores para medir el grosor de la pata. Se observó hinchazón solo en las patas derechas a partir de las 24 horas, y persistió hasta 1 semana más tarde. Dos semanas más tarde, la hinchazón había disminuido por completo.

Ejemplo 9: Obtención de imágenes del emplazamiento del anti-CII modificado con ROS

Se radiomarcaron 50 μ g de diacuerpo de 1-11E con 20 MBq yoduro [125 I] de sodio (GE Healthcare, Amersham, RU), utilizando el método por iodogen (Perbio Science, Cramlington, RU), y se diluyó en PBS hasta un volumen final de 240 μ l. La pureza radioquímica se determinó mediante cromatografía en capa fina sobre en gel de sílice (ITLC, Pall Corporation, Portsmouth, RU), utilizando metanol al 85 % como fase móvil. Se inyectó por vía intravenosa un volumen de 100 μ l del diacuerpo marcado a través de la vena de la cola, en dos ratones C3H portadores de artritis 24 horas después de la inyección de la BSAm. Cuatro y 22 horas más tarde, los ratones se anestesiaron mediante inyección i.p. de ketamina/xilacina. Se obtuvieron imágenes de los ratones en un escáner NanoSPECT/CT (Bioscan Inc, Washington, EE. UU.), utilizando una configuración de cuatro detectores/orificios de 36 x 1,4 mm. Se adquirieron 30-50.000 cuentas para el estudio por SPECT durante 20-50 minutos.

Obtención de imágenes del emplazamiento de 1-11E en la pata inflamada

5 Las imágenes de SPECT y CT procedentes de la cámara NanoSPECT/CT se fusionaron y se presentaron utilizando el programa informático PMOD. Figura 4 muestra una imagen representativa adquirida 22 horas después de la inyección del radiotrazador. Se observa claramente una captación aumentada de radioactividad en la pata trasera izquierda (inflamada) con respecto a la derecha (pata normal).

Ejemplo 10: Tinción de cartílago en un modelo de AR de ratón

10 Se observó tinción de cartílago en el modelo de BSAm de ratón descrito anteriormente en el Ejemplo 8, con la excepción de que se usaron ratones C57BL.

15 Los ratones se sensibilizaron con BSAm (100 µg) en AFC por vía intradérmica en la base de la cola y 14 días después se expusieron por vía intrarticular (ambas rodillas) o intraplantar (derecha, solución salina en la izquierda) a 500 µg de BSAm en solución salina.

La tinción del cartílago se muestra en Figura 8.

20 Pata: 12 horas después de la exposición a BSAm, la pata derecha estaba extremadamente inflamada en la región subplantar (observado por tinción con hematoxilina y eosina (HyE)), como se muestra en las Figuras 8A y 8B. El cartílago en las patas con BSAm se tiñe de forma uniforme y fuerte mediante 1-11E, como se muestra en las figuras 8C y 8D. La pata izquierda, inyectada con solución salina, no tenía inflamación subplantar. Algunos cartílagos dentro de las articulaciones de la pata izquierda se tiñeron de forma heterogénea, lo que tal vez está asociado con osteoartritis espontánea.

25 Ejemplo 11: Tinción de la articulación en un modelo de OA de ratón

Se observó la tinción en ratones con lesión de la superficie articular.

30 Para estos experimentos, se utilizaron ratones macho C57BL/6 de siete semanas de edad (Dell'Accio F y *et al.*, Arthritis Res Ther. 2006; 8(5):R139). Los ratones se anestesiaron y sometieron a una artrotomía pararrotuliana medial. El surco rotuliano se expuso mediante una luxación rotuliana lateral. Se realizó una lesión longitudinal completa en el surco rotuliano utilizando un dispositivo hecho a medida, en el que la longitud de una aguja 26G estaba limitada por una perla de vidrio (rodilla lesionada). Después, la luxación rotuliana se redujo y la cápsula articular y la piel se suturaron en capas separadas. Los animales se sacrificaron después de 4 semanas y las rodillas se diseccionaron para el análisis histológico e histoquímico.

35 Los métodos de tinción son como se expone anteriormente en el Ejemplo 6, excepto en que se utilizaron un anti-myc de conejo seguido de un anti-conejo-HRP para evitar en el tejido la reactividad cruzada con el anticuerpo de ratón.

40 Como se muestra en la Figura 9, hay una fuerte tinción en el sitio de la lesión.

Ejemplo 12: Producción de proteínas de fusión: 1-11E con citoquinas antiinflamatorias

45 Clonación de IFN-beta/1-11E

pFastBac1.AH se creó a partir de pFastBacI (Invitrogen), cortando un fragmento BamHI/HindIII que contenía múltiples sitios de clonación (MCS) y reemplazando con un enlazador para proporcionar otro MCS de BamHI-KpnI-HindIII-ApaI.

50 El interferón b de ratón (IFNbr) se clonó en los sitios HindIII-EcoRI, seguido de un sitio de escisión de MMP y 1-11E, que se clonaron en los sitios NotI y ApaI, como se muestra en Figura 10A. El sitio de escisión de MMP puede escindirse por MMP-1 y MMP-3.

55 El interferón beta de ratón se amplificó con los siguientes cebadores:

directo: mIFNBHindFOR 5' get aag ctt atg aac aac agg tgg atT 3' HindIII Inicio *

inverso:

60 mIFNB EcoRIREV 5' CGC GAA TTC GTT TTG GAA GTT TCT GGT 3'

1-11E se amplificó con los siguientes cebadores:

65 directo:

ES 2 663 381 T3

NotI1-11Efor: 5'cag GC GGC CGC a ATG GCC GAG GTG CAG CTG 3' NotI * Inicio

inverso:

5 1-11EApARev 5' CTTGGGCCCTCAATGGTGGTGGTGGTGGTCTAGACCGTTTGATTCCAC CTT 3'

1-11E se amplificó con extremos NotI/ApaI para incluir una etiqueta de histidina (His) y después se clonó en FastBac1.AH IFN-br/MMP/SP/His y se cortó con NotI/ApaI para liberar SP/His.

10 La construcción de IFN-beta/His se clonó amplificando IFN-br con HindIII/ApaI, con los siguientes cebadores:

directo (este cebador es el mismo que el cebador utilizado para la clonación de IFN-b/MMP/1-11F/His):

15 mIFNBHindFOR 5' get aag ctt atg aac aac agg tgg atT 3' HindIII Inicio *
cebador inverso:

mIFN-bApARev 5'

20 CTTGGGCCCTCAATGGTGGTGGTGGTGGTCTAGAGTTTTGGAAGTTTCT GGT3'

Estas construcciones se transformaron en células DHIOBac de Invitrogen y la secuencia se confirmó como sigue:

IFN-beta/MMP/ 1-11E / His (50,4 kDa)

MNNRWILHAAFLLCFSTTALSINYKQLQLQERTNIRKQCELLEQLNGKIN 50
LTYRADFKIPMEMTEKMOKSYTAFAIQEMLQNVFLVFRNNFSSTGWNETHI 100
VVRLLEDLHQQTIVFLKTVLEEKQEERLTWEMSSSTALHLKSYWVRVQRYLK 150
LMKYNSYAWMVVRAEIFRNFLIIRRLTRNFQNEFGGGGSPLGLWAGGGSA 200
AAMAEVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE 250
WVSSIDDSGATTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC 300
AKNYSSFDYWGQGTIVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSAS 350
VGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYASSLQSGVPSRFSG 400
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAANYPTTFGQGTKVEIKRDIHHHH 450
HH*

25

Dentro de esta secuencia, la porción de IFN-beta es del aminoácido 1 al 182 es como sigue:

MNNRWILHAAFLLCFSTTALSINYKQLQLQERTNIRKQCELLEQLNGKIN 50
LTYRADFKIPMEMTEKMOKSYTAFAIQEMLQNVFLVFRNNFSSTGWNETHI 100
VVRLLEDLHQQTIVFLKTVLEEKQEERLTWEMSSSTALHLKSYWVRVQRYLK 150
LMKYNSYAWMVVRAEIFRNFLIIRRLTRNFQN

30

La porción enlazadora de MMP es del aminoácido 183 al 202 es como sigue:

EFGGGGSPLGLWAGGGSA 200
AA

35 La porción de 1-11E es del aminoácido 203 al 446 es como sigue:

MAEVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE 250
WVSSIDDSGATTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC 300
AKNYSSFDYWGQGTIVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSAS 350
VGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYASSLQSGVPSRFSG 400
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAANYPTTFGQGTKVEIKRDI

La porción de etiqueta His es del aminoácido 448 al 502 es como sigue:

HHHH 450
HH*

IFN-beta / His (23,2 kDa)

5 MNNRWILHAAFLLCFSTTALSINYKQLQLQERTNIRKQCQELLEQLNGKIN 50
LTYRADFKIPMEMTEKMOKSYTAFAIQEMLQNVFLVFRNNFSSTGWNETI 100
VVRLLEDLHQQTVFLKTVLEEKQEERLTWEMSSTALHLKSYWVRVQRYLK 150
LMKYNSYAWMVVRAEIFRNFLIIRRLTRNFQNDIHHHHHH*

Dentro de esta secuencia, la porción de IFN-beta es del aminoácido 1 al 184 es como sigue:

10 MNNRWILHAAFLLCFSTTALSINYKQLQLQERTNIRKQCQELLEQLNGKIN 50
LTYRADFKIPMEMTEKMOKSYTAFAIQEMLQNVFLVFRNNFSSTGWNETI 100
VVRLLEDLHQQTVFLKTVLEEKQEERLTWEMSSTALHLKSYWVRVQRYLK 150
LMKYNSYAWMVVRAEIFRNFLIIRRLTRNFQNDI

La porción de etiqueta His es del aminoácido 185 al 190 es como sigue:

HHHHHH*

15 El protocolo para la expresión de las construcciones se muestra en la Figura 11.

Brevemente, se transforman las construcciones en células competentes DHIOBac (Invitrogen) para generar vectores de báculo. Los vectores de báculo recombinantes se confirmaron mediante exploración por azul-blanco y PCR, de acuerdo con las instrucciones de Invitrogen. El ADN de báculo se transfirió en células de insecto Sf9 usando cellfectina, de acuerdo con las instrucciones de Invitrogen.

20 Se recogió baculovirus (PI) del sobrenadante de las células transfectadas y se utilizó para infectar células Sf9 recién preparadas para amplificar las reservas de virus. El virus de P3 se utilizó para infectar células de insecto High 5 durante 72 horas, y el sobrenadante se recogió y procesó en un gel de SDS-PAGE. Las proteínas recombinantes se detectaron mediante transferencia de Western utilizando un anticuerpo anti-tetra-His (Qiagen) y uno anti-ratón HPR (Sigma).

La expresión de prueba de las construcciones de las fusiones se muestra en la Figura 12.

30 Proteínas de fusión: 1-11E/C7 con TNFR2-Fc

Clonación de TNFR2-Fc/1-11E y TNFR2-Fc/C7

35 pFastBac1.AH se creó a partir de pFastBac1 (Invitrogen), cortando un fragmento BamHI/HindIII que contenía múltiples sitios de clonación (MCS) y reemplazando con un enlazador para proporcionar otro MCS de BamHI-KpnI-HindIII-ApaI.

40 TNFR2Fc se clonó en los sitios HindIII-EcoRI, seguido de un sitio de escisión de MMP y un scFv (1-11E o C7), los cuales se clonaron en los sitios NotI y ApaI, como se muestra en Figura 10B.

TNFR2 de ratón se amplificó con los siguientes cebadores:

cebador directo: 5' GCT aag ctt ATG GCG CCC GCC GCC CTC 3'
cebador inverso: 5' CTTGAATTCTTTACCCAGAGACCGGGA 3'

45 1-11E se amplificó con los mismos cebadores anteriores para el INFβ.

La secuencia de TNFR2Fc/MMP/1-11E es como sigue:

MAPAALWVALVFELQLWATGHTVPAQVVLTPYKPEPGYECQISQEYYDRK
 AQMCCAACPPGQYVKHFCNKTSDTVACDCEASMYTQVWNQFRTCLSCSSS
 CTTDQVEIRACTKQQNRVCACEAGRYCALKTHSGSCRQCMRLSKCGPGFG
 VASSRAPNGNVLCKACAPGTFSDTTSSTDVCRPHRICALAI PGNASTDA
 VCAPESDGS PPLKECPPCAAPDLLGGPSVFI FPPKIKDVLMLISLSPMVT
 VVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH
 DWMSGKEFKCKVNNRALPSPIEKTISKPRGPVVRAPQVYVLP PPAEEMTKK
 EFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSYFMYSKLR
 VQKSTWERSLFCSSVHEGLHNHLTTKTI SRSLGK--- EFGGGGSPLGL
 WAGGGSAAA---MAEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW
 VRQAPGKGLEWVSSIDDSGATTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN
 SLRAEDTAVYYCAKNYSSFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGG
 STDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQKPKAPKLLI
 YASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQAANYPTTF
 GQGTKVEIKRDIHHHHHH

De esta secuencia, la porción TNFR2Fc es como sigue:

MAPAALWVALVFELQLWATGHTVPAQVVLTPYKPEPGYECQISQEYYDRK 50
 AQMCCAACPPGQYVKHFCNKTSDTVACDCEASMYTQVWNQFRTCLSCSSS 100
 CTTDQVEIRACTKQQNRVCACEAGRYCALKTHSGSCRQCMRLSKCGPGFG 150
 VASSRAPNGNVLCKACAPGTFSDTTSSTDVCRPHRICALAI PGNASTDA 200
 VCAPESDGS PPLKECPPCAAPDLLGGPSVFI FPPKIKDVLMLISLSPMVT 250
 VVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH 300
 DWMSGKEFKCKVNNRALPSPIEKTISKPRGPVVRAPQVYVLP PPAEEMTKK 350
 EFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSYFMYSKLR 400
 5 VQKSTWERSLFCSSVHEGLHNHLTTKTI SRSLGK*

La porción enlazadora de MMP es como sigue:

10 EFGGGGSPLGLWAGGGSAAA

La porción 1-11E es como sigue:

MAEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE
 WVSSIDDSGATTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN
 SLRAEDTAVYYCAKNYSSFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGG
 STDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQKPKAPKLLI
 YASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQAANYPTTF
 GQGTKVEIKRDI

15 La etiqueta His es como sigue:

HHHHHH*

20 Como control negativo se desarrolló un scFv no específico que se une a lisozima de huevo de gallina (LHG). El clon C7 fue el que se expresó mejor y se continuó con él para la fusión TNFR2Fc como se hizo para 1-11E.

Secuencia de TNFR2Fc/MMP/C7:

MAPAALWVALVFELQLWATGHTVPAQVVLTPYKPEPGYECQISQEYYDRK
 AQMCCAKCPPGQYVKHFCNKTSDTV CADCEASMYTQVWNQFRTCLSCSSS
 CTTDQVEIRACTKQQNRVCACEAGRYCALKTHSGSCRQCMRLSKCGPGFG
 VASSRAPNGNVLCKACAPGTFSDTTSSTDVCRPHRICALAI PGNASTDA
 VCAPESDGSPLKECPPCAAPDLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLS PMVTC
 VVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQ
 DWMSGKEFKCKVNNRALPSPIEKTISKPRGPVRAPQVYVLP PPAEEMTKK
 EFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSYFMYSKLR
 VQKSTWERSL FACSVVHEGLHNHLTTKTI SRSLGKEFGGGG SPLGLWAGG
 GSAAAMA EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKG
 LEWVSTISYAGASTAYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYY
 CAKTSTSF DYWGQGLVTVSTDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQSISS
 YLNWYQQKPGKAPKLLIYNASYLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
 FATYYCQQAYAGPYTFGQGTKVEIKRDIHHHHH*

5 De esta secuencia, la porción TNFR2Fc es como sigue:

MAPAALWVALVFELQLWATGHTVPAQVVLTPYKPEPGYECQISQEYYDRK 50
 AQMCCAKCPPGQYVKHFCNKTSDTV CADCEASMYTQVWNQFRTCLSCSSS 100
 CTTDQVEIRACTKQQNRVCACEAGRYCALKTHSGSCRQCMRLSKCGPGFG 150
 VASSRAPNGNVLCKACAPGTFSDTTSSTDVCRPHRICALAI PGNASTDA 200
 VCAPESDGSPLKECPPCAAPDLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLS PMVTC 250
 VVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQ 300
 DWMSGKEFKCKVNNRALPSPIEKTISKPRGPVRAPQVYVLP PPAEEMTKK 350
 EFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSYFMYSKLR 400
 VQKSTWERSL FACSVVHEGLHNHLTTKTI SRSLGK*

La porción enlazadora de MMP es como sigue:

10 EFGGGG SPLGLWAGG SAAA

La porción C7 es como sigue:

15 MAEVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFT
 FSSYAMSWVRQAPGKLEWVSTISYAGASTAYADSVKGRFTISRDN SKNT
 LYLQMN SLRAEDTAVYYCAKTSTSF DYWGQGLVTVSTDIQMTQSPSSLS
 ASV GDRVTITCRASQSISS YLNWYQQKPGKAPKLLIYNASYLQSGVPSRF
 SGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQAYAGPYTFGQGTKVEIKRDI

La etiqueta His es como sigue:

20 HHHHHH*

El protocolo para la expresión de las construcciones se muestra en Figura 11 y es como se describe anteriormente para la proteína de fusión IFN-beta/1-11E.

25 Las células Hi-5 infectadas se cultivaron durante 3 días a 27 °C. Después de 3 días, se tomaron distintas alícuotas para el análisis de transferencia Western, de 100, 50, 25 y 12 microlitros de sobrenadante celular. La proteína de fusión se analizó con anticuerpos anti-etiqueta His. Como se muestra en la Figura 13, el peso molecular aparente de las proteínas de fusión TNFR2Fc está ligeramente por encima de 75 kDa, lo que refleja el TNFR2Fc de 50 Da más el scFv de 30 kDa predichos.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Queen Mary & Westfield College

<120> Nuevo anticuerpo y su uso en el diagnóstico y terapia de artropatías

35

ES 2 663 381 T3

<130> P42632EP-K

<140> EP08737154.8

<141> 02-05-2008

5

<150> PCT/GB2008/001526

<151> 02-05-2008

<150> GB0708585.5

<151> 03-05-2007

10

<160> 223

<170> PatentIn version 3.3

15

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 1

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

Gly

25

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 2

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

Gly

35

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 3

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

Gly

45

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

ES 2 663 381 T3

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

Gly

5 <210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 5

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

10 Gly

15 <210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 6

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

20 Gly

25 <210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 7

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

Gly

30 <210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
35 <400> 8

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

Gly

ES 2 663 381 T3

5
<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 9
Ser Ile Asn Asp Ser Gly Thr Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10
<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15
<400> 10

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

Gly

20
<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25
<400> 11

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

Gly

30
<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

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

35
Gly

40
<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 13

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

Gly

ES 2 663 381 T3

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5
<400> 14
Ser Ile Asp Asp Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

10
<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

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

20
<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25
<400> 16
Ser Ile Ser Thr Asn Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

30
<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 17
Ser Ile Asp Thr Thr Gly Thr Thr Thr Tyr Phe Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

35
<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40
<400> 18
Thr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

ES 2 663 381 T3

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 19

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

Gly

10

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 20

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

Gly

20

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25

<400> 21

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

Gly

30

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

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

Gly

35

40

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 23

ES 2 663 381 T3

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

Gly

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 24

5

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

Gly

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 25

10

15

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

Gly

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 26

20

25

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

Gly

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 27

30

35

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

Gly

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40

ES 2 663 381 T3

<400> 28

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

Gly

5 <210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 29

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

Gly

15 <210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 30

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

Gly

25 <210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 31

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

Gly

30 <210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 32

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

Gly

40

ES 2 663 381 T3

<210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 33

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

Gly

10

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 34

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

Gly

20

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25

<400> 35

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

Gly

30

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 36

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

35

Gly

40

<210> 37
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 37

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

45

Gly

ES 2 663 381 T3

<210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 38

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

Gly

10

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 39

Gly Ala Gly Ser Phe Asp Tyr
1 5

20

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25

<400> 40

Gly Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr
1 5

30

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 41

35

Gly Tyr Gly Ser Phe Asp Tyr
1 5

40

<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 42

45

Gly Tyr Ser Ser Phe Asp Tyr
1 5

50

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 663 381 T3

<400> 43

Gly Tyr Thr Ala Phe Asp Tyr
1 5

5 <210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 44

Asn Ser Thr Tyr Phe Asp Tyr
1 5

15 <210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 45

Asn Tyr Ala Ser Phe Asp Tyr
1 5

25 <210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 46

30 Asn Tyr Ser Ala Phe Asp Tyr
1 5

35 <210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 47

40 Asn Tyr Ser Asp Phe Asp Tyr
1 5

45 <210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 48

50 Asn Tyr Ser Ser Phe Asp Tyr
1 5

55 <210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 663 381 T3

<400> 49

Asn Tyr Ser Thr Phe Asp Tyr
1 5

5 <210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 50

Asn Tyr Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5

15 <210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 51

Asn Tyr Thr Ala Phe Asp Tyr
1 5

25 <210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 52

30 Asn Tyr Thr Asp Phe Asp Tyr
1 5

35 <210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 53

40 Asn Tyr Thr Tyr Phe Asp Tyr
1 5

45 <210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 54

Ser Tyr Ala Asp Phe Asp Tyr
1 5

50 <210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 663 381 T3

<400> 55
Ser Tyr Ala Thr Phe Asp Tyr
1 5

5 <210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 56
Ser Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr
1 5

15 <210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 57
Ser Tyr Ser Asn Phe Asp Tyr
1 5

25 <210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 58
Ser Tyr Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5

30 <210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 59
Ser Tyr Thr Thr Phe Asp Tyr
1 5

40 <210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 60
Thr Tyr Gly Thr Phe Asp Tyr
1 5

50 <210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

55

ES 2 663 381 T3

<400> 61

Ala Ala Ser Ala Leu Gln Ser
1 5

5 <210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 62

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

15 <210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 63

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

25 <210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 64

Ala Ala Ser Tyr Leu Gln Ser
1 5

30 <210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 65

Tyr Ala Ser Tyr Leu Gln Ser
1 5

40 <210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 66

Ser Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

50 <210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

55

ES 2 663 381 T3

<400> 67

Ala Ala Ser Asp Leu Gln Ser
1 5

5 <210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 68

Asn Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

15 <210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 69

Thr Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

25 <210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 70

30 Ser Ala Ser Ala Leu Gln Ser
1 5

35 <210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 71

40 Thr Ala Ser Ala Leu Gln Ser
1 5

45 <210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 72

50 Ser Ala Ser Asp Leu Gln Ser
1 5

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 663 381 T3

<400> 73

Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

5 <210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 74

Asp Ala Ser Gly Leu Gln Ser
1 5

15 <210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 75

Ser Ala Ser Tyr Leu Gln Ser
1 5

25 <210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 76

30 Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

35 <210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 77

40 Thr Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

45 <210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 78

50 Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

55 <210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 663 381 T3

<400> 79

Ser Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

5 <210> 80
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 80

Thr Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

15 <210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 81

Gly Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

25 <210> 82
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 82

30 Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

35 <210> 83
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 83

40 Asp Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

45 <210> 84
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 84

Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

50 <210> 85
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 663 381 T3

<400> 85

Thr Ala Ser Tyr Leu Gln Ser
1 5

5 <210> 86
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 86

Gln Gln Ser Ser Ser Thr Pro Thr Thr
1 5

15 <210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 87

Gln Gln Asn Tyr Gly Tyr Pro Asn Thr
1 5

25 <210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 88

30 Gln Gln Ala Asn Ser Ser Pro Asp Thr
1 5

35 <210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 89

40 Gln Gln Thr Ser Ser Ser Pro Asp Thr
1 5

45 <210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 90

50 Gln Gln Ala Asp Ser Thr Pro Thr Thr
1 5

55 <210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 663 381 T3

<400> 91
Gln Gln Ala Ala Thr Ser Pro Thr Thr
1 5
5 <210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
10 <400> 92
Gln Gln Gly Ser Ala Ser Pro Ser Thr
1 5
15 <210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
20 <400> 93
Gln Gln Ser Asp Ser Ala Pro Thr Thr
1 5
25 <210> 94
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 94
30 Gln Gln Ser Asp Thr Tyr Pro Ser Thr
1 5
35 <210> 95
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 95
40 Gln Gln Ser Tyr Ala Ser Pro Thr Thr
1 5
45 <210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 96
50 Gln Gln Thr Gly Ser Tyr Pro Thr Thr
1 5
<210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
55

ES 2 663 381 T3

<400> 97

Gln Gln Gly Asp Ser Tyr Pro Thr Thr
1 5

5 <210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 98

Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Thr Thr
1 5

15 <210> 99
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 99

Gln Gln Ser Ser Tyr Thr Pro Thr Thr
1 5

25 <210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 100

30 Gln Gln Ala Ala Asn Tyr Pro Thr Thr
1 5

35 <210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 101

40 Gln Gln Ala Ser Asn Tyr Pro Thr Thr
1 5

45 <210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 102

Gln Gln Gly Asp Thr Ser Pro Thr Thr

1

5

50 <210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 663 381 T3

<400> 103

Gln Gln Gly Tyr Ser Ala Pro Thr Thr
 1 5

5 <210> 104
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 104

Gln Gln Gly Tyr Thr Ser Pro Thr Thr
 1 5

15 <210> 105
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 105

Gln Gln Asn Asn Tyr Tyr Pro Thr Thr
 1 5

25 <210> 106
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 106

30 Gln Gln Ser Asp Ala Tyr Pro Thr Thr
 1 5

35 <210> 107
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 107

40 Thr Ser Asn Tyr Pro Thr Thr Gln Gln
 1 5

45 <210> 108
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 108

Gln Gln Ser Asn Ala Thr Pro Thr Thr
 1 5

50 <210> 109
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55

ES 2 663 381 T3

<400> 109

Gln Gln Ala Ala Gly Asn Pro Thr Thr
 1 5

5 <210> 110
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 110

Gln Gln Gly Ser Asp Tyr Pro Thr Thr
 1 5

15 <210> 111
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 111

Gln Gln Gly Ser Thr Ala Pro Thr Thr
 1 5

25 <210> 112
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 112

30 Gln Gln Ser Thr Ala Ser Pro Ser Thr
 1 5

35 <210> 113
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 113

40 Gln Gln Thr Ser Ser Tyr Pro Thr Thr
 1 5

45 <210> 114
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 114

Gln Gln Gly Ala Gly Ser Pro Ser Thr
 1 5

50 <210> 115
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55

ES 2 663 381 T3

| | | | | | | | | | | |
|----|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | <400> 115 | | | | | | | | | |
| | | Gln | Gln | Arg | Asn | Thr | Ser | Pro | Thr | Thr |
| | | 1 | | | | 5 | | | | |
| 5 | <210> 116 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> | | | | | | | | | |
| 10 | <400> 116 | | | | | | | | | |
| | | Gln | Gln | Ser | Asn | Thr | Ser | Pro | Ala | Thr |
| | | 1 | | | | 5 | | | | |
| 15 | <210> 117 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> | | | | | | | | | |
| 20 | <400> 117 | | | | | | | | | |
| | | Gln | Gln | Ala | Tyr | Thr | Ala | Pro | Thr | Thr |
| | | 1 | | | | 5 | | | | |
| 25 | <210> 118 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> | | | | | | | | | |
| 30 | <400> 118 | | | | | | | | | |
| | | Gln | Gln | Ala | Asp | Thr | Tyr | Pro | Thr | Thr |
| | | 1 | | | | 5 | | | | |
| 35 | <210> 119 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> | | | | | | | | | |
| 40 | <400> 119 | | | | | | | | | |
| | | Gln | Gln | Ala | Ala | Asn | Ser | Pro | Asp | Thr |
| | | 1 | | | | 5 | | | | |
| 45 | <210> 120 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> | | | | | | | | | |
| 50 | <400> 120 | | | | | | | | | |
| | | Gln | Gln | Thr | Ser | Asp | Tyr | Pro | Asn | Thr |
| | | 1 | | | | 5 | | | | |
| 55 | <210> 121 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> | | | | | | | | | |

ES 2 663 381 T3

<400> 121

Gln Gln Ala Ser Thr Ser Pro Thr Thr
 1 5

5 <210> 122
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 122

Gln Gln Ala Ser Asp Tyr Pro Thr Thr
 1 5

15 <210> 123
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 123

Gln Gln Ser Ser Ser Asn Pro Thr Thr
 1 5

25 <210> 124
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 124

30 Gln Gln Gly Ser Asn Ser Pro Thr Thr
 1 5

35 <210> 125
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 125

40 Gln Gln Ser Ala Thr Thr Pro Asp Thr
 1 5

45 <210> 126
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 126

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

50 <210> 127
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

55

ES 2 663 381 T3

<220>
<223> Cebador LMB-3

5 <400> 127

Cys Ala Gly Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Cys Thr Ala Thr Gly Ala
1 5 10 15

Cys

10 <210> 128
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Cebador Fd-Seq
<400> 128

Gly Ala Ala Thr Thr Thr Thr Cys Thr Gly Thr Ala Thr Gly Ala Gly
1 5 10 15

Gly

20 <210> 129
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Cebador mIFNBHindFOR

<400> 129
gctaagctta tgaacaacag gtggatt 27

30 <210> 130
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> Cebador mIFNBcoRIREV

<400> 130
cgcgaattcg ttttgaagt ttctggt 27

40 <210> 131
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> Cebador NotI1-11Efor

50 <400> 131
caggcgccg caatggccga ggtgcagctg 30

55 <210> 132
<211> 54
<212> ADN
<213> Artificial

ES 2 663 381 T3

<220>

<223> Cebador 1-11EapaRev

<400> 132

5 cttgggccct caatggtggt ggtgatggtg tctagaccgt ttgattcca cctt 54

<210> 133

<211> 54

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador mIFN-bApaRev

<400> 133

15 cttgggccct caatggtggt ggtgatggtg tctagagttt tgaagtttc tggc 54

<210> 134

<211> 452

<212> PRT

20 <213> *Mus musculus*

<400> 134

Met Asn Asn Arg Trp Ile Leu His Ala Ala Phe Leu Leu Cys Phe Ser
1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Ile Asn Tyr Lys Gln Leu Gln Leu Gln Glu Arg
20 25 30

Thr Asn Ile Arg Lys Cys Gln Glu Leu Leu Glu Gln Leu Asn Gly Lys
35 40 45

Ile Asn Leu Thr Tyr Arg Ala Asp Phe Lys Ile Pro Met Glu Met Thr
50 55 60

Glu Lys Met Gln Lys Ser Tyr Thr Ala Phe Ala Ile Gln Glu Met Leu
65 70 75 80

Gln Asn Val Phe Leu Val Phe Arg Asn Asn Phe Ser Ser Thr Gly Trp
85 90 95

Asn Glu Thr Ile Val Val Arg Leu Leu Asp Glu Leu His Gln Gln Thr
100 105 110

Val Phe Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Gln Glu Glu Arg Leu Thr
115 120 125

Trp Glu Met Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Lys Ser Tyr Tyr Trp Arg
130 135 140

Val Gln Arg Tyr Leu Lys Leu Met Lys Tyr Asn Ser Tyr Ala Trp Met
145 150 155 160

25

ES 2 663 381 T3

Val Val Arg Ala Glu Ile Phe Arg Asn Phe Leu Ile Ile Arg Arg Leu
 165 170 175
 Thr Arg Asn Phe Gln Asn Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Pro Leu Gly
 180 185 190
 Leu Trp Ala Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala Met Ala Glu Val Gln Leu
 195 200 205
 Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 210 215 220
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp
 225 230 235 240
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Asp
 245 250 255
 Asp Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 260 265 270
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 275 280 285
 Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn Tyr
 290 295 300
 Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 305 310 315 320
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr
 325 330 335
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 340 345 350
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 355 360 365
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 370 375 380
 Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 385 390 395 400
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 405 410 415
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Ala Asn Tyr Pro Thr
 420 425 430

ES 2 663 381 T3

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Asp Ile His His
 435 440 445

His His His His
 450

<210> 135
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 135

Met Asn Asn Arg Trp Ile Leu His Ala Ala Phe Leu Leu Cys Phe Ser
 1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Ile Asn Tyr Lys Gln Leu Gln Leu Gln Glu Arg
 20 25 30

Thr Asn Ile Arg Lys Cys Gln Glu Leu Leu Glu Gln Leu Asn Gly Lys
 35 40 45

Ile Asn Leu Thr Tyr Arg Ala Asp Phe Lys Ile Pro Met Glu Met Thr
 50 55 60

Glu Lys Met Gln Lys Ser Tyr Thr Ala Phe Ala Ile Gln Glu Met Leu
 65 70 75 80

Gln Asn Val Phe Leu Val Phe Arg Asn Asn Phe Ser Ser Thr Gly Trp
 85 90 95

Asn Glu Thr Ile Val Val Arg Leu Leu Asp Glu Leu His Gln Gln Thr
 100 105 110

Val Phe Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Gln Glu Glu Arg Leu Thr
 115 120 125

Trp Glu Met Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Lys Ser Tyr Tyr Trp Arg
 130 135 140

Val Gln Arg Tyr Leu Lys Leu Met Lys Tyr Asn Ser Tyr Ala Trp Met
 145 150 155 160

Val Val Arg Ala Glu Ile Phe Arg Asn Phe Leu Ile Ile Arg Arg Leu
 165 170 175

Thr Arg Asn Phe Gln Asn
 180

10

<210> 136
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

ES 2 663 381 T3

<400> 136

Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Pro Leu Gly Leu Trp Ala Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala
20

5 <210> 137
<211> 244
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <400> 137

ES 2 663 381 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 Ser Ile Asp Asp Ser Gly Ala Thr Thr Tyr 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 Tyr Ser Ser 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 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 Tyr Ala Ser Ser 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
 Ala Ala Asn Tyr Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 225 230 235 240
 Lys Arg Asp Ile

ES 2 663 381 T3

<210> 138
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 5
 <400> 138

 His His His His His His
 1 5

 10
 <210> 139
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 15
 <400> 139

 Met Asn Asn Arg Trp Ile Leu His Ala Ala Phe Leu Leu Cys Phe Ser
 1 5 10 15

 Thr Thr Ala Leu Ser Ile Asn Tyr Lys Gln Leu Gln Leu Gln Glu Arg
 20 25 30

 Thr Asn Ile Arg Lys Cys Gln Glu Leu Leu Glu Gln Leu Asn Gly Lys
 35 40 45

 Ile Asn Leu Thr Tyr Arg Ala Asp Phe Lys Ile Pro Met Glu Met Thr
 50 55 60

 Glu Lys Met Gln Lys Ser Tyr Thr Ala Phe Ala Ile Gln Glu Met Leu
 65 70 75 80

 Gln Asn Val Phe Leu Val Phe Arg Asn Asn Phe Ser Ser Thr Gly Trp
 85 90 95

 Asn Glu Thr Ile Val Val Arg Leu Leu Asp Glu Leu His Gln Gln Thr
 100 105 110

 Val Phe Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Gln Glu Glu Arg Leu Thr
 115 120 125

 Trp Glu Met Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Lys Ser Tyr Tyr Trp Arg
 130 135 140

 Val Gln Arg Tyr Leu Lys Leu Met Lys Tyr Asn Ser Tyr Ala Trp Met
 145 150 155 160

 Val Val Arg Ala Glu Ile Phe Arg Asn Phe Leu Ile Ile Arg Arg Leu
 165 170 175

 Thr Arg Asn Phe Gln Asn Asp Ile His His His His His His
 180 185 190

 20
 <210> 140
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

ES 2 663 381 T3

<400> 140

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

5 <210> 141
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador directo para TNFR2-Fc de ratón

<400> 141
 gctaagctta tggcgcccg cgcctc 27

15 <210> 142
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador inverso para TNFR2-Fc de ratón

ES 2 663 381 T3

<400> 142
cttgaattct ttaccagag accggga 27

5
<210> 143
<211> 706
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10
<400> 143
Met Ala Pro Ala Ala Leu Trp Val Ala Leu Val Phe Glu Leu Gln Leu
1 5 10 15
Trp Ala Thr Gly His Thr Val Pro Ala Gln Val Val Leu Thr Pro Tyr
20 25 30
Lys Pro Glu Pro Gly Tyr Glu Cys Gln Ile Ser Gln Glu Tyr Tyr Asp
35 40 45
Arg Lys Ala Gln Met Cys Cys Ala Lys Cys Pro Pro Gly Gln Tyr Val
50 55 60
Lys His Phe Cys Asn Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Ala Asp Cys Glu
65 70 75 80
Ala Ser Met Tyr Thr Gln Val Trp Asn Gln Phe Arg Thr Cys Leu Ser
85 90 95
Cys Ser Ser Ser Cys Thr Thr Asp Gln Val Glu Ile Arg Ala Cys Thr
100 105 110
Lys Gln Gln Asn Arg Val Cys Ala Cys Glu Ala Gly Arg Tyr Cys Ala
115 120 125
Leu Lys Thr His Ser Gly Ser Cys Arg Gln Cys Met Arg Leu Ser Lys
130 135 140
Cys Gly Pro Gly Phe Gly Val Ala Ser Ser Arg Ala Pro Asn Gly Asn

ES 2 663 381 T3

420 425 430
 Ser Leu Gly Lys Glu Phe Gly Gly Gly Ser Pro Leu Gly Leu Trp
 435 440 445
 Ala Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Leu Glu
 450 455 460
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 465 470 475 480
 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg
 485 490 495
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Asp Asp Ser
 500 505 510
 Gly Ala Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 515 520 525
 Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 530 535 540
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn Tyr Ser Ser
 545 550 555 560
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 565 570 575
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Thr Asp Ile
 580 585 590
 Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 595 600 605
 Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 610 615 620
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr
 625 630 635 640
 Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 645 650 655
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 660 665 670
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Ala Asn Tyr Pro Thr Thr Phe
 675 680 685
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Asp Ile His His His His

ES 2 663 381 T3

690

695

700

His His
705

5

<210> 144
<211> 436
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 144

Met Ala Pro Ala Ala Leu Trp Val Ala Leu Val Phe Glu Leu Gln Leu
1 5 10 15
Trp Ala Thr Gly His Thr Val Pro Ala Gln Val Val Leu Thr Pro Tyr
20 25 30
Lys Pro Glu Pro Gly Tyr Glu Cys Gln Ile Ser Gln Glu Tyr Tyr Asp
35 40 45
Arg Lys Ala Gln Met Cys Cys Ala Lys Cys Pro Pro Gly Gln Tyr Val
50 55 60
Lys His Phe Cys Asn Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Ala Asp Cys Glu
65 70 75 80
Ala Ser Met Tyr Thr Gln Val Trp Asn Gln Phe Arg Thr Cys Leu Ser
85 90 95
Cys Ser Ser Ser Cys Thr Thr Asp Gln Val Glu Ile Arg Ala Cys Thr
100 105 110
Lys Gln Gln Asn Arg Val Cys Ala Cys Glu Ala Gly Arg Tyr Cys Ala
115 120 125
Leu Lys Thr His Ser Gly Ser Cys Arg Gln Cys Met Arg Leu Ser Lys
130 135 140
Cys Gly Pro Gly Phe Gly Val Ala Ser Ser Arg Ala Pro Asn Gly Asn
145 150 155 160
Val Leu Cys Lys Ala Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asp Thr Thr Ser
165 170 175
Ser Thr Asp Val Cys Arg Pro His Arg Ile Cys Ser Ile Leu Ala Ile
180 185 190
Pro Gly Asn Ala Ser Thr Asp Ala Val Cys Ala Pro Glu Ser Asp Gly
195 200 205
Ser Pro Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro Cys Ala Ala Pro Asp Leu Leu
210 215 220

10

ES 2 663 381 T3

Gly 225 Gly Pro Ser Val Phe 230 Ile Phe Pro Pro Lys 235 Ile Lys Asp Val Leu 240
 Met Ile Ser Leu Ser 245 Pro Met Val Thr Cys 250 Val Val Val Asp Val 255 Ser
 Glu Asp Asp Pro 260 Asp Val Gln Ile Ser 265 Trp Phe Val Asn Asn 270 Val Glu
 Val His Thr 275 Ala Gln Thr Gln Thr 280 His Arg Glu Asp Tyr 285 Asn Ser Thr
 Leu Arg Val Val Ser Ala Leu 295 Pro Ile Gln His Gln 300 Asp Trp Met Ser
 Gly 305 Lys Glu Phe Lys Cys 310 Lys Val Asn Asn Arg 315 Ala Leu Pro Ser Pro 320
 Ile Glu Lys Thr Ile 325 Ser Lys Pro Arg Gly 330 Pro Val Arg Ala Pro Gln 335
 Val Tyr Val Leu 340 Pro Pro Pro Ala Glu 345 Glu Met Thr Lys Lys 350 Glu Phe
 Ser Leu Thr 355 Cys Met Ile Thr Gly 360 Phe Leu Pro Ala Glu 365 Ile Ala Val
 Asp Trp Thr 370 Ser Asn Gly Arg 375 Thr Glu Gln Asn Tyr 380 Lys Asn Thr Ala
 Thr Val Leu Asp Ser Asp 390 Gly Ser Tyr Phe Met 395 Tyr Ser Lys Leu Arg 400
 Val Gln Lys Ser Thr 405 Trp Glu Arg Gly Ser 410 Leu Phe Ala Cys Ser Val 415
 Val His Glu Gly 420 Leu His Asn His Leu 425 Thr Thr Lys Thr Ile 430 Ser Arg
 Ser Leu Gly 435 Lys

<210> 145
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 145

10 Glu 1 Phe Gly Gly Gly 5 Ser Pro Leu Gly 10 Leu Trp Ala Gly Gly Gly
 Ser Ala Ala Ala 20

ES 2 663 381 T3

<210> 146
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 146

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 Ser Ile Asp Asp Ser Gly Ala Thr Thr Tyr 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 Tyr Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser 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 Tyr Ala Ser Ser 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
 Ala Ala Asn Tyr Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 225 230 235 240
 Lys Arg Asp Ile

10

ES 2 663 381 T3

<210> 147
 <211> 690
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 147

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

ES 2 663 381 T3

Lys Pro Glu₃₅ Pro Gly Tyr Glu Cys₄₀ Gln Ile Ser Gln Glu₄₅ Tyr Tyr Asp
 Arg Lys₅₀ Ala Gln Met Cys Cys₅₅ Ala Lys Cys Pro Pro₆₀ Gly Gln Tyr Val
 Lys His Phe Cys Asn Lys₇₀ Thr Ser Asp Thr Val₇₅ Cys Ala Asp Cys Glu₈₀
 Ala Ser Met Tyr Thr₈₅ Gln Val Trp Asn Gln₉₀ Phe Arg Thr Cys Leu Ser
 Cys Ser Ser Ser₁₀₀ Cys Thr Thr Asp Gln₁₀₅ Val Glu Ile Arg Ala₁₁₀ Cys Thr
 Lys Gln Gln₁₁₅ Asn Arg Val Cys Ala₁₂₀ Cys Glu Ala Gly Arg₁₂₅ Tyr Cys Ala
 Leu Lys₁₃₀ Thr His Ser Gly Ser₁₃₅ Cys Arg Gln Cys Met₁₄₀ Arg Leu Ser Lys
 Cys Gly Pro Gly Phe Gly₁₅₀ Val Ala Ser Ser Arg₁₅₅ Ala Pro Asn Gly Asn₁₆₀
 Val Leu Cys Lys Ala₁₆₅ Cys Ala Pro Gly Thr₁₇₀ Phe Ser Asp Thr Thr₁₇₅ Ser
 Ser Thr Asp Val₁₈₀ Cys Arg Pro His Arg₁₈₅ Ile Cys Ser Ile Leu Ala Ile
 Pro Gly Asn₁₉₅ Ala Ser Thr Asp Ala₂₀₀ Val Cys Ala Pro Glu₂₀₅ Ser Asp Gly
 Ser Pro₂₁₀ Pro Leu Lys Glu Cys₂₁₅ Pro Pro Cys Ala Ala₂₂₀ Pro Asp Leu Leu
 Gly Gly Pro Ser Val Phe₂₃₀ Ile Phe Pro Pro Lys₂₃₅ Ile Lys Asp Val Leu₂₄₀
 Met Ile Ser Leu Ser₂₄₅ Pro Met Val Thr Cys₂₅₀ Val Val Val Asp Val₂₅₅ Ser
 Glu Asp Asp Pro₂₆₀ Asp Val Gln Ile Ser₂₆₅ Trp Phe Val Asn Asn₂₇₀ Val Glu
 Val His Thr₂₇₅ Ala Gln Thr Gln Thr₂₈₀ His Arg Glu Asp Tyr₂₈₅ Asn Ser Thr
 Leu Arg₂₉₀ Val Val Ser Ala Leu₂₉₅ Pro Ile Gln His Gln₃₀₀ Asp Trp Met Ser

ES 2 663 381 T3

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ser Pro
305 310 315 320

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln
325 330 335

Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Met Thr Lys Lys Glu Phe
340 345 350

Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val
355 360 365

Asp Trp Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala
370 375 380

Thr Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg
385 390 395 400

Val Gln Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val
405 410 415

Val His Glu Gly Leu His Asn His Leu Thr Thr Lys Thr Ile Ser Arg
420 425 430

Ser Leu Gly Lys
435

5 <210> 149
<211> 20
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 149

Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Pro Leu Gly Leu Trp Ala Gly Gly Gly
1 5 10 15

10 Ser Ala Ala Ala
20

15 <210> 150
<211> 228
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 150

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

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

ES 2 663 381 T3

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

Trp Val Ser Thr Ile Ser Tyr Ala Gly Ala Ser Thr Ala 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 Thr Ser Thr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 115 120 125

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 130 135 140

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 145 150 155 160 165

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

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 180 185 190

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 195 200 205

Ala Tyr Ala Gly Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 210 215 220

Lys Arg Asp Ile
 225

5 <210> 151
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 151

10 Ala Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln
 1 5

15 <210> 152
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 663 381 T3

| | | | |
|----|--|--|--|
| | <400> 152 | | Gly Pro Gln Gly Leu Leu Gly Ala 1 5 |
| 5 | <210> 153 <211> 8 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> | | |
| 10 | <400> 153 | | Gly Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln 1 5 |
| 15 | <210> 154 <211> 8 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> | | |
| 20 | <400> 154 | | Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Ile 1 5 |
| 25 | <210> 155 <211> 8 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> | | |
| 30 | <400> 155 | | Gly Pro Glu Gly Leu Arg Val Gly 1 5 |
| 35 | <210> 156 <211> 8 <212> PRT <213> <i>Rattus sp.</i> | | |
| 40 | <400> 156 | | Ala Ala Tyr His Leu Val Ser Gln 1 5 |
| 45 | <210> 157 <211> 8 <212> PRT <213> <i>Rattus sp.</i> | | |
| 50 | <400> 157 | | Met Asp Ala Phe Leu Glu Ser Ser 1 5 |
| 55 | <210> 158 <211> 8 <212> PRT <213> <i>Rattus sp.</i> | | |

ES 2 663 381 T3

<400> 158

Glu Pro Gln Ala Leu Ala Met Ser
1 5

5 <210> 159
<211> 8
<212> PRT
<213> *Rattus* sp.

10 <400> 159

Gln Ala Leu Ala Met Ser Ala Ile
1 5

15 <210> 160
<211> 8
<212> PRT
<213> *Gallus* sp.

20 <400> 160

Pro Ser Tyr Phe Leu Asn Ala Gly
1 5

25 <210> 161
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 161

30 Tyr Glu Ala Gly Leu Gly Val Val
1 5

35 <210> 162
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 162

40 Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Arg
1 5

45 <210> 163
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 163

50 Ala Gly Leu Gly Ile Ser Ser Thr
1 5

55 <210> 164
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 663 381 T3

<400> 164

Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile
1 5

5 <210> 165
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 165

Ile Pro Glu Asn Phe Phe Gly Val
1 5

15 <210> 166
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 166

Thr Glu Gly Glu Ala Arg Gly Ser
1 5

25 <210> 167
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 167

30 Arg Ala Ile His Ile Gln Ala Glu
1 5

35 <210> 168
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 168

40 Leu Arg Ala Tyr Leu Leu Pro Ala
1 5

45 <210> 169
<211> 8
<212> PRT
<213> *Cavia porcellus*

50 <220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Hidroxiprolina Hyp

55 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Glutamato o Glutamina Glx

ES 2 663 381 T3

<400> 169

Gly Ala Xaa Gly Leu Xaa Gly His
1 5

5 <210> 170
<211> 8
<212> PRT
<213> *Rattus* sp.

10 <400> 170

Gly Pro Gln Gly Val Arg Gly Glu
1 5

15 <210> 171
<211> 8
<212> PRT
<213> *Rattus* sp.

20 <400> 171

Gly Pro Ala Gly Val Gln Gly Pro
1 5

25 <210> 172
<211> 8
<212> PRT
<213> *Rattus* sp.

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Hidroxiprolina Hyp

<400> 172

35 Gly Pro Ser Gly Leu Xaa Gly Pro
1 5

40 <210> 173
<211> 8
<212> PRT
<213> *Rattus* sp.

<400> 173

45 Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ser
1 5

50 <210> 174
<211> 8
<212> PRT
<213> *Rattus* sp.

<400> 174

55 Gly Ala Lys Gly Leu Thr Gly Ser
1 5

55

ES 2 663 381 T3

<210> 175
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Rattus* sp.
 5
 <400> 175

 Gly Pro Ala Gly Gln Asp Gly Pro
 1 5

 10
 <210> 176
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Rattus* sp.

 15
 <400> 176

 Gly Pro Ala Gly Phe Ala Gly Pro
 1 5

 20
 <210> 177
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Rattus* sp.

 25
 <400> 177

 Gly Pro Ile Gly Asn Val Gly Ala
 1 5

 30
 <210> 178
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Rattus* sp.

 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Hidroxilisina Hyl

 <400> 178

 Gly Pro Xaa Gly Ser Arg Gly Ala
 1 5

 40
 <210> 179
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Bos* sp.

 45
 <400> 179

 Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln
 1 5

 50
 <210> 180
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Bos* sp.

 55

ES 2 663 381 T3

<400> 180

Gly Pro Gly Gly Leu Leu Gly Ala
 1 5

5 <210> 181
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 181

Ile Pro Glu Asn Phe Phe Gly Val
 1 5

15 <210> 182
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 182

20 Pro Pro Gly Ala Tyr His Gly Ala
 1 5

25 <210> 183
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 183

30 Arg Ala Ile His Ile Gln Ala Glu
 1 5

35 <210> 184
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 184

Gly Pro His Leu Leu Val Glu Ala
 1 5

40 <210> 185
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 185

Leu Arg Ala Tyr Leu Leu Pro Ala
 1 5

50 <210> 186
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 663 381 T3

<400> 186

Gly Pro Glu Gly Leu Arg Val Gly
 1 5

5 <210> 187
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 187

Arg Val Gly Phe Tyr Glu Ser Asp
 1 5

15 <210> 188
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 188

Leu Leu Ser Ala Leu Val Glu Thr
 1 5

25 <210> 189
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 189

Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro
 1 5

35 <210> 190
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 190

Ile Ala Gly Arg Ser Leu Asn Pro
 1 5

45 <210> 191
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Gallus sp.*

50 <400> 191

Leu Asn Ala Gly Phe Thr Ala Ser
 1 5

55 <210> 192
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 663 381 T3

<400> 192

Ile Pro Glu Asn Phe Phe Gly Val
1 5

5 <210> 193
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 193

Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu
1 5

15 <210> 194
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 194

Asp Val Ala Gln Phe Val Leu Thr
1 5

25 <210> 195
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 195

30 Asp Thr Leu Glu Val Met Arg Lys
1 5

35 <210> 196
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 196

40 Asp Val Gly His Phe Arg Thr Phe
1 5

45 <210> 197
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 197

Asp Ser Gly Gly Phe Met Leu Thr
1 5

50 <210> 198
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

55

ES 2 663 381 T3

<400> 198

Arg Val Ala Glu Met Arg Gly Glu
 1 5

5 <210> 199
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 199

Asp Leu Gly Arg Phe Gln Thr Phe
 1 5

15 <210> 200
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 200

Pro Phe Ser Pro Leu Val Ala Thr
 1 5

25 <210> 201
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 201

30 Leu Arg Ala Tyr Leu Leu Pro Ala
 1 5

35 <210> 202
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 202

40 Ala Pro Gly Asn Ala Ser Glu Ser
 1 5

45 <210> 203
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 203

Phe Ser Ser Glu Ser Lys Arg Glu
 1 5

50 <210> 204
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Bos sp.*

55

ES 2 663 381 T3

<400> 204
Ala Gly Gly Ala Gln Met Gly Val
1 5

5 <210> 205
<211> 8
<212> PRT
<213> *Bos sp.*

10 <400> 205
Gln Met Gly Val Met Gln Gly Pro
1 5

15 <210> 206
<211> 8
<212> PRT
<213> *Bos sp.*

20 <400> 206
Met Ala Ala Ser Leu Lys Arg Pro
1 5

25 <210> 207
<211> 4
<212> PRT
<213> *Bos sp.*

<400> 207
Ala Lys Arg Glu
1

30 <210> 208
<211> 4
<212> PRT
<213> *Bos sp.*

35 <400> 208
Leu Arg Lys Pro
1

40 <210> 209
<211> 8
<212> PRT
<213> *Bos sp.*

45 <400> 209
Gln Ala Gln Ala Ile Leu Gln Gln
1 5

50 <210> 210
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

55

ES 2 663 381 T3

<400> 210

Arg Ala Ile His Ile Gln Ala Glu
1 5

5 <210> 211
<211> 8
<212> PRT
<213> *Bos* sp.

10 <400> 211

Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
1 5

15 <210> 212
<211> 8
<212> PRT
<213> *Bos* sp.

20 <400> 212

Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
1 5

25 <210> 213
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 213

30 Ile Pro Glu Asn Phe Phe Gly Val
1 5

35 <210> 214
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 214

40 Gly Pro His Leu Leu Val Glu Ala
1 5

45 <210> 215
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 215

50 Pro Pro Glu Glu Leu Lys Phe Gln
1 5

55 <210> 216
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 663 381 T3

<400> 216

Gly Pro Pro Gly Val Val Gly Pro
 1 5

5 <210> 217
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 217

Gly Pro Pro Gly Leu Arg Gly Glu
 1 5

15 <210> 218
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 218

Gly Pro Gly Gly Val Val Gly Pro
 1 5

25 <210> 219
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 219

30 Ile Pro Glu Asn Phe Phe Gly Val
 1 5

35 <210> 220
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 220

40 Pro Pro Gly Ala Tyr His Gly Ala
 1 5

45 <210> 221
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 221

Arg Ala Ile His Ile Gln Ala Glu
 1 5

50 <210> 222
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55

ES 2 663 381 T3

<400> 222

Arg Ala Ile His Ile Gln Ala Glu
1 5

5

<210> 223
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 223

Gly Pro His Leu Leu Val Glu Ala
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo frente a Colágeno II (CII) oxidado, en que el anticuerpo o fragmento del mismo está conjugado con una fracción farmacéuticamente activa, en que la fracción farmacéuticamente activa (a) se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo o un fragmento del mismo, un factor de crecimiento, un factor de diferenciación, una molécula de citocina, un interferón, una proteína morfogenética ósea (BMP); una quimiocina, una MCP (proteína quimiotáctica de monocitos), un inhibidor de citocina; un receptor de citocina, una enzima de eliminación de radicales libres o una toxina, o un fragmento activo o porción de las mismas; o (b) se selecciona del grupo que consiste en una molécula de glucosaminoglucano, condroitina, un fármaco antiinflamatorio no esteroide (AINE), un esteroide, hialuronato de sodio o ácido hialurónico, colchicina o hidroxiclороquina.
- 10
- 15 2. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la cual el anticuerpo es un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.
3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la cual el fragmento de anticuerpo es un Fc, Fab, scFv, anticuerpo de único dominio (dAb), diácuerpo, minicuerpo o fragmento scFv-Fc.
- 20 4. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la cual el anticuerpo o fragmento del mismo comprende las secuencias de CDR en las cadenas pesadas variables (VH) y cadenas ligeras variables (VL), como se muestra en la Tabla 1

Tabla 1

| CDRH2 | CDRH3 | CDRL2 | CDRL3 |
|--------------------|---------|---------|-----------|
| DISSTGSYTAYADSVKG | GAGSFDY | AASALQS | QQSSSTPTT |
| AISAAGTATAYADSVKG | GYDTFDY | AASSLQS | QQNYGYPTT |
| SISNSGSYTDYADSVKG | GYGSFDY | AASTLQS | QQANSSPDT |
| SINNYGSNTAYADSVKG | GYSSFDY | AASYLQS | QQTSSSPDT |
| SINNYGSNTAYADSVKG | GYSSFDY | AASYLQS | QQTSSSPDT |
| SISYTGNSTDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| SISYTGNSTDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| SISYTGNSTDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| SISYTGNSTDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| SISYTGNSTDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| NIATDGTTTYADSVKG | NSTYFDY | SASTLQS | QQAATSPPT |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISYTGDESTYYADSVKG | NYSAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| SINDSGTTTTYYADSVKG | NYSAFDY | AASDLQS | QQSDSAPT |
| SIDSAGASTYYADSVKG | NYSAFDY | NASSLQS | QQSDTYPT |
| SISYTGDESTYYADSVKG | NYSAFDY | TASNLQS | QQSYASPTT |
| SISYTGDESTYYADSVKG | NYSAFDY | TASNLQS | QQSYASPTT |
| SISYTGDESTYYADSVKG | NYSAFDY | TASNLQS | QQTGSYPTT |

ES 2 663 381 T3

| CDRH2 | CDRH3 | CDRL2 | CDRL3 |
|-------------------|---------|---------|-----------|
| SINATGYGTYADSVKG | NYSDFDY | SASALQS | QQGDSYPTT |
| SINSNGTDTYYADSVKG | NYSDFDY | TASALQS | QQGYGAPTT |
| SISATGSSTYYADSVKG | NYSDFDY | SASDLQS | QQSSYTPTT |
| SISATGSSTYYADSVKG | NYSDFDY | SASDLQS | QQSSYTPTT |
| SIDDSGATTYYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQAANYPTT |
| SIDDSGATTYYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQAANYPTT |
| SIDDSGATTYYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQAANYPTT |
| SIDDSGATTYYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQAANYPTT |
| SIASGDSTYYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SIASGDSTYYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SIASGDSTYYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SIASGDSTYYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SIASGDSTYYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SIASGDSTYYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SISTNGSSTYYADSVKG | NYSSFDY | DASGLQS | QQGDTSPPT |
| SISTNGSSTYYADSVKG | NYSSFDY | DASGLQS | QQGDTSPPT |
| SISTNGSSTYYADSVKG | NYSSFDY | DASGLQS | QQGDTSPPT |
| SISTNGSSTYYADSVKG | NYSSFDY | DASGLQS | QQGDTSPPT |
| SIDTTGTTTTFADSVKG | NYSSFDY | SASYLQS | QQGYSAPTT |
| TISYSGNNTYYADSVKG | NYSSFDY | TASSLQS | QQGYTSPPT |
| SIDAGGNGTYADSVKG | NYSSFDY | TASNLQS | QQNNYPTT |
| SIDAGGNGTYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQSDAYPTT |
| SIDAGGNGTYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQSDAYPTT |
| SIDAGGNGTYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQSDAYPTT |
| SIDAGGNGTYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQSDAYPTT |
| SIDSAGNATYYADSVKG | NYSSFDY | AASTLQS | TSNYPTTQQ |
| SITDSGDTTYADSVKG | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| SITDSGDTTYADSVKG | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| SITDSGDTTYADSVKG | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| SITDSGDTTYADSVKG | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| SITDSGDTTYADSVKG | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| SIATTGDNTYYADSVKG | NYSYFDY | TASTLQS | QQAAGNPTT |
| AINAYGGSTYYADSVKG | NYSYFDY | AASSLQS | QQGSDYPTT |
| AINAYGGSTYYADSVKG | NYSYFDY | AASSLQS | QQGSDYPTT |
| SIATTGTSTTYADSVKG | NYSYFDY | TASSLQS | QQGSTAPTT |
| SIATTGTSTTYADSVKG | NYSYFDY | TASSLQS | QQGSTAPTT |
| TIDTAGSYTDYADSVKG | NYSYFDY | GASTLQS | QQSTASPST |
| SISNNGSSTYYADSVKG | NYSYFDY | AASNLS | QQTSSYPTT |

| CDRH2 | CDRH3 | CDRL2 | CDRL3 |
|-------------------|---------|---------|-----------|
| SIAYGGAGTDYADSVKG | NYTAFDY | AASYLQS | QQGAGSPST |
| AIANTGSATNYADSVKG | NYTAFDY | DASTLQS | QQRNTSPTT |
| SISTAGTYTDYADSVKG | NYTDFDY | SASYLQS | QQSNTSPAT |
| SISTAGTYTDYADSVKG | NYTDFDY | SASYLQS | QQSNTSPAT |
| SINDTGYYTYADSVKG | NYTYFDY | TASTLQS | QQAYTAPTT |
| SIASSGTTYADSVKG | SYADFDY | AASNLS | QQADTYPTT |
| TITSTGAATAYADSVKG | SYATFDY | AASYLQS | QQAANSPTT |
| AIDGTGYGTAYADSVKG | SYDTFDY | GASSLQS | QQTSDYPNT |
| SIANAGTATYYADSVKG | SYSNFDY | SASTLQS | QQASTSPTT |
| SIDSAGDSTYYADSVKG | SYSYFDY | TASYLQS | QQASDYPTT |
| SISSSGDTTYADSVKG | SYSYFDY | TASTLQS | QQSSSNPTT |
| SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| SIDASGANTAYADSVKG | TYGTFDY | SASYLQS | QQSATTPTT |

5. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en la cual el fragmento de anticuerpo es un scFv seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 3-11A, 6-6E, 1-7G, 3-7B, 6-9D, 1-1C, 1-8D, 1-3G, 4-12C, 6-3E, 6-9A, 1-12A, 4-6A, 4-8A, 4-9F, 4-4H, 3-3A, 3-6F, 6-10H, 12E, 3-5G, 3-4D, 3-5D, 6-4E, 3-6B, 3-6G, 4-11F, 6-7H, 1-11E, 1-2F, 1-6H, 3-8D, 1-4D, 4-2F, 3-3B, 3-5C, 6-9C, 4G, 3-12F, 3-4G, 6-11F, 6-11H, 3-2C, 5B, 6-10G, 1-4H, 4-5A, 4-1B, 4-12D, 6-4B, 1-2E, 1-7F, 1-10F, 1-9G, 4-1C, 6-7G, 3-7H, 6-1F, 6-3B, 4H, 3-9A, 6-10D, 3-5H, 3-2F, 1-6G, 3-11H, 6-9F, 3-9D, 4-3H, 3-3E, 3-10C, 3-11E, 6-8C, 6-11D, 4-5H, 6-5F, 6-7F, 1-10D

10 y es preferentemente el scFv 1-11E.

6. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que la composición comprende un sitio de escisión proteolítica entre el anticuerpo o fragmento del mismo y la fracción farmacéuticamente activa.

7. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en la cual el sitio de escisión proteolítica es un sitio de escisión de metaloproteínasa de matriz (MMP), un sitio de escisión de serina proteasa o un sitio escindible mediante una proteasa parasitaria precedente de un organismo patógeno.

8. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la cual el sitio de escisión de MMP es uno o más de MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9 o MMP10.

9. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la cual la fracción farmacéuticamente activa es una proteína de fusión de receptor de TNF (TNFR) anticuerpo.

10. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la cual la fracción farmacéuticamente activa es interferón beta (IFN-β) o TNFR2-Fc.

11. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, cuya composición comprende el scFv 1-11E, un sitio de escisión de MMP, e IFN-β o TNFR2-Fc.

12. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en medicina.

13. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el tratamiento de una artropatía.

14. El uso de una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una artropatía.

5 15. Una composición que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo frente al Colágeno II (CII) oxidado y un marcador detectable, en la cual el anticuerpo o fragmento del mismo comprende las secuencias de CDR en las cadenas pesadas variables (VH) y cadenas ligeras variables (VL), como se muestra en la Tabla 1

Tabla 1

| CDRH2 | CDRH3 | CDRL2 | CDRL3 |
|--------------------|---------|---------|-----------|
| DISSTGSYTAYADSVKG | GAGSFDY | AASALQS | QQSSSTPTT |
| AISAAGTATAYADSVKG | GYDTFDY | AASSLQS | QQNYGYPTT |
| SISNSGSYTDYADSVKG | GYGSFDY | AASTLQS | QQANSSPDT |
| SINNYGSNTAYADSVKG | GYSSFDY | AASYLQS | QQTSSSPDT |
| SINNYGSNTAYADSVKG | GYSSFDY | AASYLQS | QQTSSSPDT |
| SISYTGNSTDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| SISYTGNSTDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| SISYTGNSTDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| SISYTGNSTDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| SISYTGNSTDYADSVKG | GYTAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| NIATDGTTTTYYADSVKG | NSTYFDY | SASTLQS | QQAATSPTT |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISNSGTNTDYADSVKG | NYASFDY | YASYLQS | QQGSASPST |
| SISYTG DSTYYADSVKG | NYSAFDY | YASYLQS | QQADSTPTT |
| SINDSGTTTTYYADSVKG | NYSAFDY | AASDLQS | QQSDSAPT |
| SIDSAGASTYYADSVKG | NYSAFDY | NASSLQS | QQSDTYPT |
| SISYTG DSTYYADSVKG | NYSAFDY | TASNLS | QQSYASPT |
| SISYTG DSTYYADSVKG | NYSAFDY | TASNLS | QQSYASPT |
| SISYTG DSTYYADSVKG | NYSAFDY | TASNLS | QQTGSYPT |
| SINATGYGTYADSVKG | NYSDFDY | SASALQS | QQGDSYPT |
| SINSNGTDYYADSVKG | NYSDFDY | TASALQS | QQGYGAPT |
| SISATGSSTYYADSVKG | NYSDFDY | SASDLQS | QQSSYTPT |
| SISATGSSTYYADSVKG | NYSDFDY | SASDLQS | QQSSYTPT |
| SIDDSGATYYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQAANYPT |
| SIDDSGATYYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQAANYPT |
| SIDDSGATYYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQAANYPT |
| SIDDSGATYYADSVKG | NYSSFDY | YASSLQS | QQAANYPT |
| SIASGDSTYYADSVKG | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPT |

ES 2 663 381 T3

| CDRH2 | CDRH3 | CDRL2 | CDRL3 |
|-------------------|---------|---------|-----------|
| SIASTGdstyyADsvkg | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SIASTGdstyyADsvkg | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SIASTGdstyyADsvkg | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SIASTGdstyyADsvkg | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SIASTGdstyyADsvkg | NYSSFDY | SASALQS | QQASNYPTT |
| SISTNGSstyyADsvkg | NYSSFDY | DASGLQS | QQGDTSPPT |
| SISTNGSstyyADsvkg | NYSSFDY | DASGLQS | QQGDTSPPT |
| SISTNGSstyyADsvkg | NYSSFDY | DASGLQS | QQGDTSPPT |
| SISTNGSstyyADsvkg | NYSSFDY | DASGLQS | QQGDTSPPT |
| SIDTTGTTTTfADsvkg | NYSSFDY | SASYLQS | QQGYSAPTT |
| TISYSGNNTYYADsvkg | NYSSFDY | TASSLQS | QQGYTSPPT |
| SIDAGNGTYADsvkg | NYSSFDY | TASNLQS | QQNNYPTT |
| SIDAGNGTYADsvkg | NYSSFDY | YASSLQS | QQSDAYPTT |
| SIDAGNGTYADsvkg | NYSSFDY | YASSLQS | QQSDAYPTT |
| SIDAGNGTYADsvkg | NYSSFDY | YASSLQS | QQSDAYPTT |
| SIDAGNGTYADsvkg | NYSSFDY | YASSLQS | QQSDAYPTT |
| SIDSAGNATYYADsvkg | NYSSFDY | AASLQS | TSNYPTTQQ |
| SITDSGDTTYADsvkg | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| SITDSGDTTYADsvkg | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| SITDSGDTTYADsvkg | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| SITDSGDTTYADsvkg | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| SITDSGDTTYADsvkg | NYSTFDY | SASSLQS | QQSNATPTT |
| SIATTGDNTYYADsvkg | NYSYFDY | TASTLQS | QQAAGNPTT |
| AINAYGGSTYYADsvkg | NYSYFDY | AASSLQS | QQGSDYPTT |
| AINAYGGSTYYADsvkg | NYSYFDY | AASSLQS | QQGSDYPTT |
| SIATTGTSTTYADsvkg | NYSYFDY | TASSLQS | QQGSTAPTT |
| SIATTGTSTTYADsvkg | NYSYFDY | TASSLQS | QQGSTAPTT |
| TIDTAGSYTDYADsvkg | NYSYFDY | GASTLQS | QQSTASPST |
| SISNNGSSTYYADsvkg | NYSYFDY | AASNLQS | QQTSSYPTT |
| SIAYGGAGTDYADsvkg | NYTAFDY | AASYLQS | QQGAGSPST |
| AIANTGSATNYADsvkg | NYTAFDY | DASTLQS | QQRNTSPPT |
| SISTAGTYTDYADsvkg | NYTDFDY | SASYLQS | QQSNTSPAT |
| SISTAGTYTDYADsvkg | NYTDFDY | SASYLQS | QQSNTSPAT |
| SINDTGYTTYADsvkg | NYTYFDY | TASTLQS | QQAYTAPTT |
| SIASSGTTTTYADsvkg | SYADFDY | AASNLQS | QQADTYPTT |
| TITSTGAATAYADsvkg | SYATFDY | AASYLQS | QQAANSPTD |
| AIDGTGYGTAYADsvkg | SYDTFDY | GASSLQS | QQTSDYPNT |
| SIANAGTATYYADsvkg | SYSNFDY | SASTLQS | QQASTSPPT |

| CDRH2 | CDRH3 | CDRL2 | CDRL3 |
|-------------------|---------|---------|------------|
| SIDSAGDSTYYADSVKG | SYSYFDY | TASYLQS | QQASDYPTT |
| SISSSGDTTYADSVKG | SYSYFDY | TASTLQS | QQSSSNPTT |
| SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| SIDTGGSYTDYADSVKG | SYTTFDY | SASYLQS | QQGSNSPTT |
| SIDASGANTAYADSVKG | TYGTFDY | SASYLQS | QQSATT PDT |

16. Una composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la cual el fragmento de anticuerpo es un scFv seleccionado del grupo que consiste en:

5 3-11A, 6-6E, 1-7G, 3-7B, 6-9D, 1-1C, 1-8D, 1-3G, 4-12C, 6-3E, 6-9A, 1-12A, 4-6A, 4-8A, 4-9F, 4-4H, 3-3A, 3-6F, 6-10H, 12E, 3-5G, 3-4D, 3-5D, 6-4E, 3-6B, 3-6G, 4-11F, 6-7H, 1-11E, 1-2F, 1-6H, 3-8D, 1-4D, 4-2F, 3-3B, 3-5C, 6-9C, 4G, 3-12F, 3-4G, 6-11F, 6-11H, 3-2C, 5B, 6-10G, 1-4H, 4-5A, 4-1B, 4-12D, 6-4B, 1-2E, 1-7F, 1-10F, 1-9G, 4-1C, 6-7G, 3-7H, 6-1F, 6-3B, 4H, 3-9A, 6-10D, 3-5H, 3-2F, 1-6G, 3-11H, 6-9F, 3-9D, 4-3H, 3-3E, 3-10C, 3-11E, 6-8C, 6-11D, 4-5H, 6-5F, 6-7F, 1-10D

10 y es preferentemente el scFv 1-11E.

17. Una composición de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, en la cual el marcador detectable es un marcador radioactivo o fluorescente.

15 18. Una composición de acuerdo con la reivindicación 17, en la cual el marcador detectable es un radionúclido o un colorante.

20 19. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 para su uso en el diagnóstico de una artropatía.

20. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, el uso de la reivindicación 14 o la composición de la reivindicación 19, en los que la artropatía es artritis reumatoide (AR) u osteoartritis (OA).

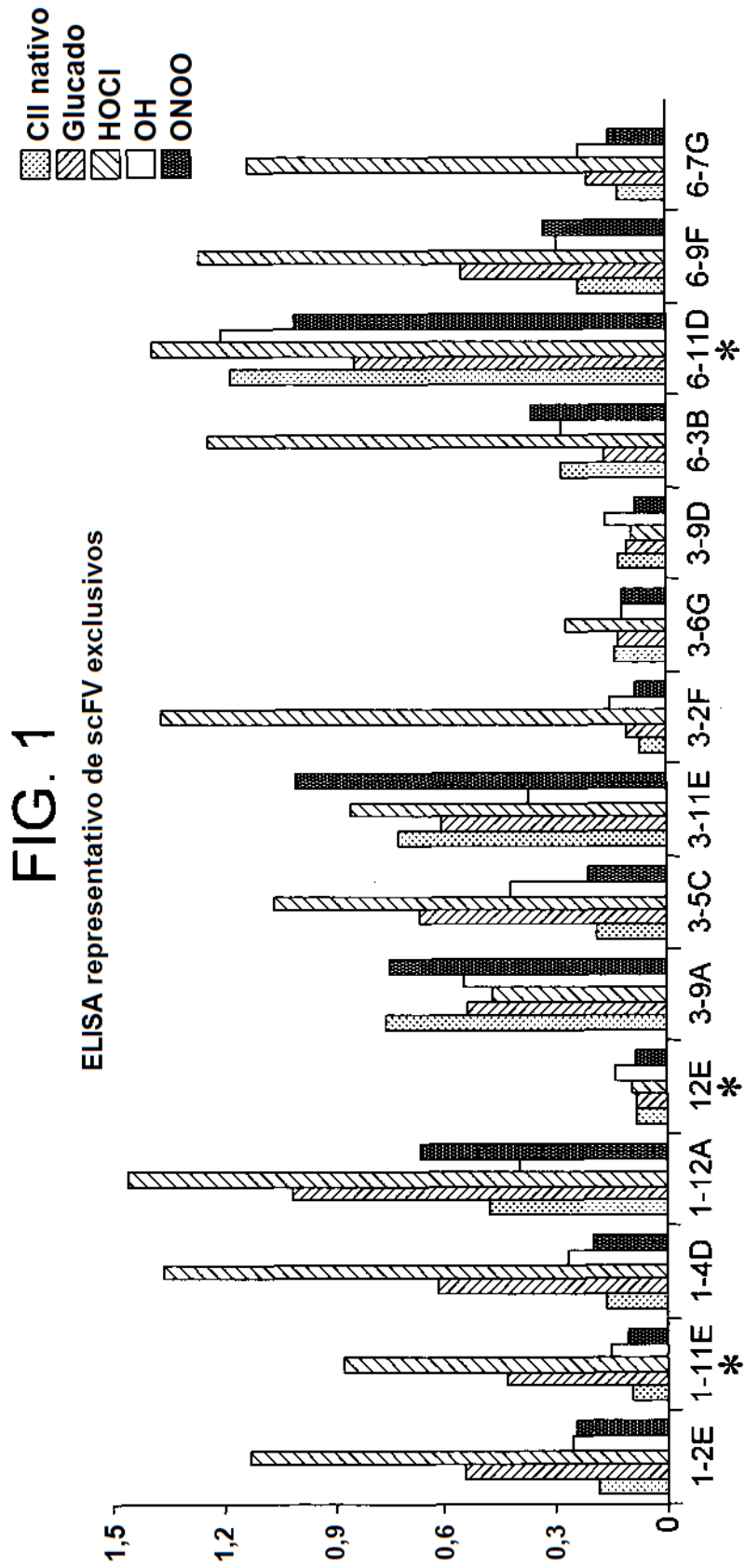
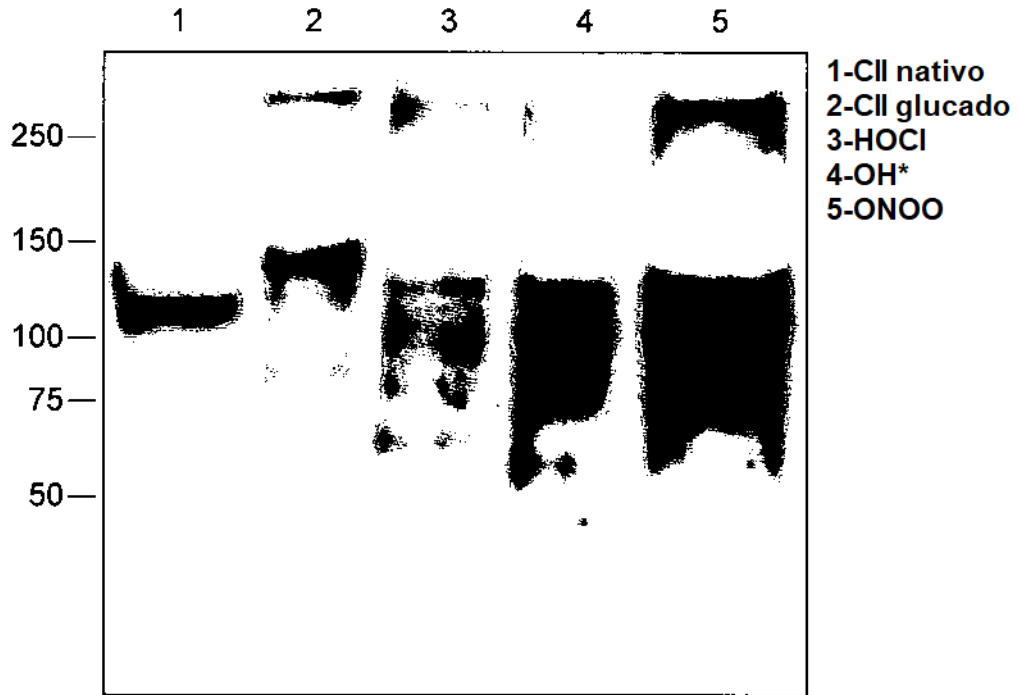


FIG. 2

Transferencia de Western con sonda 1-11E



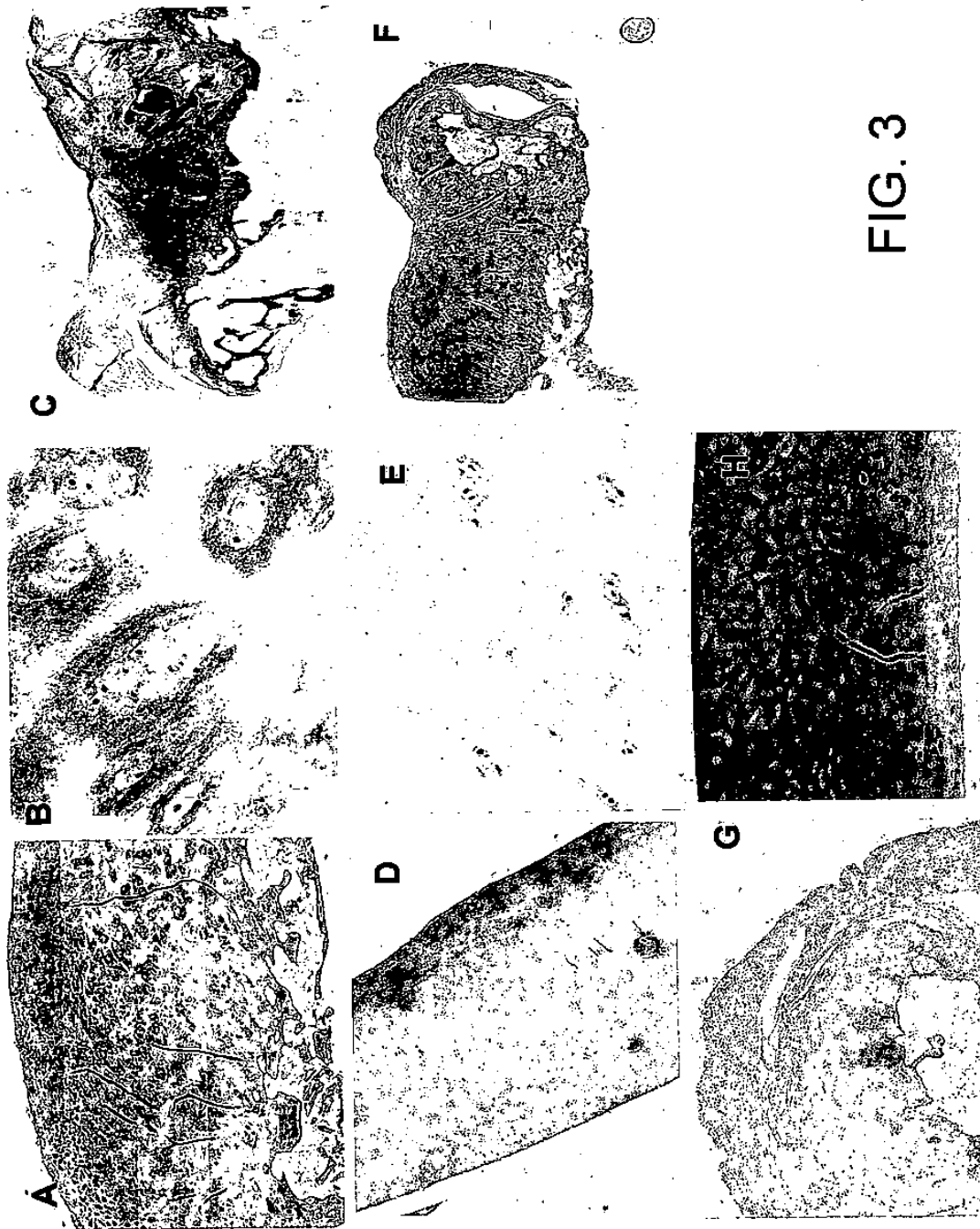


FIG. 3

FIG. 4

Emplazamiento especial de 1-11E en la pata inflamada

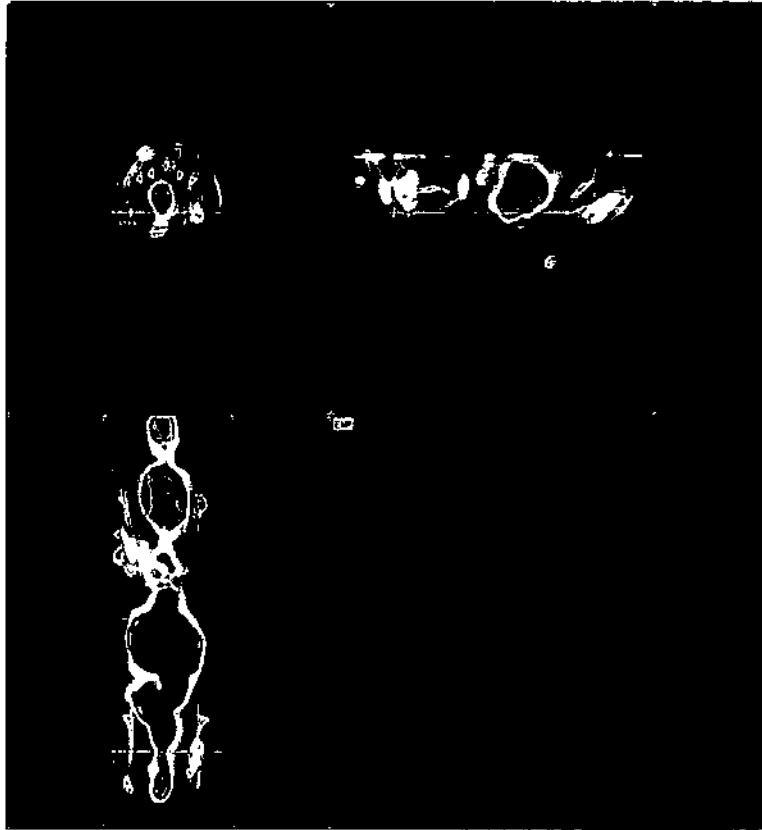


FIG. 5

| Proteína | Secuencia |
|---|---|
| MMP-1/MMP-8 | |
| Colágeno de tipo I (α 1) humano | Ala-Pro-Gln-Gly ⁷⁷⁵ ~Ile ⁷⁷⁶ -Ala-Gly-Gln |
| Colágeno de tipo I (α 2) humano | Gly-Pro-Gln-Gly ⁷⁷⁵ ~Leu ⁷⁷⁶ -Leu-Gly-Ala |
| Colágeno de tipo II humano | Gly-Pro-Gln-Gly ⁷⁷⁵ ~Leu ⁷⁷⁶ -Ala-Gly-Gln |
| Colágeno de tipo III humano | Gly-Pro-Leu-Gly ⁷⁷⁵ ~Ile ⁷⁷⁶ -Ala-Gly-Ile |
| α 2-macroglobulina humana | Gly-Pro-Glu-Gly ⁶⁷⁹ ~Leu ⁶⁸⁰ -Arg-Val-Gly |
| α 2-macroglobulina de rata | Ala-Ala-Tyr-His ⁶⁸¹ ~Leu ⁶⁸² -Val-Ser-Gln |
| α 2-macroglobulina de rata | Met-Asp-Ala-Phe ⁶⁹¹ ~Leu ⁶⁹² -Glu-Ser-Ser |
| α 1-macroglobulina de rata | Glu-Pro-Gln-Ala ⁶⁸³ ~Leu ⁶⁸⁴ -Ala-Met-Ser |
| α 1-macroglobulina de rata | Gln-Ala-Leu-Ala ⁶⁸⁵ ~Met ⁶⁸⁶ -Ser-Ala-Ile |
| Ovostatina de pollo | Pro-Ser-Tyr-Phe ⁶⁷³ ~Leu ⁶⁷⁴ -Asn-Ala-Gly |
| Proteína de la zona de gestación humana | Tyr-Glu-Ala-Gly ⁶⁸⁵ ~Leu ⁶⁸⁶ -Gly-Val-Val |
| Proteína de la zona de gestación humana | Ala-Gly-Leu-Gly ⁶⁸⁷ ~Val ⁶⁸⁸ -Val-Glu-Arg |
| Proteína de la zona de gestación humana | Ala-Gly-Leu-Gly ⁷⁵⁷ ~Ile ⁷⁵⁸ -Ser-Ser-Thr |
| Inhibidor de proteasa α 1 | Gly-Ala-Met-Phe ³⁵² ~Leu ³⁵³ -Glu-Ala-Ile |
| Agrecano humano | Ile-Pro-Glu-Asn ³⁴¹ ~Phe ³⁴² -Phe-Gly-Val |
| Agrecano humano | Thr-Glu-Gly-Glu ³⁷³ ~Ala ³⁷⁴ -Arg-Gly-Ser |
| Unión a cartílago humana | Arg-Ala-Ile-His ¹⁶ ~Ile ¹⁷ -Gln-Ala-Glu |
| Factor de crecimiento insulínico humano | Leu-Arg-Ala-Tyr ⁹⁹ ~Leu ¹⁰⁰ -Leu-Pro-Ala |
| proteína de unión 3 | |
| MMP-2 | |
| Gelatina α 1 (I) de cobaya | Gly-Ala-Hyp-Gly ⁵⁴⁷ ~Leu ⁵⁴⁸ -Glx-Gly-His |
| Gelatina α 1 (I) de rata | Gly-Pro-Gln-Gly ¹⁹⁰ ~Val ¹⁹¹ -Arg-Gly-Glu |
| Gelatina α 1 (I) de rata | Gly-Pro-Ala-Gly ²⁷⁷ ~Val ²⁷⁸ -Gln-Gly-Pro |
| Gelatina α 1 (I) de rata | Gly-Pro-Ser-Gly ³⁰¹ ~Leu ³⁰² -Hyp-Gly-Pro |
| Gelatina α 1 (I) de rata | Gly-Pro-Ala-Gly ³³¹ ~Glu ³³² -Arg-Gly-Ser |
| Gelatina α 1 (I) de rata | Gly-Ala-Lys-Gly ³⁶¹ ~Leu ³⁶² -Thr-Gly-Ser |
| Gelatina α 1 (I) de rata | Gly-Pro-Ala-Gly ³⁸² ~Gln ³⁸³ -Asp-Gly-Pro |
| Gelatina α 1 (I) de rata | Gly-Pro-Ala-Gly ⁶³⁴ ~Phe ⁶³⁵ -Ala-Gly-Pro |
| Gelatina α 1 (I) de rata | Gly-Pro-Ile-Gly ⁶⁷⁶ ~Asn ⁶⁷⁷ -Val-Gly-Ala |
| Gelatina α 1 (I) de rata | Gly-Pro-Hyl-Gly ⁶⁸⁵ ~Ser ⁶⁸⁶ -Arg-Gly-Ala |
| Colágeno de tipo 1 (α 1) bovino | Gly-Pro-Gln-Gly ⁷⁷⁵ ~Ile ⁷⁷⁶ -Ala-Gly-Gln |
| Colágeno de tipo 1 (α 2) bovino | Gly-Pro-Gln-Gly ⁷⁷⁵ ~Leu ⁷⁷⁶ -Leu-Gly-Ala |
| Agrecano humano | Ile-Pro-Glu-Asn ³⁴¹ ~Phe ³⁴² -Phe-Gly-Val |
| Galectina-3 humana | Pro-Pro-Gly-Ala ⁶² ~Tyr ⁵³ -His-Gly-Ala |
| Unión a cartílago humana | Arg-Ala-Ile-His ¹⁶ ~Ile ¹⁷ -Gln-Ala-Glu |
| Unión a cartílago humana | Gly-Pro-His-Leu ²⁵ ~Leu ²⁶ -Val-Glu-Ala |
| Factor de crecimiento insulínico humano | Leu-Arg-Ala-Tyr ⁹⁹ ~Leu ¹⁰⁰ -Leu-Pro-Ala |
| proteína de unión 3 | |
| MMP-3 | |
| α 2-macroglobulina humana | Gly-Pro-Glu-Gly ⁶⁷⁹ ~Leu ⁶⁸⁰ -Arg-Val-Gly |
| α 2-macroglobulina humana | Arg-Val-Gly-Phe ⁶⁸⁴ ~Tyr ⁶⁸⁵ -Glu-Ser-Asp |
| α 1-antiquimotripsina humana | Leu-Leu-Ser-Ala ³⁶⁰ ~Leu ³⁶¹ -Val-Glu-Thr |
| Inhibidor de proteasa α 1 | Glu-Ala-Ile-Pro ³⁵⁷ ~Met ³⁵⁸ -Ser-Ile-Pro |
| Antitrombina III | Ile-Ala-Gly-Arg ³⁸⁵ ~Ser ³⁸⁶ -Leu-Asn-Pro |
| Ovostatina de pollo | Leu-Asn-Ala-Gly ⁶⁷⁷ ~Phe ⁶⁷⁸ -Thr-Ala-Ser |

FIG. 5 (CONT.)

| | |
|---|--|
| Agrecano humano | Ile-Pro-Glu-Asn ₃₄₁ ~Phe ₃₄₂ -Phe-Gly-Val |
| Sustancia P | Lys-Pro-Gln-Gln ₆ ~Phe ₇ -Phe-Gly-Leu |
| ProMMP-1 humana | Asp-Val-Ala-Gln ₈₀ ~Phe ₈₁ -Val-Leu-Thr |
| ProMMP-3 humana | Asp-Thr-Leu-Glu ₆₈ ~Val ₆₉ -Met-Arg-Lys |
| ProMMP-3 humana | Asp-Val-Gly-His ₈₂ ~Phe ₈₃ -Arg-Thr-Phe |
| ProMMP-8 humana | Asp-Ser-Gly-Gly ₇₈ ~Phe ₇₉ -Met-Leu-Thr |
| ProMMP-9 humana | Arg-Val-Ala-Glu ₄₀ ~Met ₄₁ -Arg-Gly-Glu |
| ProMMP-9 humana | Asp-Leu-Gly-Arg ₈₇ ~Phe ₈₈ -Gln-Thr-Phe |
| Fibronectina humana | Pro-Phe-Ser-Pro ₆₈₉ ~Leu ₆₉₀ -Val-Ala-Thr |
| Factor de crecimiento insulínico humano | Leu-Arg-Ala-Tyr ₉₉ ~Leu ₁₀₀ -Leu-Pro-Ala |
| proteína de unión 3 | Ala-Pro-Gly-Asn ₁₀₉ ~Ala ₁₁₀ -Ser-Glu-Ser |
| | Phe-Ser-Ser-Glu ₁₇₆ ~Ser ₁₇₇ -Lys-Arg-Glu |
| | Ala-Gly-Gly-Ala ₁₁₅ ~Gln ₁₁₆ -Met-Gly-Val |
| Colágeno α1(II) bovino, telopéptido N | Gln-Met-Gly-Val ₁₁₉ ~Met ₁₂₀ -Gln-Gly-Pro |
| Colágeno α1(II) bovino, telopéptido N | Met-Ala-Ala-Ser~Leu-Lys-Arg-Pro |
| Colágeno α1(IX) bovino, NC2 | ~Ala-Lys-Arg-Glu |
| Colágeno α2(IX) bovino, NC2 | ~Leu-Arg-Lys-Pro |
| Colágeno α3(IX) bovino, NC2 | |
| Colágeno α1(XI) bovino, telopéptido N | Gln-Ala-Gln-Ala~Ile-Leu-Gln-Gln |
| Unión a cartilago humana | Arg-Ala-Ile-His ₁₆ ~Ile ₁₇ -Gln-Ala-Glu |
| Insulina bovina, cadena B | Leu-Val-Glu-Ala ₁₄ ~Leu ₁₅ -Tyr-Leu-Val |
| Insulina bovina, cadena B | Glu-Ala-Leu-Tyr ₁₆ ~Leu ₁₇ -Val-Cys-Gly |
| MMP-7 | |
| Agrecano humano | Ile-Pro-Glu-Asn ₃₄₁ ~Phe ₃₄₂ -Phe-Gly-Val |
| Unión a cartilago humana | Gly-Pro-His-Leu ₂₅ ~Leu ₂₆ -Val-Glu-Ala |
| Prouroquinasa humana | Pro-Pro-Glu-Glu ₁₄₃ ~Leu ₁₄₄ -Lys-Phe-Gln |
| MMP-9 | |
| Colágeno de tipo V (α1) humano | Gly- Pro-Pro-Gly ₄₃₉ ~Val ₄₄₀ -Val-Gly-Pro |
| Colágeno de tipo V (α2) humano | Gly-Pro-Pro-Gly ₄₄₅ ~Leu ₄₄₆ -Arg-Gly-Glu |
| Colágeno de tipo XI (α1) humano | Gly-Pro-Gly-Gly ₄₃₉ ~Val ₄₄₀ -Val-Gly-Pro |
| Agrecano humano | Ile-Pro-Glu-Asn ₃₄₁ ~Phe ₃₄₂ -Phe-Gly-Val |
| Galectina-3 humana | Pro-Pro-Gly-Ala ₆₂ ~Tyr ₆₃ -His-Gly-Ala |
| Unión a cartilago humana | Arg-Ala-Ile-His ₁₆ ~Ile ₁₇ -Gln-Ala-Glu |
| MMP-10 | |
| Unión a cartilago humana | Arg-Ala-Ile-His ₁₆ ~Ile ₁₇ -Gln-Ala-Glu |
| Unión a cartilago humana | Gly-Pro-His-Leu ₂₅ ~Leu ₂₆ -Val-Glu-Ala |



FIG. 6

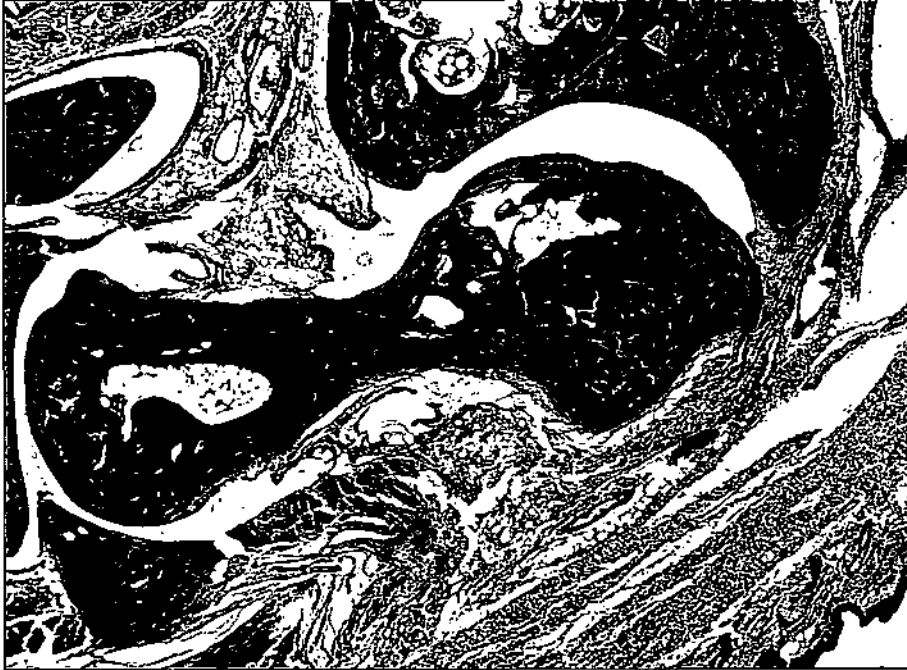


FIG. 7



FIG. 8

A



B



FIG. 8 CONT.

C



D



E

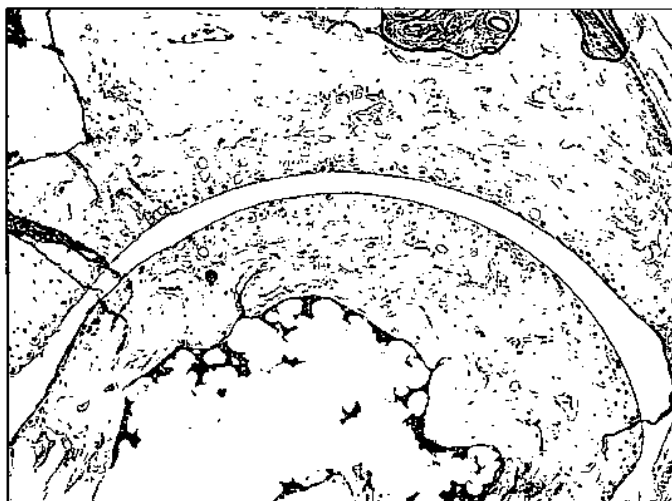


FIG. 9

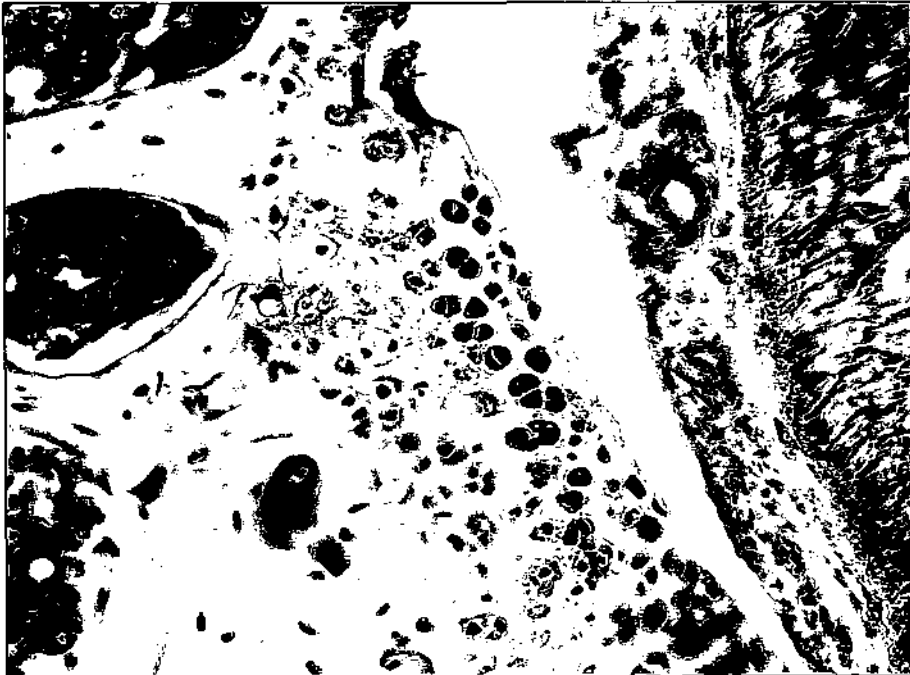
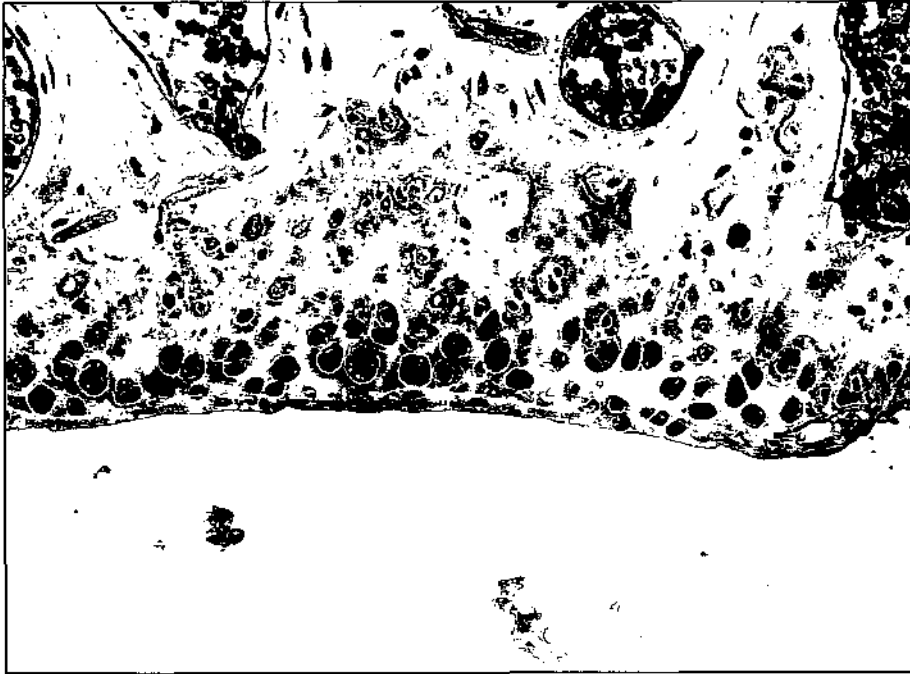


FIG. 10

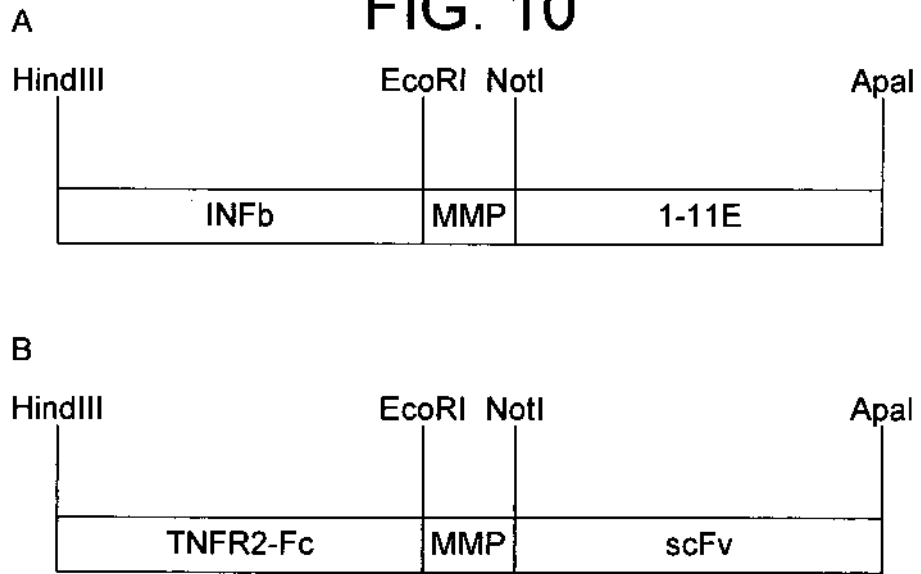


FIG. 12

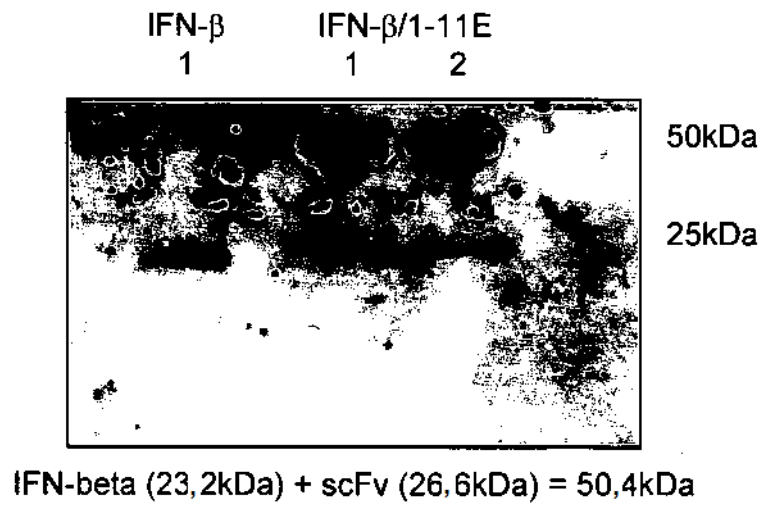


FIG. 11

Expresión de proteínas a gran escala utilizando el sistema Bac-to-Bac

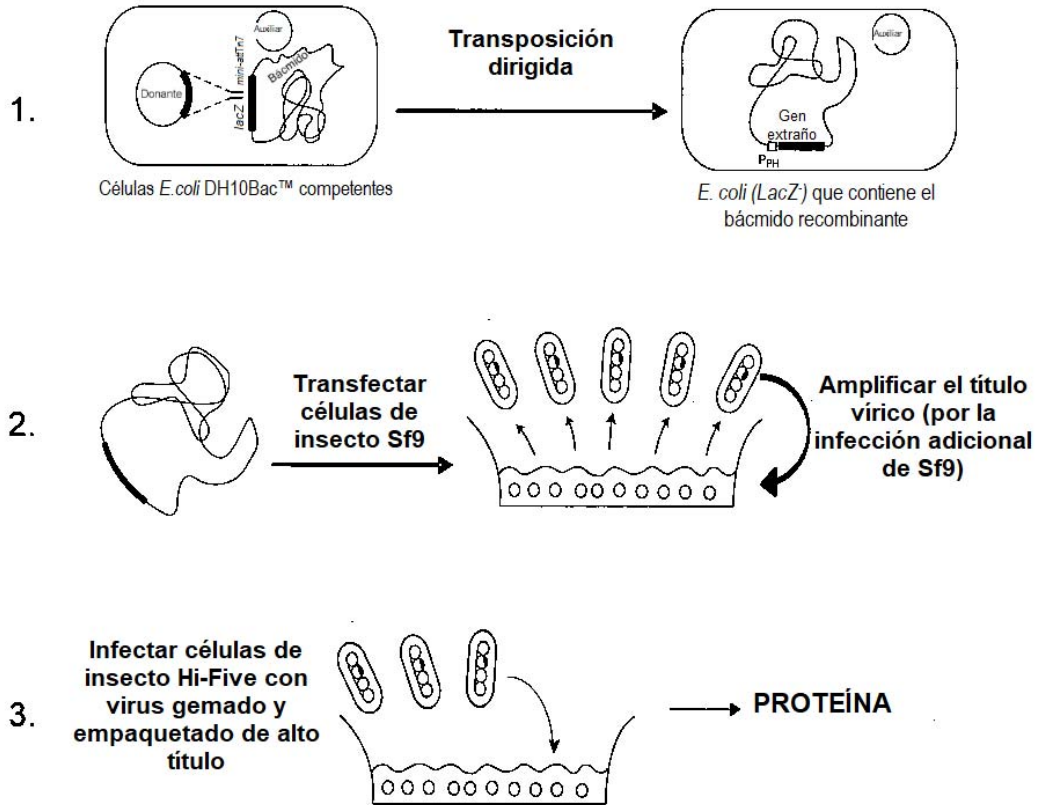
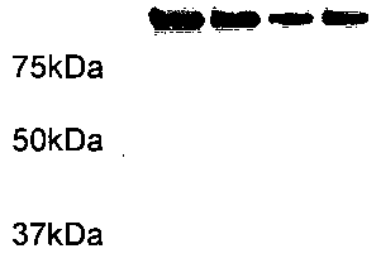
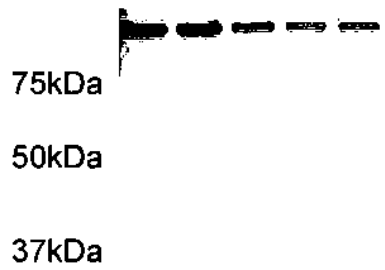


FIG. 13

A
TNFR2Fc/1-11E Clon 1
VT: 100 50 25 12 6 0



B
TNFR2Fc/1-11E Clon 3
VT: 100 50 25 12 6 0



C
clon TNFR2FC/C7
VT: 100 50 25 12 6 0

