



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 672**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01) **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) **C12N 9/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07824846 .5**

96 Fecha de presentación : **12.10.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2089433**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.08.2009**

54 Título: **Terapia dirigida a catepsina S.**

30 Prioridad: **12.10.2006 GB 0620255**
10.04.2007 PCT/GB2007/001312

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.10.2011

73 Titular/es: **FUSION ANTIBODIES LIMITED**
Springbank Industrial Estate Pembroke Loop
Road
Dunmurry, Belfast BT17 0QL, GB

72 Inventor/es: **Olwill, Shane;**
Scott, Christopher;
Johnston, James y
Burden, Roberta

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Terapia dirigida a catepsina S.

Campo de la invención

Esta solicitud se refiere a métodos para el tratamiento de trastornos y enfermedades relacionadas con la angiogénesis, y a composiciones para su uso en dichos métodos.

Antecedentes de la invención

La angiogénesis, el desarrollo de microvasculatura, es un proceso integral dentro de muchos procesos fisiológicos normales, tales como el desarrollo normal y la curación de heridas. La angiogénesis se caracteriza por la estimulación de células endoteliales para que formen vasos sanguíneos primarios en los que existe una compleja interacción no aclarada entre las células endoteliales, el microentorno circundante y una gama de factores pro- y antiangiogénicos. Sin embargo, se acepta que una angiogénesis descontrolada o inapropiada es un factor subyacente a la patología de una amplia gama de enfermedades, incluyendo el avance de tumores y la enfermedad ocular.

Neovascularización ocular patológica

Se considera que una angiogénesis no regulada en el ojo es la causa principal de la ceguera en una amplia gama de trastornos, que incluyen el rechazo de injertos corneales, la neovascularización tras una lesión o una infección, la retinopatía diabética, la fibroplasia retrolenticular y el glaucoma neovascular.

Se ha demostrado que ciertas moléculas, tales como el factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF), desempeñan un papel decisivo en la estimulación de la angiogénesis y, en efecto, se ha establecido el secuestro de esta molécula utilizando anticuerpos como estrategia terapéutica para la prevención de la angiogénesis patológica.

Sin embargo, también se ha demostrado que otras proteínas, tales como la catepsina S, están sobreexpresadas en los sitios angiogénicos.

La catepsina S (Cat S) es un miembro de la superfamilia de la papaína de las cisteína proteasas lisosómicas. Hasta la fecha se han identificado once catepsinas humanas pero todavía han de determinarse los papeles específicos *in vivo* de cada una (Katunuma *et al.*, 2003). Las catepsinas B, L, H, F, O, X y C se expresan en la mayoría de las células, lo cual sugiere un posible papel en la regulación del recambio de proteínas, mientras que las catepsinas S, K, W y V están restringidas a células y tejidos concretos, lo cual indica que pueden tener unos papeles más específicos (Kos *et al.*, 2001; Berdowska, 2004).

La Cat S fue identificada por primera vez en nódulos linfáticos y bazo bovinos, y la forma humana se clonó a partir de un banco de ADNc de macrófagos humanos (Shi *et al.*, 1992). El gen que codifica Cat S está localizado en el cromosoma humano 1q21. El transcrito de 996 pares de bases codificado por el gen Cat S se traduce en un primer momento en una proteína precursora no procesada con un peso molecular de 37,5 kDa. La proteína no procesada está compuesta por 331 aminoácidos: un péptido señal de 15 aminoácidos, una secuencia de propéptido de 99 aminoácidos, y un péptido de 217 aminoácidos. La Cat S se expresa en un primer momento con un péptido señal que se retira después de que se introduzca en el lumen del retículo endoplasmático. La secuencia de propéptido se une al sitio activo de la proteasa, haciendo que sea inactiva hasta que se transporta hacia los compartimentos endosómicos ácidos, tras lo cual la secuencia de propéptido se retira y la proteasa se activa (Baker *et al.*, 2003).

Se ha identificado la Cat S como una enzima clave en la presentación de antígenos mediada por el complejo de histocompatibilidad mayor de clase II (MHC-II), mediante la escisión de la cadena invariable, antes de la carga del antígeno. En estudios se ha demostrado que los ratones deficientes en Cat S tienen una capacidad disminuida para presentar proteínas exógenas por las APC (células presentadoras de antígeno) (Nakagawa *et al.*, 1999). La especificidad de Cat S en el procesamiento de la cadena invariable li permite utilizar agentes terapéuticos específicos de Cat S para el tratamiento de trastornos, tales como el asma y los trastornos autoinmunitarios (Chapman *et al.*, 1997).

Asociación patológica de Cat S

Con frecuencia, unas alteraciones en el control de proteasas subyacen a muchos procesos patológicos humanos. Se ha relacionado a la expresión y actividad no reguladas de la cisteína proteasa lisosómica catepsina S con una gama de trastornos, que incluyen trastornos neurodegenerativos, enfermedades autoinmunitarias y ciertas malignidades.

La sobreexpresión de Cat S se ha relacionado con varios trastornos neurodegenerativos. Se cree que desempeña un papel en la producción del péptido β ($A\beta$) a partir de la proteína precursora amiloide (APP) (Munger *et al.*, 1995) y se ha demostrado que su expresión está sobreexpresada en la enfermedad de Alzheimer y en el síndrome de Down (Lemere *et al.*, 1995). La Cat S también puede desempeñar un papel en la esclerosis múltiple por la capacidad de la Cat S para degradar la proteína básica de mielina, un autoantígeno potencial implicado en la patogénesis de la esclerosis múltiple (Beck *et al.*, 2001), y se ha demostrado que en pacientes con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

(CJD), la expresión de Cat S aumenta en más de cuatro veces (Baker *et al.*, 2002).

La expresión aberrante de Cat S también se ha asociado con la aterosclerosis. La expresión de Cat S es insignificante en arterias normales, pero el ateroma humano muestra una fuerte inmunorreactividad (Sukhova *et al.*, 1998). Otros estudios que emplean ratones con genes inactivados, deficientes en Cat S y en el receptor de LDL, han demostrado que éstos desarrollan significativamente menos aterosclerosis (Sukhova *et al.*, 2003). Otras investigaciones han relacionado la expresión de Cat S con la enfermedad muscular inflamatoria y la artritis reumatoide. Especímenes de biopsia de músculo de pacientes con miopatía inflamatoria tienen un aumento en 10 veces en la expresión de Cat S, comparado con secciones de músculo normal (Wiendl *et al.*, 2003), y los niveles de expresión de Cat S son significativamente mayores en el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, comparado con los que padecen osteoartritis (Hashimoto *et al.*, 2001).

La asociación de Cat S con la angiogénesis se demostró por primera vez *in vitro* utilizando células endoteliales deficientes en Cat S (Shi *et al.*, 2003). Se ha demostrado que las células endoteliales microvasculares (EC) segregan proteasas, permitiendo la penetración de la membrana basal vascular, así como la matriz extracelular intersticial. El tratamiento de EC cultivadas con citoquinas inflamatorias o factores angiogénicos estimula la expresión de Cat S, y su inhibición reduce la formación de microtúbulos. Los ratones Cat S *-/-* muestran un desarrollo defectuoso de microvasos durante la curación de heridas en comparación con los controles de tipo salvaje (Shi *et al.*, 2003).

Se estudió más a fondo el papel de la Cat S en la angiogénesis y en el crecimiento tumoral en un modelo de ratón transgénico para el carcinoma de células de los islotes pancreáticos. Se descubrió que los ratones Cat S *-/-* desarrollaban tumores significativamente más pequeños y menos islotes angiogénicos, comparado con los ratones Cat S *+/+* control (Gocheva *et al.*, 2006). Posteriormente se comprendió mejor el mecanismo molecular que sustenta este fenotipo por las pruebas de que la Cat S puede romper e inactivar péptidos antiangiogénicos, y estimular la generación de fragmentos proangiogénicos activos (Wang *et al.*, 2006).

Por último, el papel de la Cat S en la malignidad y en la angiogénesis también se ha estudiado en un modelo murino de carcinoma hepatocelular. Un análisis de micromatrices de EC normales y de EC extraídas de un modelo tumoral demuestra que la expresión del gen Cat S es 74 veces mayor en las EC tumorales comparado con las células normales (Ryschich *et al.*, 2006). En Kos *et al.* (British Journal of Cancer, 85(8), pp. 1193-1200 (2001)) se describe un análisis inmunohistoquímico de tumores, nódulos linfáticos regionales y suero de pacientes con cáncer de pulmón que emplea anticuerpos monoclonales anti-Cat S humana. En Joyce *et al.* (Cancer Cell, 5(5), pp. 443-453 (2004)) se describe el uso de la formación de perfiles de expresión génica para demostrar que la actividad catepsina aumenta durante la tumorigénesis.

La generación de inhibidores dirigidos de modo específico a la actividad proteolítica de la Cat S tiene potencial como obtención de agentes terapéuticos para aliviar los síntomas asociados con la actividad de esta proteasa.

Inhibición de la Cat S

Cuando las proteasas se sobreexpresan, las estrategias terapéuticas se han centrado en el desarrollo de inhibidores para bloquear la actividad de estas enzimas. La generación de inhibidores de molécula pequeña específicos para las catepsinas ha demostrado ser muy difícil en el pasado, debido a problemas con la selectividad y con la especificidad. Los α -ceto- β -aldehídos dipeptídicos desarrollados como potentes inhibidores reversibles para la Cat S por Walker *et al.* tienen la capacidad para inhibir la Cat B y L, aunque con menos eficacia (Walker *et al.*, 2000), y el inhibidor de Cat S 4-morfolinurea-Leu-HomoPhe-vinilsulfona (LHVS) también ha demostrado ser capaz de inhibir otras catepsinas cuando se utiliza a concentraciones mayores (Palmer *et al.*, 1995).

El documento PCT/GB2006/001314 (documento WO 2006/109045), presentado el 10 de abril de 2006, y que comparte un inventor con la presente solicitud, describe un anticuerpo monoclonal con especificidad por la catepsina S que inhibe con gran potencia la actividad proteolítica de la catepsina S. Se demostró que este anticuerpo inhibe la invasión de células tumorales y la angiogénesis. El documento WO 2006/109045 indica que esta es la primera demostración de un anticuerpo específico de la catepsina S que inhibe directamente la actividad proteasa de la catepsina S y, por tanto, permite de modo exclusivo el uso de dichos anticuerpos como agentes terapéuticos activos con una amplia gama de aplicaciones.

Además de lo descrito en el documento WO 2006/109045, no existen informes de anticuerpos anti-catepsina S que tengan un potencial terapéutico demostrable. De manera notable, aunque algunos anticuerpos que se unen a ciertas proteínas concretas han demostrado tener algún efecto sobre la actividad normal de la proteína concreta, esto no se ha demostrado previamente para ningún anticuerpo que se une a la catepsina S. En efecto, en el documento WO 2006/109045 se demuestra que los anticuerpos control que se unen a catepsina S pero que no afectan a la actividad proteolítica no tienen ningún efecto sobre la invasión de células tumorales.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han estudiado los efectos de una serie de anticuerpos de catepsina S sobre una serie de modelos de enfermedades.

Los presentes inventores han demostrado, por primera vez, que los anticuerpos que tienen especificidad por la catepsina S, pero que no inhiben la actividad proteolítica de la catepsina S, no obstante actúan como potentes inhibidores de la angiogénesis. Esto resultó particularmente sorprendente para los inventores debido a que, tal como se indica en el documento WO 2006/109045, se cree que para contrarrestar los efectos patológicos de la desregulación de la actividad catepsina S, se requieren estrategias que inhiban los efectos proteolíticos de la catepsina S. Además, aunque se ha sugerido el uso de anticuerpos para secuestrar proteínas como estrategia terapéutica para algunas proteínas, por ejemplo, VEGF, dicha estrategia no se ha considerado, hasta la fecha, como factible para el tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad catepsina S.

Por consiguiente, en la presente se describe un método para tratar un trastorno asociado con la angiogénesis en un paciente que necesite tratamiento para ello, comprendiendo dicho método la administración de una molécula de anticuerpo, o de un ácido nucleico que codifique dicha molécula de anticuerpo, a dicho paciente, en el que dicha molécula de anticuerpo se une de modo específico a la catepsina S pero no inhibe la actividad proteolítica de la catepsina S.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de una molécula de anticuerpo, o de un ácido nucleico que codifique la molécula de anticuerpo, en el que dicha molécula de anticuerpo se une de modo específico a la catepsina S pero no inhibe la actividad proteolítica de la catepsina S, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, un trastorno inflamatorio, una enfermedad ocular, la aterosclerosis, un trastorno neurodegenerativo, un trastorno autoinmunitario, el hemangioma, un tumor sólido, la leucemia, la telangiectasia, la psoriasis, la esclerodermia, el granuloma piogénico, la angiogénesis miocárdica, la enfermedad de Crohn, la neovascularización de placas, los colaterales coronarios, los colaterales cerebrales, las malformaciones arteriovenosas, la angiogénesis de extremidades isquémicas, la artritis, la neovascularización diabética, la úlcera péptica, una enfermedad relacionada con *Helicobacter*, una fractura, los queloides, y la vasculogénesis, la colitis ulcerosa o la bartonellosis. Dicha molécula de anticuerpo es la molécula de anticuerpo del tercer aspecto de la invención.

La invención puede utilizarse para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno en los que la angiogénesis desempeñe un papel en la patología de la enfermedad. Dichos trastornos y enfermedades incluyen, pero no se limitan a cáncer, trastornos inflamatorios, por ejemplo enfermedad de los músculos inflamatoria, artritis reumatoide y asma, enfermedades oculares, aterosclerosis y cáncer.

Además, la demostración de que las moléculas de anticuerpo que se unen de modo específico a la catepsina S pero que no inhiben la actividad proteolítica de la catepsina S, no obstante inhiben la angiogénesis, permite el uso de dichas moléculas de anticuerpo para el tratamiento de otros trastornos asociados con la catepsina S.

También se describe un método para tratar un trastorno asociado con la actividad de la catepsina S en un paciente que necesite tratamiento para ello, comprendiendo dicho método la administración de una molécula de anticuerpo, o de un ácido nucleico que codifique la molécula de anticuerpo, a dicho paciente, en el que dicha molécula de anticuerpo se une de modo específico a la catepsina S pero no inhibe la actividad proteolítica de la catepsina S.

También se describe el uso de una molécula de anticuerpo, o de un ácido nucleico que codifique la molécula de anticuerpo, en el que dicha molécula de anticuerpo se une de modo específico a la catepsina S pero no inhibe la actividad proteolítica de la catepsina S, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado con la actividad o la expresión aberrantes de la catepsina S.

La invención puede utilizarse para el tratamiento de un trastorno con el que esté asociada una actividad aberrante de la catepsina S, en particular trastornos asociados con la expresión de la catepsina S. Por ejemplo, los trastornos en los que puede utilizarse la invención incluyen, pero no se limitan a trastornos neurodegenerativos, por ejemplo la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis múltiple, trastornos autoinmunitarios, y otras enfermedades asociadas con una angiogénesis excesiva, no regulada o inapropiada.

En la invención puede utilizarse cualquier molécula de anticuerpo anti-catepsina S, que no inhiba la actividad proteolítica de la catepsina S, pero que sí inhiba la angiogénesis.

Tal como se describe en los ejemplos, los inventores han identificado la región de unión sobre la catepsina S a la cual se une de modo específico el anticuerpo 1E4. La región de unión tiene la secuencia de aminoácidos que aparece como Secuencia ID NO:1:

ELPYGREDVLKEAVANKGPVSVGVGDARHP (Secuencia ID NO:1)

Por consiguiente, en un segundo aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido aislado, en el que dicho polipéptido consiste en una secuencia de un polipéptido que tienen al menos 90% de homología con la Secuencia ID NO:1. En una realización, la secuencia del polipéptido consiste en una secuencia de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que aparece como Secuencia ID NO:1.

Por tanto, en un tercer aspecto de la invención, se proporciona una molécula de anticuerpo que se une de modo específico a la catepsina S y que inhibe la angiogénesis, pero que no inhibe la actividad proteolítica de la catepsina

S, en la que dicha molécula de anticuerpo tiene especificidad de unión por el polipéptido del segundo aspecto de la invención.

En una realización de la invención, la molécula de anticuerpo es un anticuerpo 1E4 o su fragmento o variante.

5 La molécula de anticuerpo puede ser un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo completo. En una realización alternativa, la molécula de anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un scFv.

Las moléculas de anticuerpo relacionadas que también inhiben la angiogénesis pero que no inhiben la actividad proteolítica de la cathepsina S, y que opcionalmente tienen una especificidad de unión similar o mayor, también pueden utilizarse como la molécula de anticuerpo en la presente invención.

10 Dichas moléculas de anticuerpo pueden comprender al menos una de las CDR de la cadena V_H del anticuerpo 1E4 y/o al menos una de las CDR de la cadena V_H del anticuerpo 1E4, en las que se han realizado 5 o menos, por ejemplo 4, 3, 2 ó 1 sustituciones de aminoácidos en al menos una CDR, y en las que la molécula de anticuerpo conserva la capacidad para inhibir la angiogénesis pero no tiene la capacidad para inhibir la actividad proteolítica de la cathepsina S.

15 En una realización de la invención, la molécula de anticuerpo de la invención y para su uso en la invención tiene la capacidad de inhibir la invasión de células tumorales.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona una molécula de anticuerpo según el tercer aspecto de la invención, o un ácido nucleico que codifique dicha molécula de anticuerpo, para su uso en terapia.

20 Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende una molécula de anticuerpo según el tercer aspecto de la invención, o un ácido nucleico que codifique la molécula de anticuerpo, en la que dicha molécula de anticuerpo se une de modo específico a la cathepsina S pero no inhibe la actividad proteolítica de la cathepsina S.

Las características preferidas y alternativas de cada aspecto de la invención son como para cada uno de los otros aspectos cambiando lo que se deba cambiar, a menos que el contexto demande lo contrario.

Descripción detallada

Moléculas de anticuerpo

25 En el contexto de la presente invención, una molécula de anticuerpo (o un miembro de unión específica) es una molécula que tiene especificidad de unión por otra molécula, en particular por la cathepsina S. La molécula de anticuerpo puede ser un anticuerpo o su fragmento.

30 Debe entenderse que un anticuerpo se refiere a una inmunoglobulina, o a una parte de ésta, o a cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión que es un dominio de unión de anticuerpo o que sea homólogo con éste. Las moléculas de anticuerpo específicas incluyen, pero no se limitan a anticuerpos policlonales, monoclonales, mono-específicos, poliespecíficos y sus fragmentos, y anticuerpos quiméricos que comprenden un dominio de unión de inmunoglobulina condensado con otro polipéptido. Las moléculas de anticuerpo también incluyen miméticos de anticuerpos.

35 Los anticuerpos intactos (completos) comprenden una molécula de inmunoglobulina que consiste en cadenas pesadas y cadenas ligeras, portando cada una de ellas una región variable denominada V_H y V_L, respectivamente. La región variable consiste en tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR, también conocidas como regiones hipervariables) y cuatro regiones de marco (FR) o andamiaje. La CDR forma una estructura estérica complementaria con la molécula de antígeno y determina la especificidad del anticuerpo.

40 Los fragmentos de anticuerpos pueden conservar la capacidad de unión del anticuerpo intacto y pueden utilizarse en lugar del anticuerpo intacto. Por consiguiente, para los objetivos de la presente invención, a menos que el contexto demande lo contrario, debe entenderse que la expresión "moléculas de anticuerpo" incluye fragmentos de anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, dAb y Fv, scFv, scFv biespecíficos, diacuerpos, anticuerpos lineales (véase la patente de EEUU 5.641.870, ejemplo 2; Zapata *et al.*, Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995)), moléculas de anticuerpo monocatenarias, y anticuerpos multiespecíficos
45 formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El fragmento Fab consiste en una cadena L entera (V_L y C_L), junto con V_H y C_H1. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab porque tienen unos pocos restos más en el extremo carboxi-terminal del dominio C_H1 que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. El fragmento F(ab')₂ comprende dos fragmentos Fab unidos por disulfuro.

50 Los fragmentos Fd consisten en los dominios V_H y C_H1.

Los fragmentos Fv consisten en los dominios V_H y V_L de un único anticuerpo.

Los fragmentos Fv monocatenarios son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios VH y VL conectados por un conector que permite que el scFv forme un sitio de unión al antígeno (véase Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore, eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994)).

- 5 Los diacuerpos son pequeños fragmentos de anticuerpos preparados construyendo fragmentos scFv (véase el párrafo anterior) con conectores cortos (aproximadamente 5-10 restos) entre los dominios VH y VL, de forma que se logra un apareamiento intercatenario, pero no intracatenario, de los dominios V, dando como resultado un fragmento multivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión al antígeno (véanse, por ejemplo, los documentos EP 404.097, WO 93/11161, y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)).

- 10 También se incluyen como fragmentos las CDR individuales.

Tal como se describió anteriormente, las moléculas de anticuerpo de la presente invención y para su uso en la misma no están limitadas al anticuerpo 1E4, sino que también se extienden a otros anticuerpos que mantienen la capacidad para inhibir la angiogénesis pero que no inhiben la actividad proteolítica de Cat S. Por tanto, las secuencias de aminoácidos de las CDR de dichos anticuerpos en las que uno o más restos aminoácidos están modificados también pueden utilizarse como secuencia de CDR. Los restos aminoácidos modificados en las secuencias de aminoácidos del variante de CDR son preferiblemente 30% o menos, más preferiblemente 20% o menos, y lo más preferiblemente 10% o menos, dentro de la CDR completa. Estos variantes pueden proporcionarse utilizando las indicaciones de la presente solicitud y las técnicas conocidas en la técnica. Las CDR pueden ser portadas en una estructura de marco que comprenda una secuencia de la cadena pesada o ligera del anticuerpo, o una parte de ésta. Preferiblemente, dichas CDR se colocan en una posición que se corresponde con la posición de la CDR o de las CDR de los dominios VH y VL naturales. Las posiciones de dichas CDR pueden determinarse como se describe en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Nat'l Inst. of Health, publicación NIH n° 91-3242, 1991, y en línea en www.kabatdatabase.com, <http://immuno.bme.nwu.edu>.

- 25 También, como alternativa, o además, pueden realizarse modificaciones en las regiones de marco de las regiones variables. Estos cambios en las regiones de marco pueden mejorar la estabilidad y reducir la inmunogenicidad del anticuerpo.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos "quiméricos", en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga con las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de una especie concreta o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos concretas, mientras que el resto de la cadena (s) es idéntica u homóloga con las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, con la condición de que muestren la actividad biológica deseada (véase, la patente de EEUU n° 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión al antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, un mono del Viejo Mundo, un simio, etc.), y secuencias de la región constante humanas.

Producción de anticuerpos

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención y para su uso en la misma pueden producirse de cualquier forma adecuada, de modo natural o sintético. Estos métodos pueden incluir, por ejemplo, las técnicas de hibridoma tradicionales (Kohler y Milstein (1975), *Nature*, 256:495-499), las técnicas de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EEUU n° 4.816.567), o las técnicas de presentación de fagos que emplean bancos de anticuerpos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.* (1991), *Nature*, 352:624-628; y Marks *et al.* (1992), *Bio/Technology*, 10:779-783). Otras técnicas de producción de anticuerpos se describen en *Antibodies: A Laboratory Manual*, eds. Harlow *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

Las técnicas de hibridoma tradicionales generalmente implican la inmunización de un ratón u otro animal con un antígeno para provocar la producción de linfocitos capaces de unirse al antígeno. Los linfocitos se aíslan y se condensan con una línea celular de mieloma para formar células de hibridoma que después se cultivan en condiciones que inhiben el crecimiento de las células de mieloma de origen, pero que permiten el crecimiento de las células productoras de anticuerpos. El hibridoma puede someterse a mutación genética, que puede alterar o no la especificidad de unión de los anticuerpos producidos. Pueden producirse anticuerpos sintéticos utilizando técnicas conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Knappik *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2000), 296, 57-86; y Krebs *et al.*, *J. Immunol. Meth.* (2001), 2154, 67-84).

Pueden producirse modificaciones en las VH, VL o CDR de las moléculas de anticuerpos, o también en los FR, utilizando cualquier técnica adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, pueden producirse dominios VH y/o VL variables introduciendo una CDR, por ejemplo CDR3, en un dominio VH o VL que carezca de dicha CDR. En Marks *et al.* (1992), *Bio/Technology*, 10:779-783, se describe una técnica de reordenamiento en que se genera un repertorio de dominios variables de VH que carecen de CDR3, y después se combinan con una CDR3 de un

anticuerpo concreto para producir nuevas regiones VH. Utilizando técnicas análogas pueden producirse nuevos dominios VH y VL que comprendan secuencias derivadas de CDR de la presente invención.

Otras técnicas para producir variantes de anticuerpos de la invención pueden implicar la mutagénesis aleatoria de un gen o de genes que codifican el dominio VH o VL utilizando, por ejemplo, PCR propensa a errores (véase, Gram *et al.*, 1992, P.N.A.S., 89:3576-3580). Como alternativa, o además, las CDR pueden fijarse como objetivo para la mutagénesis, por ejemplo utilizando las estrategias de evolución molecular descritas por Barbas *et al.*, 1991, PNAS, 3809-3813; y Scier, 1996, J. Mol. Biol., 263, 551-567.

Tras producir dichos variantes, los anticuerpos y los fragmentos pueden ensayarse para la unión a Cat S y para la capacidad para inhibir la actividad proteolítica de la catepsina S.

Tal como se describe en la presente, los inventores han demostrado que las moléculas de anticuerpo según la invención tienen un efecto antiangiogénico. Por tanto, esto permite el uso de las moléculas de anticuerpo de la invención como agentes terapéuticos activos. Según una realización de la invención, la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo “desnuda”. Una molécula de anticuerpo “desnuda” es una molécula de anticuerpo que no está conjugada con un “agente terapéutico activo”.

En el contexto de la presente solicitud, un “agente terapéutico activo” es una molécula o un átomo que está conjugado con un resto de anticuerpo (incluyendo fragmentos de anticuerpos, CDR, etc.) para producir un conjugado. Los ejemplos de dichos “agentes terapéuticos activos” incluyen fármacos, toxinas, radioisótopos, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, tintes, nanopartículas, etc.

En otra realización de la invención, la molécula de anticuerpo está en forma de un inmunoconjugado, que comprende un fragmento de anticuerpo conjugado con un “agente terapéutico activo”.

Los métodos para producir inmunoconjugados son muy conocidos en la técnica; por ejemplo, véase la patente de EEUU nº 5.057.313; Shih *et al.*, Int. J. Cancer, 41:832-839 (1988); Shih *et al.*, Int. J. Cancer, 46:1101-1106 (1990); Wong, Chemistry Of Protein Conjugation And Cross-Linking (CRC Press, 1991); Upeslakis *et al.*, “Modification of Antibodies by Chemical Methods”, en Monoclonal Antibodies: Principles And Applications, Birch *et al.* (eds.), pp. 187-230 (Wiley-Liss, Inc., 1994); Price, “Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies”, en Monoclonal Antibodies: Production, Engineering And Clinical Application, Ritter *et al.* (eds.), pp. 60-84 (Cambridge University Press, 1995).

Las moléculas de anticuerpo de la invención y para su uso en la misma pueden comprender otras modificaciones. Por ejemplo, los anticuerpos pueden estar glicosilados, pegilados, o unidos a albúmina o a un polímero no proteico. La molécula de anticuerpo puede estar en forma de un inmunoconjugado.

Los anticuerpos de la invención pueden estar marcados. Los marcadores que pueden utilizarse incluyen radiomarcadores, marcadores enzimáticos, tales como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, o biotina.

Tal como se indicó anteriormente, los anticuerpos de la invención y para su uso en los métodos de la misma no inhiben el efecto proteolítico de la catepsina S. La capacidad de una molécula de anticuerpo para inhibir la actividad proteolítica de la catepsina S puede ensayarse utilizando cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede ensayarse la capacidad de una molécula de anticuerpo para inhibir la actividad proteolítica de la catepsina S utilizando un ensayo fluorimétrico. En este ensayo, puede emplearse cualquier sustrato fluorogénico adecuado, por ejemplo Cbz-Val-Val-Arg-AMC. Se considera que una molécula de anticuerpo inhibe la actividad proteolítica de la catepsina S si tiene la capacidad para inhibir su actividad en una cantidad significativa. Por ejemplo, en una realización, se considera que la molécula de anticuerpo no inhibe la actividad proteolítica si inhibe la actividad proteolítica en no más del 10%, por ejemplo no más del 5%, tal como no más del 2%, por ejemplo menos del 1%, tal como 0%, comparado con un anticuerpo control apropiado conocido por inhibir el efecto proteolítico de la catepsina S.

Puede ensayarse la capacidad de una molécula de anticuerpo para inhibir la angiogénesis utilizando cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica. Se conocen muchos ensayos *in vitro* e *in vivo* en la técnica. Estos incluyen ensayos de tapón de Matrigel y de neovascularización corneal, el ensayo de la membrana corioalantoica de pollito (CAM) *in vivo/in vitro*, y los ensayos celulares (proliferación, migración, formación de tubos) y organotípicos (anillo aórtico) *in vitro*, los ensayos de arco aórtico de pollito y de esponja de Matrigel. Pueden encontrarse más detalles de dichos ensayos, por ejemplo, en Auerbach *et al.*, Clinical Chemistry, 49:32-40, 2003; 10.1373/49.1.32. En los ejemplos también se proporcionan más detalles.

Puede ensayarse la capacidad de una molécula de anticuerpo para inhibir la invasión de células tumorales utilizando cualquier ensayo de invasión adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, esta capacidad puede ensayarse utilizando una cámara de Boyden modificada, tal como se describe en los ejemplos. La molécula de anticuerpo puede ensayarse utilizando cualquier línea celular tumoral adecuada, por ejemplo una línea celular de carcinoma de próstata, por ejemplo PC3, una línea celular de astrocitoma, por ejemplo U251mg, una línea celular de carcinoma colorrectal, por ejemplo HCT116, o una línea celular de cáncer de mama, por ejemplo MDA-MB-231 o MCF7. Se considera que una molécula de anticuerpo inhibe la invasión de células tumorales si tiene la capacidad para inhibir la

invasión en una cantidad estadísticamente significativa. Por ejemplo, en una realización la molécula de anticuerpo es capaz de inhibir la invasión en al menos 10%, por ejemplo al menos 25%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o al menos 90%, cuando se compara con un anticuerpo control apropiado.

- 5 En una realización de la invención, una molécula de anticuerpo para su uso en la invención puede tener una actividad inhibidora (por ejemplo, para inhibir la angiogénesis) con una potencia de al menos 25%, por ejemplo al menos 40%, por ejemplo al menos 50% de la potencia inhibidora del anticuerpo 1E4.

Polipéptidos

- 10 Tal como se describió anteriormente, los inventores han identificado la región de unión a la que se une el anticuerpo 1E4. Por consiguiente, la invención se extiende a un polipéptido aislado, en el que dicho polipéptido consiste en una secuencia de polipéptido que tiene al menos 90% de homología, o al menos 95% de homología con la Secuencia ID NO:1. En una realización, la secuencia del polipéptido consiste en una secuencia de polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que aparece como Secuencia ID NO:1:

ELPYGREDVLKEAVANKGPVSVGVGDARHP (Secuencia ID NO:1)

- 15 Por tanto, un polipéptido variante según la presente invención puede incluir, dentro de la secuencia mostrada como Secuencia ID NO:1, el cambio de un único aminoácido o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 cambios, o aproximadamente 10, 15 cambios. Además de dicho uno o más cambios dentro de la secuencia de aminoácidos mostrada, un polipéptido variante puede incluir aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal y/o C-terminal.

- 20 La homología (es decir, similitud o coincidencia) puede definirse utilizando comparaciones de secuencias empleando FASTA y FASTP (véase, Pearson y Lipman, 1988, Methods in Enzymology, 183:6398). Preferiblemente, los parámetros se ajustan utilizando la matriz por defecto como sigue: Gapopen (penalización para el primer resto en un hueco): -12 para proteínas/-16 para ADN; Gapext (penalización por restos adicionales en un hueco): -2 para proteínas/-4 para ADN; longitud de palabra KTUP: 2 para proteínas/6 para ADN. La homología puede ser al nivel de la secuencia de nucleótidos y/o de la secuencia de aminoácidos codificada.

- 25 Naturalmente, con respecto a los variantes de ácidos nucleicos, los cambios en el ácido nucleico que no producen diferencias en el polipéptido codificado (es decir, "degenerativamente equivalentes") se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

- 30 Los cambios en una secuencia pueden ser de una o más adiciones, inserciones, deleciones o sustituciones de uno o más nucleótidos en el ácido nucleico, y conducen a la adición, inserción, delección o sustitución de uno o más aminoácidos en la polipéptido codificado. Los cambios pueden realizarse por medio de una variación conservadora, es decir, la sustitución de un resto hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro, o la sustitución de un resto polar por otro, tal como arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina. Tal como conocen los expertos en la técnica, la alteración de la estructura primaria de un polipéptido mediante una sustitución conservadora puede no alterar significativamente la actividad de ese péptido, porque la cadena lateral del aminoácido que se inserta en la secuencia puede ser capaz de formar enlaces y contactos similares a los de la cadena lateral del aminoácido que ha sido sustituido. Esto es cierto incluso cuando la sustitución se realiza en una región que es crítica para la determinación de la conformación del péptido.

- 40 También se incluyen los variantes que tienen sustituciones no conservadoras. Tal como conocen los expertos en la técnica, las sustituciones en regiones de un péptido que no son críticas para la determinación de su conformación pueden no afectar en gran medida su actividad, porque no alteran en gran medida la estructura tridimensional del péptido.

En las regiones que son críticas para la determinación de la conformación o de la actividad del péptido, estos cambios pueden conferir propiedades ventajosas al polipéptido. En efecto, los cambios tales como los descritos anteriormente pueden conferir propiedades ligeramente ventajosas al péptido, por ejemplo una estabilidad o una especificidad alteradas.

45 Ácido nucleico

El ácido de la presente invención y para su uso en la misma puede comprender ADN o ARN. Puede producirse de modo recombinante, sintético o mediante cualquier medio disponible para los expertos en la técnica, incluyendo las técnicas convencionales que emplean la clonación.

- 50 El ácido nucleico puede insertarse en cualquier vector apropiado. Un vector que comprende un ácido nucleico de la invención forma otro aspecto de la presente invención. En una realización, el vector es un vector de expresión, y el ácido nucleico está unido operablemente a una secuencia control que es capaz de proporcionar la expresión del ácido nucleico en una célula hospedante. Puede utilizarse una diversidad de vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados pueden incluir virus (por ejemplo, virus de vaccinia, adenovirus, etc., baculovirus), vectores de levaduras, fagos, cromosomas, cromosomas artificiales, plásmidos, o ADN de cósmido.

Los vectores pueden utilizarse para introducir los ácidos nucleicos de la invención en una célula hospedante. Puede utilizarse una amplia diversidad de células hospedantes para la expresión del ácido nucleico de la invención. Las células hospedantes adecuadas para su uso en la invención pueden ser procariotas o eucariotas. Incluyen bacterias, por ejemplo, *E. coli*, levaduras, células de insecto y células de mamífero. Las líneas celulares de mamífero que pueden utilizarse incluyen células de ovario de hámster chino, células de riñón de cría de hámster, células de melanoma de ratón NSO, líneas celulares de mono y humanas y sus derivados, y muchas otras.

Puede utilizarse una cepa de células hospedantes que module la expresión, modifique y/o procese de modo específico el producto génico. Este procesamiento puede implicar la glicosilación, la ubiquitinación, la formación de enlaces disulfuro y la modificación postraduccional general.

Por consiguiente, la presente invención también proporciona una célula hospedante, que comprende uno o más ácidos nucleicos o vectores de la invención.

También se incluye en la invención un método para la producción de una molécula de anticuerpo de la invención, comprendiendo dicho método cultivar una célula hospedante que comprende un ácido nucleico de la invención bajo condiciones en las que se produce la expresión de las moléculas de anticuerpo a partir de los ácidos nucleicos y, opcionalmente, aislar y/o purificar la molécula de anticuerpo.

Para más detalles con relación a las técnicas y los protocolos conocidos para la manipulación de un ácido nucleico, por ejemplo para la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y para el análisis de proteínas, véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, 5ª ed., Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, 2005; y *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3ª edición, Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Tratamiento

Las moléculas de anticuerpo y los ácidos nucleicos de la invención pueden utilizarse para el tratamiento de una serie de trastornos médicos.

Un "tratamiento" incluye cualquier régimen que puede beneficiar a un ser humano o a un animal no humano. El tratamiento puede ser con respecto a un trastorno existente o puede ser profiláctico (tratamiento preventivo). El tratamiento puede incluir efectos curativos, de alivio o profilácticos.

Las moléculas de anticuerpo y los ácidos nucleicos de la invención pueden utilizarse para el tratamiento de una diversidad de trastornos y afecciones. Estos incluyen aterosclerosis y enfermedad neoplásica, trastornos neurodegenerativos, enfermedades autoinmunitarias, cáncer, trastornos inflamatorios, asma, aterosclerosis, y dolor.

Los trastornos neurodegenerativos que pueden tratarse utilizando las moléculas de anticuerpo, los ácidos nucleicos y los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

Las enfermedades autoinmunitarias en las que puede utilizarse la invención incluyen la enfermedad de los músculos inflamatoria y la artritis reumatoide.

Las moléculas de anticuerpo, los ácidos nucleicos y los métodos de la invención también pueden utilizarse para el tratamiento de cánceres.

El "tratamiento del cáncer" incluye el tratamiento de trastornos provocados por el crecimiento canceroso y/o la vascularización, e incluye el tratamiento de tumores o crecimientos neoplásicos. Los ejemplos de tumores que pueden tratarse utilizando la invención son, por ejemplo, sarcomas, incluyendo sarcomas osteogénicos y de tejido blando, carcinomas, por ejemplo carcinoma de mama, pulmón, vejiga, tiroides, próstata, colon, recto, páncreas, estómago, hígado, útero, próstata, cervical y ovárico, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma hepatocelular, linfomas, incluyendo linfomas de Hodgkin y no hodgkiniano, neuroblastoma, melanoma, mieloma, tumor de Wilms, y leucemias, incluyendo leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloblástica aguda, astrocitomas, gliomas y retinoblastomas.

La invención puede ser particularmente útil para el tratamiento de un cáncer existente y para la prevención de la recurrencia del cáncer después de un tratamiento inicial o cirugía.

Las moléculas de anticuerpo, los ácidos nucleicos y las composiciones de la invención también pueden utilizarse para el tratamiento de otros trastornos mediados o asociados con la angiogénesis. Estos trastornos incluyen, por ejemplo, tumores, diversos trastornos autoinmunitarios, trastornos hereditarios, y trastornos oculares.

Los trastornos oculares concretos asociados con la angiogénesis que pueden tratarse utilizando los métodos y las moléculas de anticuerpo de la invención incluyen rechazo a injertos corneales, neovascularización tras lesiones o infecciones, rubeosis, retinopatía diabética, fibroplasia retrolenticular y glaucoma neovascular, enfermedades corneales y degeneración macular.

Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para tratar otros trastornos mediados por la angiogénesis, incluyendo hemangioma, tumores sólidos, leucemia, metástasis, telangiectasia, psoriasis, esclerodermia, granuloma piogénico, angiogénesis miocárdica, enfermedad de Crohn, neovascularización de placas, colaterales coronarios, colaterales cerebrales, malformaciones arteriovenosas, angiogénesis de extremidades isquémicas, enfermedades corneales, fibroplasia retrolenticular, artritis, neovascularización diabética, úlcera péptica, enfermedades relacionadas con *Helicobacter*, fracturas, queloides, y vasculogénesis.

Los trastornos específicos que pueden tratarse, y los compuestos y las composiciones para su uso en los métodos de la presente invención se describen con más detalle a continuación.

Trastornos oculares mediados por la angiogénesis

Diversos trastornos oculares son mediados por la angiogénesis y pueden tratarse utilizando los métodos descritos en la presente. Un ejemplo de una enfermedad mediada por la angiogénesis es la enfermedad neovascular ocular, que se caracteriza por la invasión de nuevos vasos sanguíneos hacia las estructuras del ojo, y es la causa más común de ceguera. En la degeneración macular relacionada con el envejecimiento, los problemas visuales asociados están provocados por un crecimiento hacia dentro de los capilares coroidales a través de defectos en la membrana de Bruch, con la proliferación de tejido fibrovascular por debajo del epitelio pigmentado retiniano. En la forma más grave de degeneración macular relacionada con el envejecimiento (conocida como DMRE "húmeda"), se produce una angiogénesis anómala bajo la retina que da como resultado una pérdida de visión irreversible. La pérdida de visión es debida a la formación de escaras en la retina tras un sangrado desde los nuevos vasos sanguíneos. Los tratamientos actuales para la DMRE "húmeda" utilizan una terapia basada en el láser para destruir los vasos sanguíneos causantes del problema. Sin embargo, este tratamiento no es ideal, puesto que el láser puede formar escaras permanentes en la retina que se encuentra por encima, y los vasos sanguíneos causantes del problema a menudo vuelven a desarrollarse. Una estrategia de tratamiento alternativa para la degeneración macular es el uso de agentes antiangiogénicos para inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos o la angiogénesis que provoca la pérdida de visión más grave de la degeneración macular.

Otros trastornos asociados o provocados por daños angiogénicos para los cuales puede utilizarse la presente invención incluyen retinopatía diabética, retinopatía de prematuridad, rechazo de injertos corneales, glaucoma neovascular y fibroplasia retrolenticular, enfermedades asociadas con la neovascularización corneal que incluyen, pero no se limitan a queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia en vitamina A, queratitis atópica, queratitis límbica superior, pterigio, queratitis sicca, y queratotomía radial periférica, enfermedades asociadas con la neovascularización retiniana/coroidal que incluyen, pero no se limitan a degeneración macular, miopía supuesta, fosas ópticas, desprendimiento de retina crónico, síndromes de hiperviscosidad, traumatismos y complicaciones después del láser. Otras enfermedades que pueden tratarse utilizando la invención incluyen, pero no se limitan a enfermedades asociadas con rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades provocadas por la proliferación anómala de tejido fibrovascular o fibroso, incluyendo todas las formas de vitreorretinopatía proliferativa, glaucoma neovascular, retinoblastoma, fibroplasia retrolenticular, rubeosis, uveitis, y neovascularización de injertos corneales, otras enfermedades inflamatorias del ojo, tumores oculares, y enfermedades asociadas con la neovascularización coroidal o del iris.

Inflamación

Las moléculas de anticuerpo y los métodos de la invención pueden utilizarse para el tratamiento de la inflamación. Mediante el bloqueo de la actividad de la Cat S, las moléculas de anticuerpo pueden prevenir la presentación adecuada de antígenos en las células "inflamadas" y, por tanto, mitigar los efectos inflamatorios.

En dicha realización, el anticuerpo, de modo ideal, se introduciría en la célula para ingresar en el lisosoma. Por tanto, pueden utilizarse métodos de transporte dirigido habituales en la técnica. Tal como se muestra en los ejemplos, a partir de experimentos de unión de pH, los inventores han demostrado que el anticuerpo se unirá incluso a pH 4,9, lo cual sugiere que puede ser eficaz en el lisosoma.

Los métodos de la invención también pueden utilizarse para tratar la inflamación asociada a la angiogénesis, incluyendo diversas formas de artritis, tales como la artritis reumatoide y la osteoartritis.

Además, en estos métodos, se proporciona un tratamiento con combinaciones de los compuestos descritos en la presente con otros agentes útiles para tratar los trastornos. Estos agentes incluyen, por ejemplo, inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), que son muy conocidos por los expertos en la técnica.

Los vasos sanguíneos en el revestimiento sinovial de las articulaciones pueden sufrir angiogénesis. Las células endoteliales forman nuevas redes vasculares y liberan factores y especies de oxígeno reactivo que conducen al crecimiento del pannus y la destrucción del cartílago. Se cree que estos factores contribuyen de forma activa a la artritis reumatoide y también a la osteoartritis. La activación de condrocitos por factores relacionados con la angiogénesis contribuye a la destrucción de las articulaciones, y también estimula la formación de hueso nuevo. Los métodos descritos en la presente pueden utilizarse como intervención terapéutica para evitar la destrucción del hueso y la formación de hueso nuevo.

Se cree que la angiogénesis patológica también está relacionada con la inflamación crónica. Los ejemplos de trastornos que pueden tratarse utilizando los métodos descritos en la presente incluyen colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, bartonelosis, y aterosclerosis.

Composiciones farmacéuticas

- 5 Las moléculas de anticuerpo y los ácidos nucleicos pueden administrarse como una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas según la presente invención, y para su uso según la presente invención, pueden comprender, además de los ingredientes activos, un excipiente, un vehículo, un tampón, un estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, Gennaro A.R. *et al.*, eds., Lippincott Williams & Wilkins, 2005).
- 10 Estos materiales pueden incluir tampones, tales como tampón acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes; conservantes; proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; carbohidratos; agentes quelantes; tonificantes; y tensioactivos.
- 15 Las composiciones farmacéuticas también pueden contener uno o más compuestos activos adicionales seleccionados según sean necesarios para la indicación concreta que se está tratando, preferiblemente con actividades complementarias que no afecten de modo adverso a la actividad de la molécula de anticuerpo, al ácido nucleico o a la composición de la invención. Por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, además de una molécula de anticuerpo anti-Cat S de la invención, la formulación puede comprender otro anticuerpo que se una a un epitopo diferente sobre Cat S, o un anticuerpo contra otra diana, tal como un factor del crecimiento que afecte, por ejemplo,
- 20 al crecimiento del cáncer concreto y/o un agente quimioterapéutico.
- Por ejemplo, en una realización, puede utilizarse una terapia de combinación que emplee un agente de unión específica de la invención y un agente que inhiba, por ejemplo, el factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF).
- De forma adecuada, puede utilizarse una terapia de combinación que emplee un agente de unión específica de la invención y un agente que inhiba el receptor de EGF, PDGFβ, trombina, bFGF, VEGFR quinasa, factor del
- 25 crecimiento de fibroblastos, tubulina, VEGF-A, o factor del crecimiento placentario.
- En realizaciones concretas, puede utilizarse una terapia de combinación que incluya al menos una molécula de anticuerpo de la invención y dos, tres o más agentes en combinación.
- En realizaciones concretas, puede utilizarse una terapia de combinación que emplee una molécula de anticuerpo de la invención y un agente seleccionado de Evizon™, PTK787, Retaane™, AG-13958, CAND5, Combretastatin™, o VEGF Trap™.
- 30 Empleando una terapia de combinación dirigida al menos a dos vías o mecanismos diferenciados puede obtenerse una mejor eficacia, por ejemplo un efecto sinérgico.
- Los ingredientes activos (por ejemplo, moléculas de anticuerpo y/o agentes quimioterapéuticos) pueden administrarse mediante microesferas, microcápsulas, liposomas y otros sistemas de transporte en micropartículas.
- 35 Por ejemplo, los ingredientes activos pueden introducirse dentro de microcápsulas que pueden prepararse, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa y gelatina, y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de transporte de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Para más detalles, véase Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, Gennaro A.R. *et al.*, eds., Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- 40 Pueden utilizarse preparaciones de liberación sostenida para el transporte de los agentes activos. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, supositorios o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico), polilactidas (patente de EEUU nº 3.773.919), copolímeros del ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros del ácido láctico-ácido glicólico degradables, y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico).
- 45 Tal como se describió anteriormente, los ácidos nucleicos de la invención también pueden utilizarse en métodos de tratamiento. Los ácidos nucleicos de la invención pueden transportarse a las células de interés utilizando cualquier técnica adecuada conocida en la técnica. El ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) puede transportarse a las células del paciente utilizando técnicas *in vivo* o *ex vivo*. Para la técnicas *in vivo*, puede utilizarse una transfección con vectores víricos (tales como adenovirus, virus del *Herpes simplex* I, o virus adenoasociados) y sistemas basados en lípidos (los lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo) (véase, por ejemplo, Anderson *et al.*, Science, 256:808-813 (1992); véase también el
- 50 documento WO 93/25673).
- 55

En las técnicas *ex vivo*, el ácido nucleico se introduce en células aisladas del paciente, administrándose las células modificadas al paciente directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU nº 4.892.538 y 5.283.187). Las técnicas disponibles para la introducción de ácidos nucleicos en células viables pueden incluir el uso de vectores retrovíricos, liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc.

La molécula de anticuerpo, el agente, el producto o la composición pueden administrarse de una manera localizada a un sitio de un tumor o a otro sitio deseado, o pueden administrarse de tal forma que se dirigen al tumor o a otras células. Pueden utilizarse terapias de transporte dirigido para transportar a los agentes activos de modo más específico hacia ciertos tipos de células, mediante el uso de sistemas de transporte dirigido, tales como ligandos específicos de células o anticuerpos. El transporte dirigido puede ser deseable por una serie de razones, por ejemplo si el agente es inaceptablemente tóxico, o si de otro modo requeriría una dosificación demasiado alta, o si de otro modo no pudiese entrar en las células diana.

Dosis

Las moléculas de anticuerpo, los ácidos nucleicos o las composiciones de la invención se administran preferiblemente a un individuo en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo ésta suficiente para que beneficie al individuo. El régimen de dosificación concreto dependerá de una serie de factores, incluyendo el trastorno que se está tratando, su gravedad, el paciente que se está tratando, el agente que se está empleando, y estará a discreción del médico.

La dosis óptima puede ser determinada por los médicos basándose en una serie de parámetros que incluyen, por ejemplo, la edad, el sexo, el peso, la gravedad del trastorno que se está tratando, el ingrediente activo que se está administrando y la vía de administración.

Como línea general pueden administrarse unas dosis de anticuerpos en cantidades de 1 ng/kg-500 mg/kg del peso del paciente.

Ensayos

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención también pueden utilizarse en ensayos de diagnóstico para determinar la presencia de catepsina o de células que expresan catepsina S en una muestra biológica. Por tanto, la molécula de anticuerpo de la invención puede utilizarse en un método de diagnóstico.

En una realización, la invención proporciona un método para determinar la presencia de células que expresan catepsina S en una muestra biológica, comprendiendo dicho método poner en contacto la muestra biológica con una molécula de anticuerpo de la invención y determinar la unión de la molécula de anticuerpo a la muestra biológica, en el que la unión de la molécula de anticuerpo a la muestra biológica, con relación a un control, es indicativa de la presencia de catepsina S.

Las moléculas de anticuerpo también pueden utilizarse para el diagnóstico de una diversidad de trastornos y afecciones asociados con la expresión o la actividad de la catepsina S. Estos métodos forman otro aspecto de la invención.

En una realización, la invención proporciona un método de ensayo para detectar un tumor en un sujeto, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra biológica procedente del sujeto con una molécula de anticuerpo de la invención;

(b) determinar el nivel de unión de la molécula de anticuerpo a la muestra biológica, en el que un nivel elevado de unión de la molécula de anticuerpo a la muestra biológica, con relación a una muestra control, es indicativa de la presencia de dicha enfermedad.

La invención puede utilizarse para controlar el avance de la enfermedad, por ejemplo utilizando muestras de biopsia en diferentes momentos. En dichas realizaciones, en lugar de comparar la expresión de la catepsina S frente a una muestra control procedente, por ejemplo, de diferentes fuentes de tejidos de las cuales se sabe que no tienen una mayor expresión de catepsina S, se compara la expresión de la catepsina S frente a una muestra biológica obtenida del mismo tejido en un momento anterior, por ejemplo de días, semanas o meses anteriores.

En la invención puede utilizarse cualquier muestra biológica adecuada; la naturaleza de la enfermedad o del trastorno puede determinar la naturaleza de la muestra que se vaya a utilizar en los métodos de la invención. La muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de una biopsia de tejido tumoral, una biopsia de médula ósea, o células circulantes, por ejemplo en sangre. Como alternativa, por ejemplo cuando los métodos se utilizan para diagnosticar o controlar un tumor gastrointestinal, pueden aislarse células tumorales de muestras de heces. Otras fuentes de muestras biológicas pueden incluir plasma, suero, fluido cerebroespinal, orina, fluido intersticial, fluido de ascitis, etc.

Por ejemplo, pueden recogerse muestras de tumores sólidos en un medio de cultivo de tejidos completo con antibióticos. Las células pueden separarse de modo manual del espécimen de tumor o, cuando sea necesario, se desprenden de modo enzimático mediante una incubación con colagenasa/ADNasa, y se suspenden en un medio apropiado que contenga, por ejemplo, suero humano o animal.

- 5 En otras realizaciones, las muestra de biopsia pueden aislarse y congelarse o fijarse en fijadores, tales como formaldehído. Las muestras entonces pueden ensayarse para los niveles de expresión de los genes en una etapa posterior.

- 10 La invención también se extiende a kits de diagnóstico para su uso para la detección de la catepsina S. Por tanto, en una realización, la invención se extiende a un kit para el diagnóstico de la presencia de catepsina S, comprendiendo dicho kit una o más moléculas de anticuerpo de la invención, o uno o más polipéptidos de la invención.

Puede utilizarse cualquier kit y método de ensayo adecuados. Éstos incluyen, pero no se limitan a ELISA, inmunohistoquímica, microscopía electrónica, aglutinación de látex, inmunoensayos de flujo lateral, inmunotransferencia e inmunoensayo DipStick.

- 15 La invención se describirá a continuación en los siguientes ejemplos no limitantes. Se hace referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

la figura 1 muestra fotografías de células HMEC cultivadas en control sólo con vehículo, un control de isotipo, un anticuerpo anti-catepsina S (mAb1), o un anticuerpo anti-catepsina S (mAb2);

la figura 1b ilustra gráficas que muestran la inhibición de la ramificación celular capilar observada en presencia de 1E11 (panel superior) o 1E4 (panel inferior);

- 20 la figura 2a ilustra fotografías de secciones de aorta cultivadas en presencia de un anticuerpo control y del anticuerpo anti-catepsina S 1E11 a concentraciones de 60, 300 y 600 nM;

la figura 2b (superior izquierda) ilustra una gráfica que resume el efecto del anticuerpo sobre la longitud de los vasos tal como se muestra en la figura 2a;

- 25 la figura 2b (superior derecha) ilustra una gráfica que resume el efecto del anticuerpo sobre el número de vasos tal como se muestra en la figura 2a;

la figura 2b (inferior) ilustra una gráfica que resume el efecto del anticuerpo sobre la longitud máxima de los vasos tal como se muestra en la figura 2a;

la figura 3a ilustra fotografías de secciones de aorta cultivadas en presencia de un anticuerpo control y del anticuerpo anti-catepsina S 1E11 a concentraciones de 1 ug/ml, 5 ug/ml, 10 ug/ml, y 100 ug/ml;

- 30 la figura 3b ilustra una gráfica que resume el efecto del anticuerpo en el experimento ilustrado en la figura 3a sobre el número de túbulos, la longitud media de los túbulos y la longitud máxima de los túbulos;

la figura 4 ilustra los resultados de un ensayo de invasión que demuestra la atenuación de la invasión del tumor HCT116 cuando se trata con Cat S 1E11 o 1E4;

la figura 5 ilustra la tinción con CD34 de tumores HCT116 tratados control;

- 35 la figura 6 ilustra la tinción con CD34 de tumores HCT116 tratados con 1E11 de Cat S;

la figura 7 ilustra el análisis de la expresión de ARN de Cat S en líneas celulares de leucemia (HEL, NB4 y U937). Los niveles de ARN se analizaron tras 40 ciclos de PCR para determinar la expresión de la diana; y

- 40 la figura 8 ilustra un análisis de la transferencia Western de la expresión de Cat S en líneas celulares de leucemia (HEL, NB4 y U937). Los niveles de proteínas se analizaron en lisados de células completas utilizando el anti-Cat S 1E4.

Métodos

Ensayo de la formación de tubos de tipo capilar

- 45 Se evaluó el efecto del mAb Cat S sobre la formación de tubos de células endoteliales como sigue. Se aplicaron 200 microlitros de Matrigel (10 mg/ml) a placas de 48 pocillos preenfriadas, se incubó durante 10 min a 4 °C, y después se dejó polimerizar durante 1 h a 37 °C. Las células se suspendieron en medio celular de crecimiento endotelial MV (Promocell) que contenía 200 mM del anticuerpo apropiado. Se añadieron 500 microlitros (1×10^5 células) a cada pocillo. Como control, se incubaron células con medio control sólo con vehículo que contenía los volúmenes apropiados de PBS. Después de 24 h de incubación a 37 °C y CO₂ al 5%, las células se visualizaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse TE300.

Ensayos de proliferación y viabilidad celular

Los efectos citotóxicos y proliferativos del anticuerpo monoclonal de Cat S sobre células de astrocitoma U251mg pueden ensayarse como se describió previamente. Brevemente, se añaden células hasta una concentración final de 1×10^4 células/200 μ l por pocillo de una placa de microvaloración de 96 pocillos (Corning Costar). Se añaden concentraciones apropiadas del anticuerpo monoclonal (100 mM) o medio control sólo con vehículo. Las placas se incuban a 37 °C y CO₂ al 5% durante 24, 48, 72 y 96 horas, respectivamente. Después de la incubación se añaden 10 μ l de MTT 10 mg/ml y se incuban durante 2 h más a 37 °C y CO₂ al 5%. El medio se retira con cuidado y se disuelven cristales de formazano en 100 μ l/pocillo de DMSO. Se mide la absorbancia tal como se describió anteriormente, y los resultados se expresan como el porcentaje de viabilidad y proliferación celular con relación a cada uno de los controles sólo con vehículo. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

Ensayo de herida

El ensayo de migración *in vitro* utilizado en estos estudios es una versión modificada del método descrito por Ashton *et al.* (1999). Se colocan HMEC-1 en las cámaras individuales de un portaobjetos de vidrio y se cultivan durante la noche hasta una confluencia del 90%. El medio se retira y se realiza una herida en la monocapa. La monocapa se resuplementa con medio fresco y se añade el volumen requerido de anticuerpos para producir la concentración final requerida. Los portaobjetos se retiran en momentos del tiempo fijados hasta el cierre completo de la herida, y después se fija en paraformaldehído tamponado con PBS al 4%. El grado de cierre de la “herida” es evaluado al microscopio de forma ciega por un investigador independiente y se cuantifica utilizando una retícula de pieza ocular calibrada (graduación 1 mm/100 μ m) con una magnificación 20x (Olympus BX 50). Se compara el grado de cierre en los portaobjetos tratados con anticuerpos con los controles de ensayo simulado, correspondientes al mismo momento, y se calcula el porcentaje de inhibición de cierre de la herida comparado con los controles correspondientes al mismo momento.

Modelo de la aorta de rata

Se eutanizan ratas Wistar macho y se retira la aorta torácica de modo aséptico y se secciona en anillos con un espesor de 1 cm. Los anillos se lavan diez veces en medio estéril para eliminar cualquier bacteria y se introducen en Matrigel sobre placas de 24 pocillos. Los pocillos se suplementan con 2 ml de medio y concentraciones crecientes de anticuerpos. La placa se incubaba durante 8 días, y tras la incubación el Matrigel y los anillos se fijan en paraformaldehído tamponado con PBS al 4% y se conservan en PBS. El grado de desarrollo de vasos es evaluado al microscopio de forma ciega por un investigador independiente y se cuantifica utilizando una retícula de pieza ocular calibrada (graduación 1 mm/100 μ m) con una magnificación 20x (Olympus BX 50). Se mide el grado de longitud de los vasos, la longitud máxima de los vasos, y el número de vasos en cada campo de visión, y se compara con los controles de ensayo simulado correspondiente al mismo momento, y se calcula el porcentaje de inhibición.

PCR

Se realizó una RT-PCR utilizando un ciclador térmico DNA Engine Tetrad 2 (Biorad). El ARN se recogió de los sedimentos celulares de leucemia utilizando el reactivo RNA STAT-60 (Tel-Test, Friendswood, EEUU) según las instrucciones del fabricante, y se sintetizó el ADNc utilizando 1 μ g de ARN y un kit de transcriptasa inversa (GIBCO Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Los conjuntos de cebadores utilizados para la RT-PCR fueron el cebador directo de Cat S 5'-ACT CAG AAT GTG AAT CAT GGT G-3', y el cebador inverso de Cat S 5'-TTC TTG CCA TCC GAA TAT ATC C-3'. Se analizó la expresión génica utilizando una mezcla de PCR Biomix (Bioline, Reino Unido) que contenía 25 μ l de Biomix; 1,5 μ l de cebador directo; 1,5 μ l de cebador inverso; 25 μ l de ADNc; 20 μ l de dH₂O. Las condiciones de la PCR consistieron en una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 30 sg; 55 °C durante 30 sg; 72 °C durante 90 seg, con una extensión final a 72 °C durante 10 min. Se cargaron 5 μ l del producto amplificado sobre un gel de agarosa al 1,5% (bromuro de etidio al 0,001%) que se ensayó a 90 V durante 40 minutos antes del análisis en una caja de UV.

Análisis de la transferencia Western

Las células se lavaron en PBS (5 minutos de centrifugación a 1500 rpm) antes de la lisis con tampón RIPA que contenía un cóctel de inhibidor de proteasa (Calbiochem, Reino Unido) tal como se describió previamente. Se cargaron los lisados de células enteras sobre geles de SDS-PAGE al 12% a concentraciones iguales. Los geles se ensayaron durante la noche a 50 V antes de transferir de modo semiseco a membranas de nitrocelulosa a 20 V durante 45 minutos (BioRad, Reino Unido). La membrana de nitrocelulosa se bloqueó utilizando PBS (leche en polvo al 3%) durante aproximadamente 1 hora, y se lavó x 3 con PBS (Tween al 0,01%) durante 5 minutos. La membrana entonces se sondó con una dilución de 1 en 200 de Mab 1E4 de Cat S en PBS (leche en polvo al 3%) durante 1 hora. La membrana se lavó x 3 con PBS (Tween al 0,01%) durante 10 minutos, antes de la adición de una dilución de 1 en 5000 del anticuerpo secundario antirratón de cabra conjugado con HRP (BioRad, Reino Unido) en PBS (leche en polvo al 3%) durante 1 hora. Esto entonces se lavó tres veces en PBS (Tween al 0,01%) durante 10 minutos cada uno. La membrana se “reveló” mediante ECL (quimioluminiscencia potenciada) utilizando el kit Super Signal (Pierce). La membrana se incubó en disolución ECL durante 5 minutos, antes del análisis utilizando un

sistema de formación de imágenes Kodak Gel Logic 1500 (Kodak).

Inmunohistoquímica

Se realizó la inmersión en parafina de muestras de tejido de xenoinjerto fijadas en formaldehído tal como se describió previamente. Se realizó una inmunotinción utilizando el método de avidina-peroxidasa de rábano (kit Vectorlabs ABC Elite).

Brevemente, las secciones se desparafinaron haciéndolas pasar desde Histoclear a alcohol a agua corriente. Entonces las secciones se hirvieron en tampón citrato, pH 6,0, durante 22 min. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena mediante una incubación en H₂O₂ al 3% en metanol durante 13 min. Se realizó una incubación en disolución de bloqueo de suero de conejo normal al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con CD34 primario antihumano de rata (Abcam) a una concentración de 2 µg/ml a 4 °C durante la noche. Se utilizaron los controles de isotipo apropiados con las mismas diluciones que los anticuerpos primarios.

Para la tinción con peroxidasa se incubaron secciones con anticuerpo secundario antirrata de conejo biotinilado (Vector Laboratories) durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de una incubación con el reactivo Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories) durante 30 min más a temperatura ambiente. Para la visualización, las secciones se tiñeron con 3,3'-diaminobenzidina y se contratiñeron con una disolución de hematoxilina II de Gill. Las secciones se analizaron utilizando una cámara Nikon Eclipse 80i.

Ensayo de invasión

Se realizaron ensayos de invasión *in vitro* utilizando una cámara Boyden modificada con membranas de poros de 12 µm. La superficie superior de la membrana se revistió con Matrigel (100 µg/cm²) y se dejó secar durante la noche en una campana de flujo laminar. Se añadieron las células (5 x 10⁵ células en 500 µl de medio exento de suero) en presencia de concentraciones predeterminadas del anticuerpo y la proteína recombinante apropiados. Se añadió medio completo fresco a las cámaras inferiores (1,5 ml), suplementado con la misma concentración del anticuerpo o de la proteína recombinante que se aplicó al correspondiente pocillo superior. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, y las placas de invasión se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5% durante 24 horas.

Las células que permanecen sobre la superficie superior de la membrana se retiraron limpiando con torundas de algodón, y las células que han invadido se fijaron en fijador de Carnoy durante 15 minutos. Después de secar, los núcleos de las células invadidas se tiñeron con Hoechst 33258 (50 ng/ml) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. El inserto de la cámara se lavó dos veces en PBS, se montó en medio de montaje PermaFluor, y las células invadidas se visualizaron con un microscopio fluorescentes Nikon Eclipse TE300. Se tomaron diez imágenes digitales de campos representativos de cada una de las membranas por triplicado utilizando una cámara digital Nikon DXM1200 con una magnificación de 20x. Los resultados se analizaron utilizando Lucia GF 4.60 por Laboratory Imaging y se expresaron como el porcentaje de células invadidas comparadas con los controles.

Resultados y análisis

Ejemplo 1: Los anticuerpos Cat S pueden inhibir la formación de estructuras de tipo tubo en células endoteliales humanas

Utilizando el ensayo de morfogénesis de Matrigel descrito por Grant, D.S., Tashiro, K., Segui-Real, B., Yamada, Y., Martin, G.R., Kleinman, H.K., Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro, Cell, 8 de septiembre de 1989, 58(8):933-943), se realizaron ensayos de formación de túbulos de tipo capilar con células endoteliales microvasculares humanas (HMEC) cultivadas en Matrigel que permite a las células endoteliales formar estructuras de tipo tubo, con brotes invasivos extendiéndose desde las células individuales para formar contactos con las células endoteliales cercanas. La figura 1a ilustra los resultados cuando las células HMEC se cultivaron en presencia de dos anticuerpos Cat S (1E11 y 1E4) o un control de isotipo. Unas extensas estructuras de tipo tubo resultan evidentes en los paneles del control sólo con vehículo y del anticuerpo de control de isotipo (200 nM); sin embargo, esta formación de tubos casi desaparece por completo en presencia de los anticuerpos 1E11 o 1E4 (200 nM). Estos resultados después se cuantifican como se muestra en la figura 1b.

Se había demostrado que ambos anticuerpos se unen de modo específico a Cat S sin reactividad cruzada con otras catepsina, en particular con las que tienen la mayor homología con Cat S. Ambos anticuerpos 1E11 y 1E4 se han caracterizado por su capacidad para inhibir la actividad catalítica de Cat S; 1E11 puede inhibir de modo específico la actividad de Cat S, mientras que 1E4 no tiene un efecto discernible. Por tanto, los resultados del ensayo de tubos de tipo capilar sugieren que el secuestro de la Cat S activa segregada de las células endoteliales por un mAb de Cat S inhibidor o no inhibidor es suficiente para evitar la migración y disposición de células endoteliales en estructuras de tipo tubo.

Ejemplo 2: Los anticuerpos Cat S pueden inhibir la formación de estructuras de tipo tubo en un modelo *ex vivo* de arco aórtico de rata

Para evaluar más a fondo el papel de Cat S en la angiogénesis se realizó un ensayo de arco aórtico de rata *ex vivo*. Se cultivaron secciones de la aorta (1 mm) dentro de una capa fina de Matrigel en presencia del anticuerpo inhibidor y de controles apropiados. Se controló y se cuantificó la formación de vasos de tipo tubo desde la aorta después de 7 días mediante la medición de la reducción en el número de vasos, la longitud media de los vasos, y la longitud máxima de los vasos, comparado con los controles.

La figura 2 ilustra la inhibición significativa de la formación de tubos en presencia del anticuerpo 1E11 de Cat S. En la figura 2a se muestran fotografías de los segmentos de anillo y en la figura 2b se resumen los resultados. Una incubación de los segmentos de anillo aórtico de rata con hasta 600 nM de 1E11 produjo una reducción mayor que 80% en el número total de vasos, la longitud media de los vasos, y la longitud máxima de los vasos (figura 2b).

La figura 3 ilustra la inhibición significativa de la formación de tubos en un experimento repetido en presencia del anticuerpo 1E11 de Cat S. En las figuras 3a y 3b se muestran fotografías de los segmentos de anillo y en la figura 3c se resumen los resultados. Una incubación de los segmentos de anillo aórtico de rata con hasta 10 µg/ml de 1E11 produjo una reducción del 70% en el número total de vasos, y una reducción del 60% en la longitud media de los vasos y en la longitud máxima de los vasos.

Ejemplo 3

Para investigar el efecto de los anticuerpos de Cat S sobre la invasión tumoral, se realizó un ensayo de invasión como se describió anteriormente utilizando células HCT116. Los resultados se muestran en la figura 4. Como puede observarse, la invasión tumoral fue atenuada significativamente en las células HCT116 tratadas con el anticuerpo 1E11 de Cat S y en células HCT116 tratadas con el anticuerpo 1E4 de Cat S.

Ejemplo 4: Efecto del tratamiento sobre la vasculatura de tumores HCT116 tratados con anticuerpo de Cat S

Se investigó el efecto del tratamiento sobre la vasculatura de tumores HCT116 tratados con anticuerpo de Cat S tiñendo tumores HCT116 tratados con 1E11 de Cat S utilizando CD34 y se compara con tumores HCT116 tratados con un anticuerpo control. Los resultados se muestran en la figura 5 y en la figura 6. Tal como puede observarse a partir de la figura 5, en los tumores tratados control se advierte evidentemente la vasculatura en la periferia del tumor (A-C (x4)). Está presente un gran número de vasos sanguíneos pequeños, funcionalmente limitados, y también se determinó la presencia de algunos vasos más grandes (D-E (x20)). Sin embargo, tal como aparece en la figura 6, en los tumores HCT116 tratados con 1E11 de Cat S, la vasculatura en la periferia de los tumores se redujo en gran medida (A-C (x4)) y el número de vasos presentados era menor, comparado con los tumores tratados control.

Ejemplo 5: El 1E4 de Cat S se une a Cat S procedente de líneas celulares de leucemia

Se amplificó ARN de Cat S a partir de tres líneas celulares de leucemia diferentes y un control positivo. Se analizaron los niveles de ARN tras 40 ciclos de PCR para determinar la expresión de la diana. Tal como puede observarse en la figura 7, el ARN de Cat S fue expresado por cada una de las tres líneas celulares de leucemia.

Además se realizó un análisis de la transferencia Western sobre lisados de células enteras de las tres líneas celulares de leucemia utilizando el anticuerpo 1E4. Tal como se muestra en la figura 8, el 1E4 de Cat S se une a la proteína Cat S, lo cual demuestra que puede utilizarse para dirigirse a la catepsina S en células de leucemia.

Ejemplo 6: Identificación de la región de unión de la catepsina S a la cual se une de modo específico el anticuerpo 1E4

Se diseñaron cebadores específicos de Cat S para que contuviesen una región promotora de T7 5' y un marcador de hexahistidina 5' o 3'. Utilizando condiciones convencionales, se emplearon estos cebadores para amplificar múltiples regiones diferentes del CDS de Cat S antes de un análisis mediante electroforesis en agarosa. Entonces se añadieron los productos de la PCR ordenados no purificados a partes alícuotas de 50 µl de lisado exento de células de germen de trigo (Rapid Translation System, Roche) y se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Estos lisados de proteínas entonces se sometieron a electroforesis y a un análisis de la transferencia Western utilizando técnicas convencionales.

Después de bloquear en leche en polvo al 3% en PBS, pH 7,4 (en p/v), los anticuerpos de Cat S (dilución de 1 en 200 en PBS) se incubaron durante la noche a 4 °C. Se visualizó la unión específica de los anticuerpos de Cat S a la transferencia mediante un lavado y una detección con un anticuerpo secundario antirratón conjugado con HRP mediante quimioluminiscencia siguiendo protocolos convencionales. La verificación de la proteína expresada fue proporcionada resonando estas transferencias con anticuerpo monoclonal anti-marcador de histidina conjugado con HRP (Sigma-Aldrich).

Determinando a cuál de las múltiples muestras se unen los anticuerpos de Cat S, se identificó que la región de unión tenía la secuencia de aminoácidos que se muestra como Secuencia ID NO:1:

ELPYGREDVLKEAVANKGPVSVGVGDARHP

- 5 A los expertos en la técnica les resultarán evidentes diversas modificaciones y variaciones de las realizaciones descritas de la invención, sin apartarse del alcance de la invención. Aunque la invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas preferidas, debe entenderse que la invención, tal como se reivindica, no debe limitarse de modo indebido a dichas realizaciones específicas. En efecto, se pretende que las diversas modificaciones de los modos de realizar la invención descritos, que son obvias para los expertos en la técnica, estén cubiertas por la presente invención.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un polipéptido aislado, en el que dicho polipéptido consiste en una secuencia de un polipéptido que tiene una homología de al menos 90% con la Secuencia ID NO:1, en el que la Secuencia ID NO:1 es una región de la catepsina S.
- 5 2.- El polipéptido aislado según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido consiste en una secuencia de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como Secuencia ID NO:1.
- 3.- Una molécula de anticuerpo que se une de modo específico a la catepsina S y que inhibe la angiogénesis pero que no inhibe la actividad proteolítica de la catepsina S, en la que dicha molécula de anticuerpo tiene una especificidad de unión por el polipéptido de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2.
- 10 4.- La molécula de anticuerpo según la reivindicación 3, o un ácido nucleico que codifica dicha molécula de anticuerpo, para su uso en terapia.
- 5.- El uso de una molécula de anticuerpo, o de un ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, un trastorno inflamatorio, una enfermedad ocular, la aterosclerosis, un trastorno neurodegenerativo, un trastorno autoinmunitario, el hemangioma, un tumor sólido, la leucemia, la telangiectasia, la psoriasis, la esclerodermia, el granuloma piogénico, la angiogénesis miocárdica, la enfermedad de Crohn, la neovascularización de placas, los colaterales coronarios, los colaterales cerebrales, las malformaciones arteriovenosas, la angiogénesis de extremidades isquémicas, la artritis, la neovascularización diabética, la úlcera péptica, una enfermedad relacionada con *Helicobacter*, una fractura, los queloides, y la vasculogénesis, la colitis ulcerosa o la bartonellosis, en el que dicha molécula de anticuerpo es la molécula de anticuerpo según la reivindicación 3.
- 15 20 6.- El uso según la reivindicación 5, en el que dicho trastorno es el cáncer, un trastorno inflamatorio, una enfermedad ocular, o la aterosclerosis.
- 7.- Una composición farmacéutica que comprende la molécula de anticuerpo según la reivindicación 3, o una molécula de ácido nucleico que codifica dicha molécula de anticuerpo.
- 25 8.- La composición farmacéutica según la reivindicación 7, en la que dicha composición comprende además un inhibidor de VEGF, en el que dicho inhibidor de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF, PTK787, anecortavo, AG-13958, CAND5, o aflibercepto.
- 9.- La composición farmacéutica según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en la que dicha composición comprende además un anticuerpo anti-receptor de EGF.
- 30 10.- Un método para determinar la presencia de la catepsina S en una muestra biológica, comprendiendo dicho método poner en contacto la muestra biológica con una molécula de anticuerpo según la reivindicación 3 y determinar la unión de la molécula de anticuerpo a la muestra biológica, en el que la unión de la molécula de anticuerpo a la muestra biológica, con relación a un control, es indicativa de la presencia de catepsina S.
- 11.- Un método de ensayo para detectar un tumor en un sujeto, que comprende:
- 35 (a) poner en contacto una muestra biológica procedente del sujeto con una molécula de anticuerpo según la reivindicación 3; y
- (b) determinar el nivel de unión de la molécula de anticuerpo a la muestra biológica, en el que un nivel elevado de unión de la molécula de anticuerpo a la muestra biológica, con relación a una muestra control, es indicativa de la presencia de un tumor.

40

Figura 1a: Ensayo de formación de tubos de tipo capilar con células HMEC

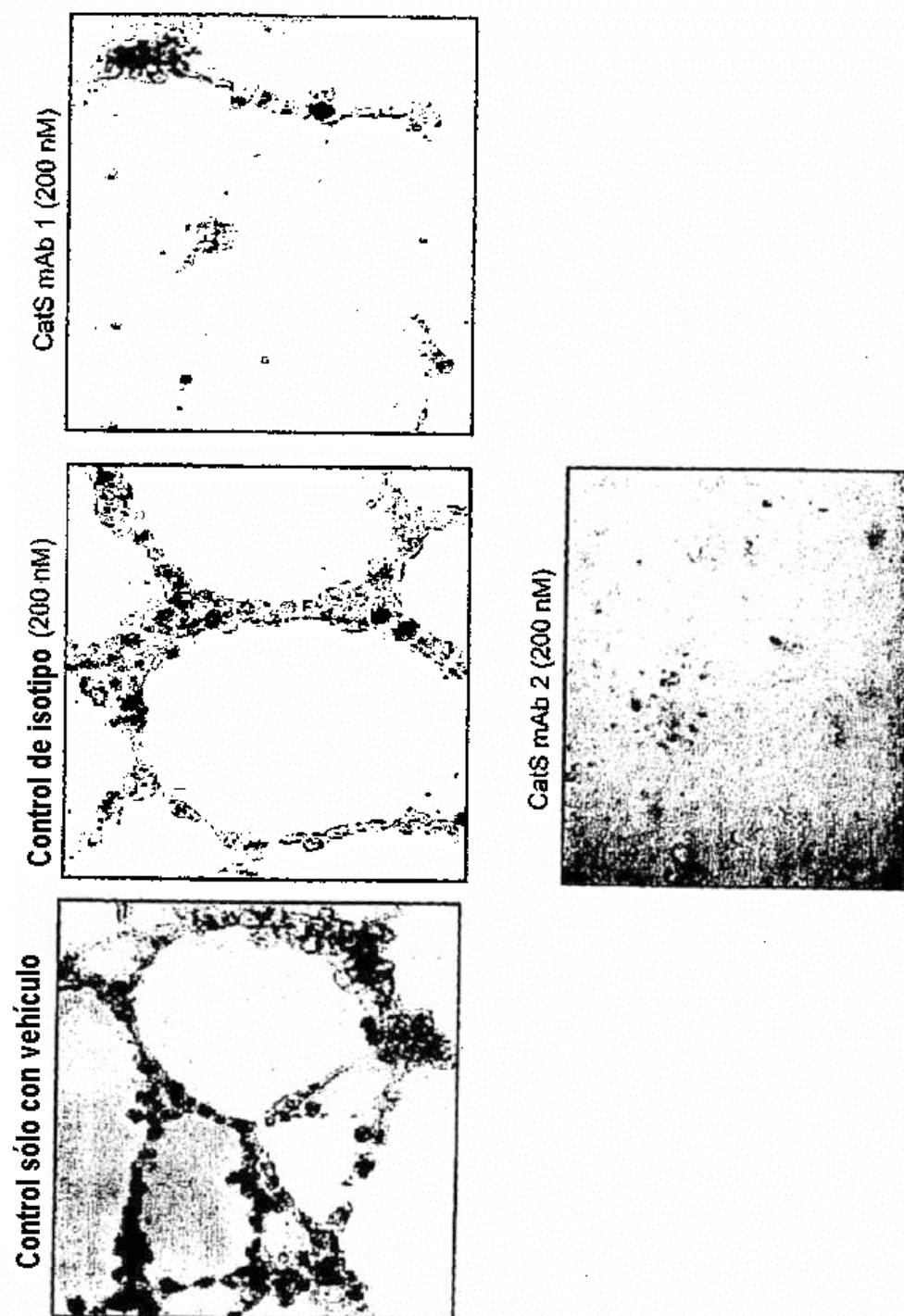


Figura 1b: Ensayo de la formación de tubos de tipo capilar con células HMEC

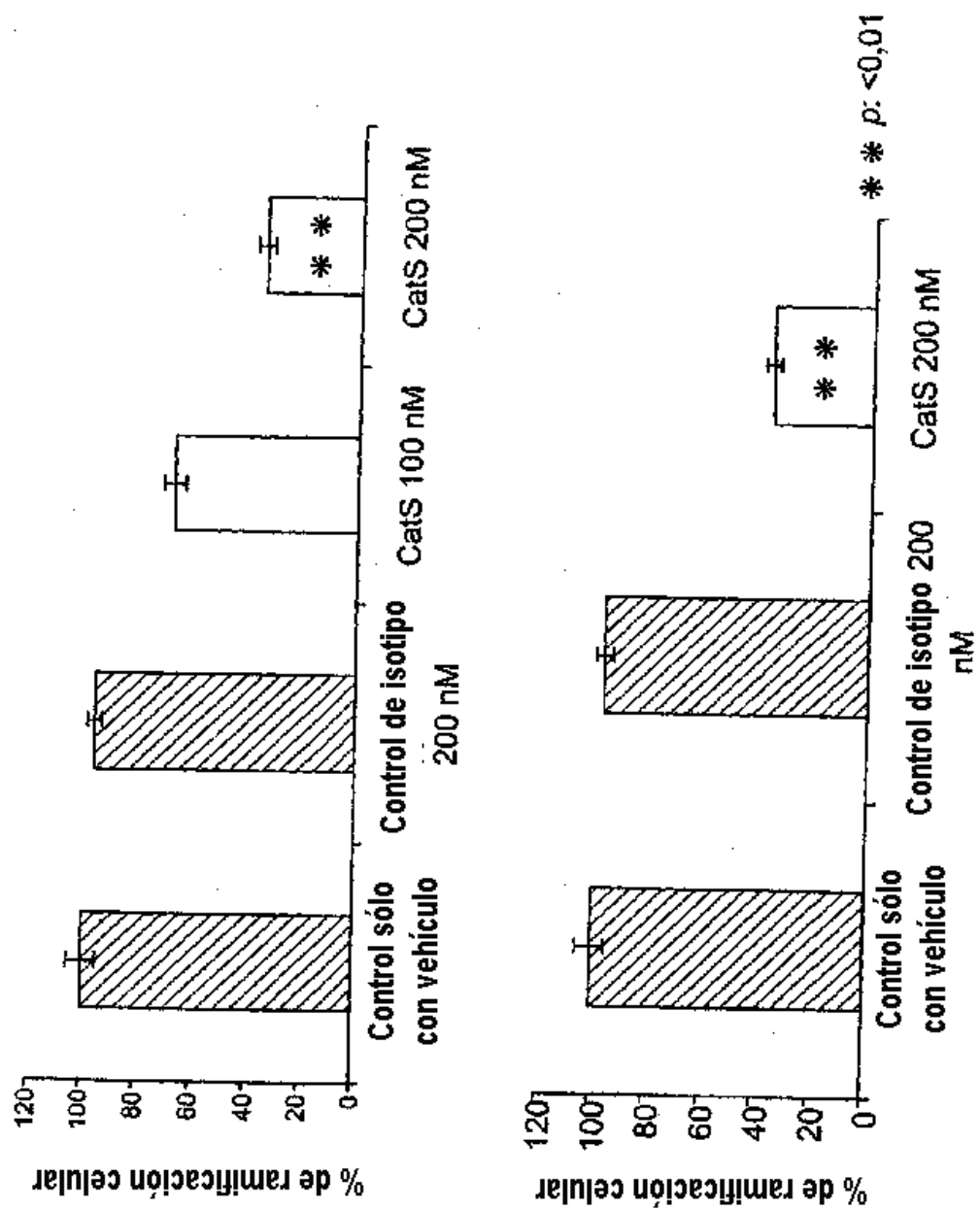


Figura 2a: Modelo de la aorta de rata

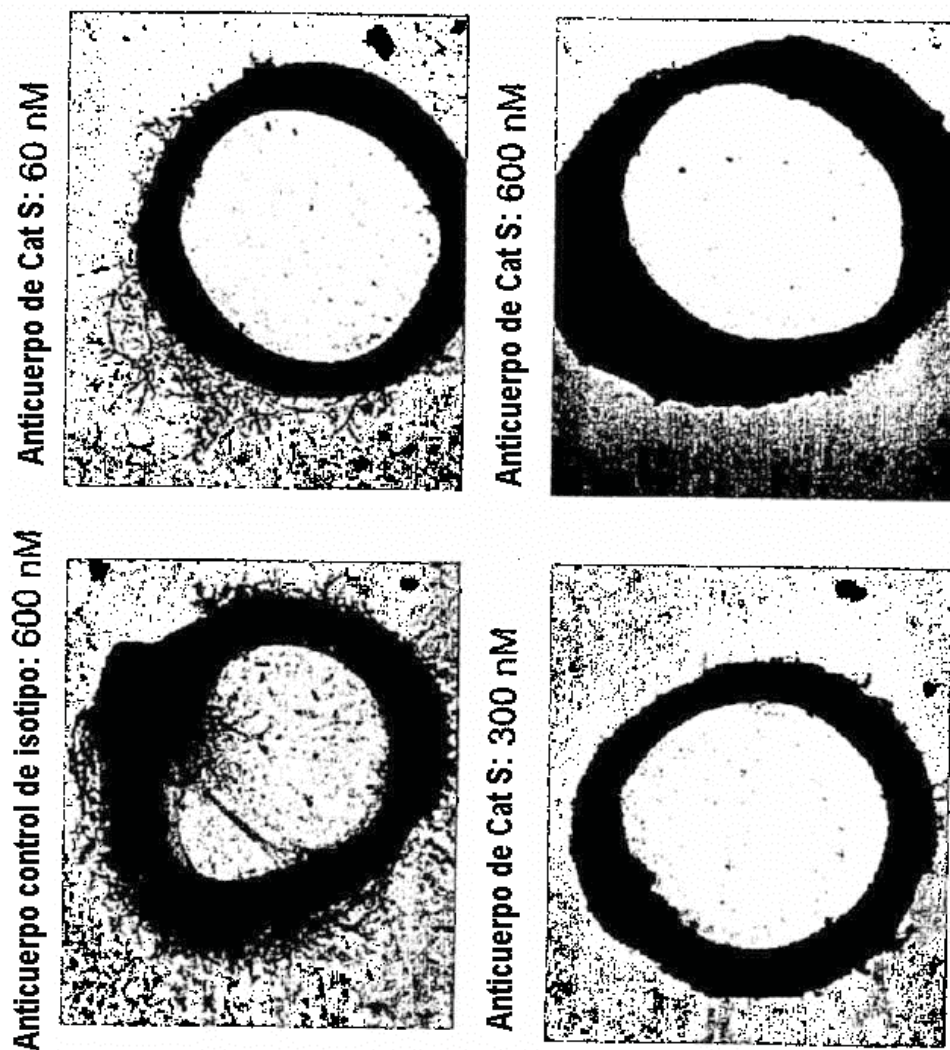


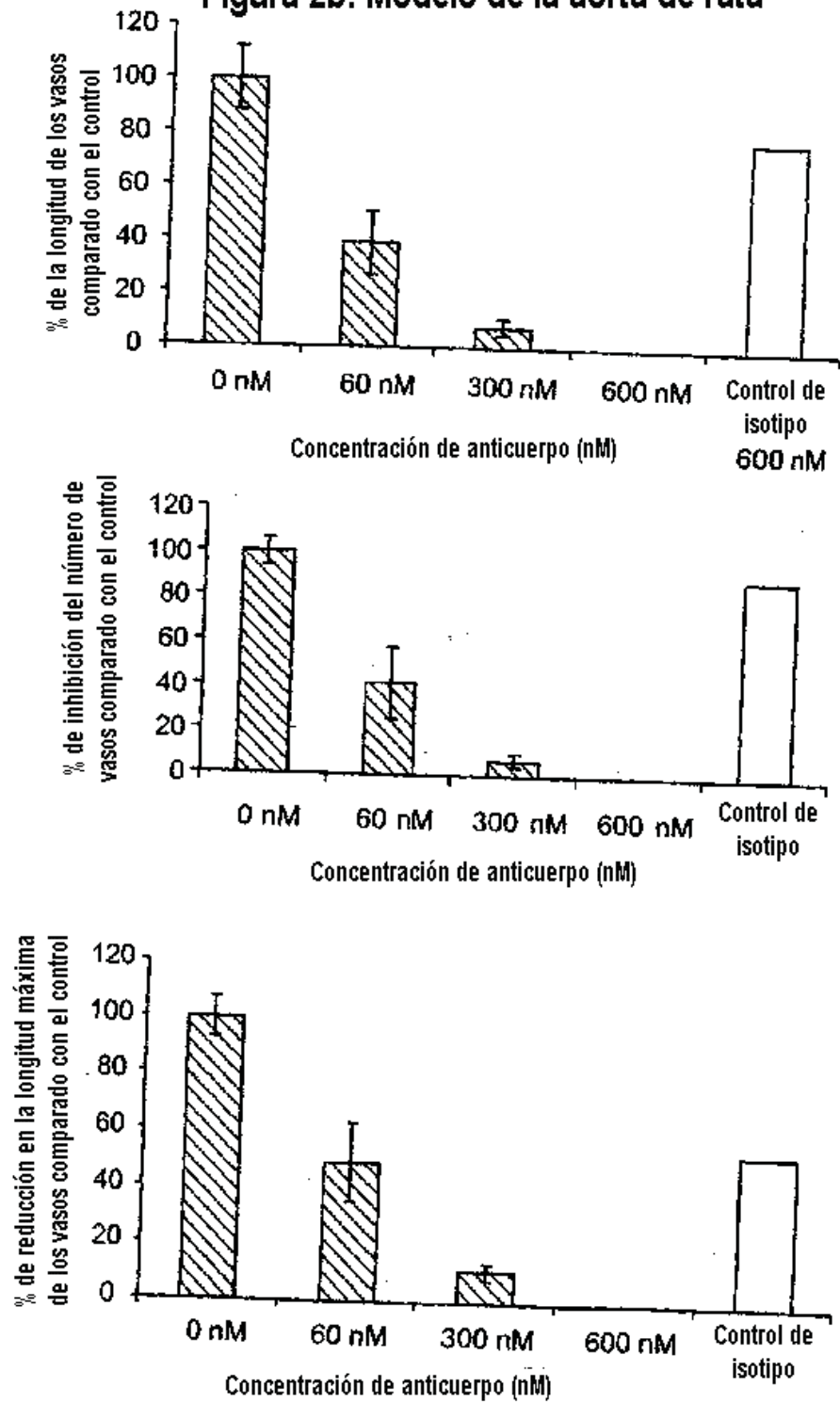
Figura 2b: Modelo de la aorta de rata

Figura 3a(1): Efecto del mAb de Cat S en el modelo de anillo aórtico de rata ex vivo de la angiogénesis (mag x4)

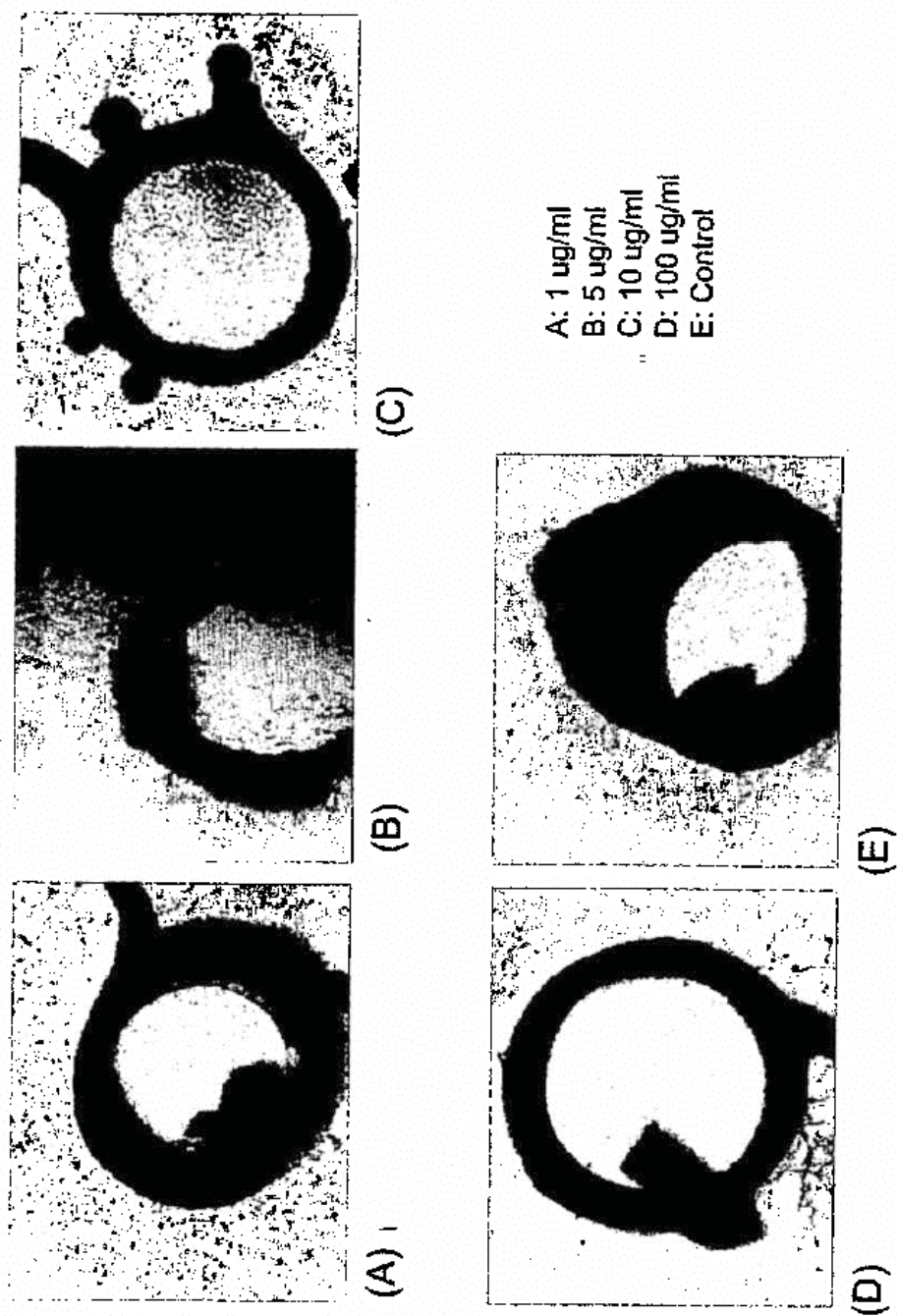


Figura 3a(2): Efecto del mAb de Cat S en el modelo de anillo aórtico de rata de la angiogenesis (mag x20)

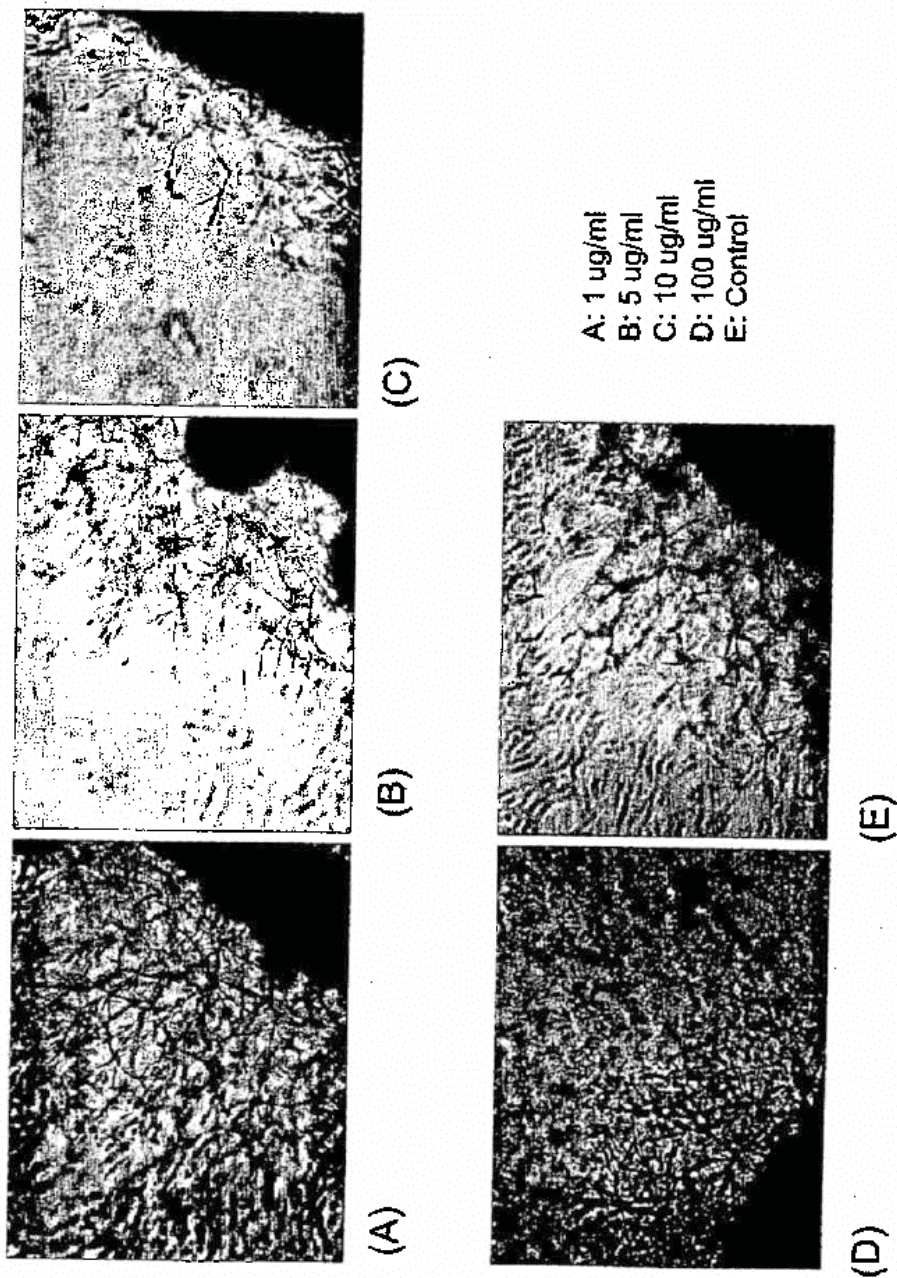
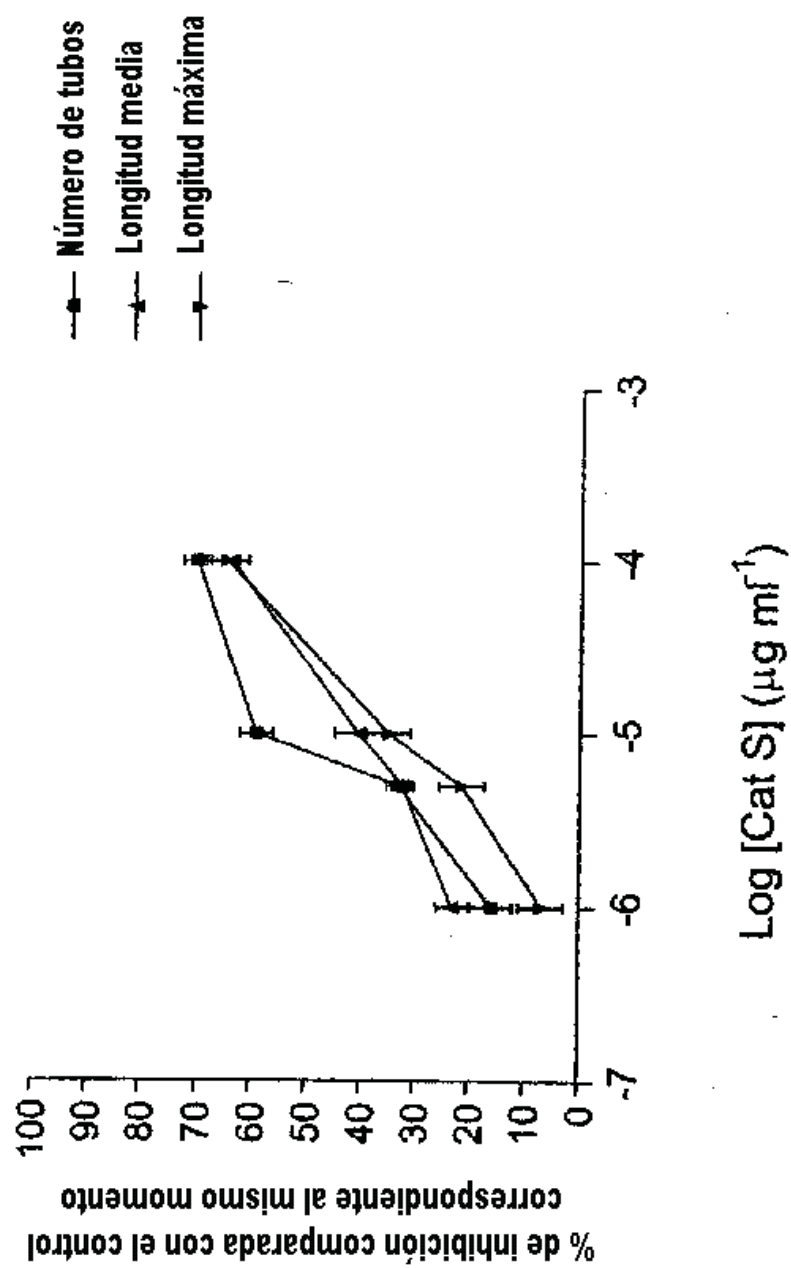
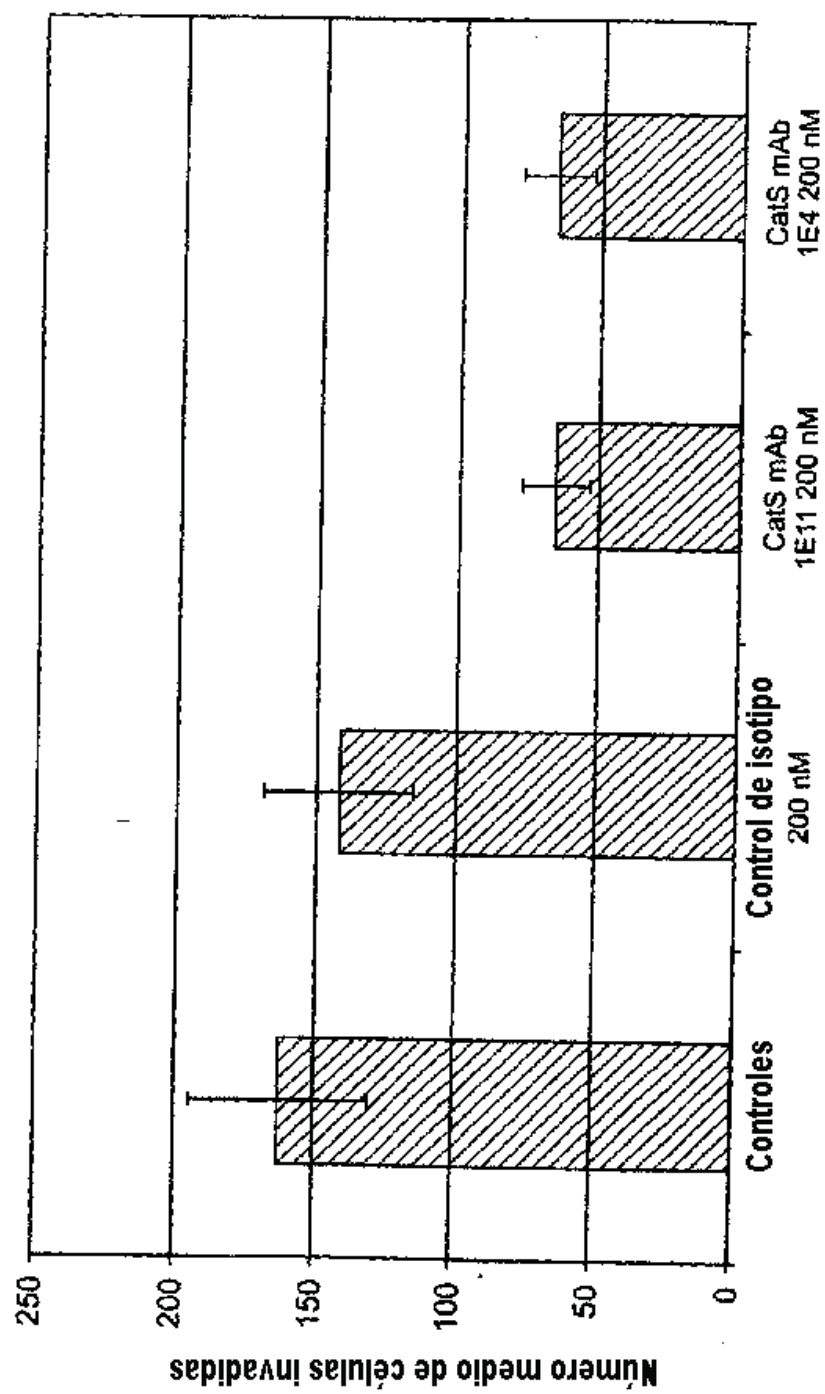
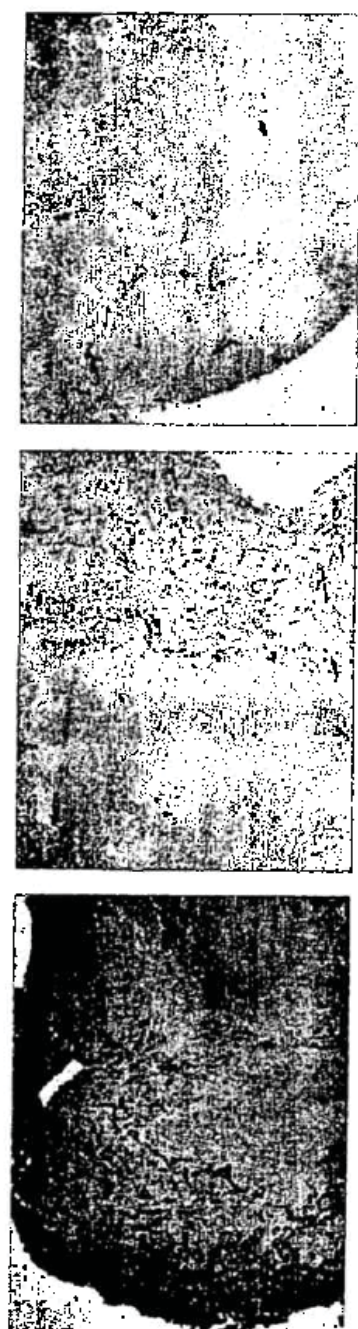


Figura 3b: Efecto del mAb de Cat S en el modelo de anillo aórtico de rata de la angiogenesis



Ensayo de invasión de HCT116**Fig. 4**



(A)



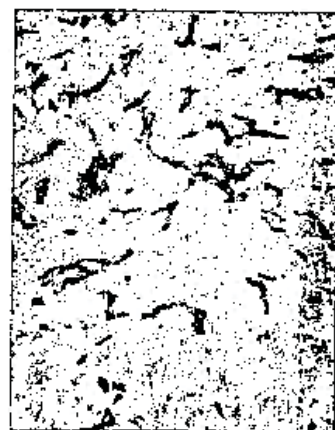
(B)



(C)



(D)



(E)



(F)

Fig. 5

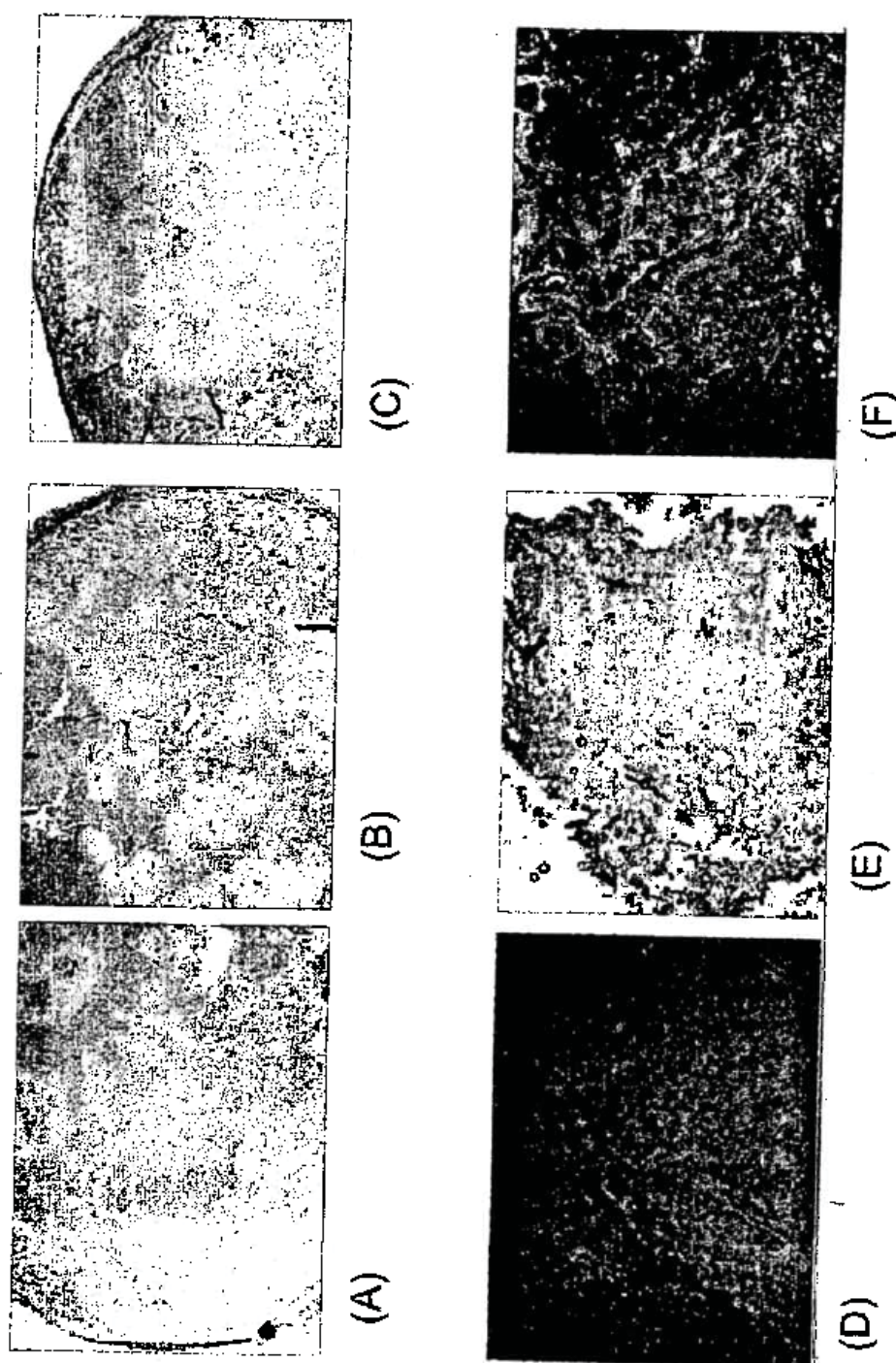


Fig. 6

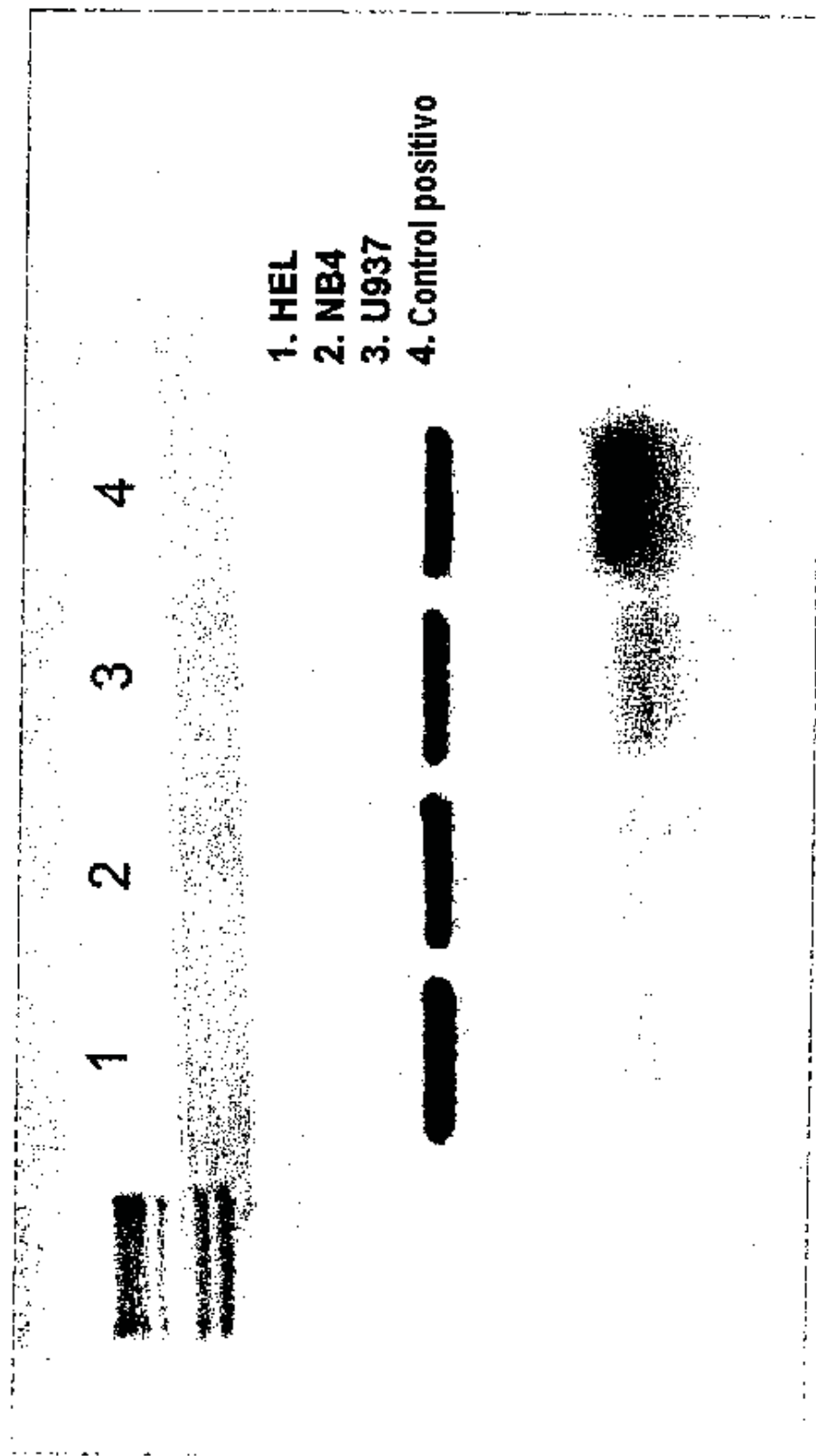


Fig. 7

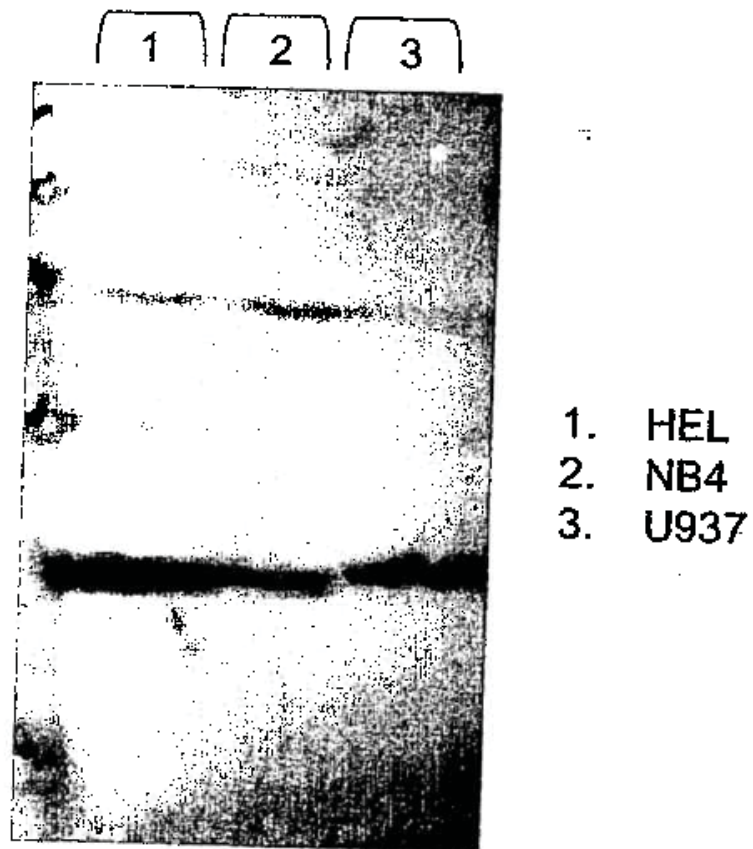


Fig. 8