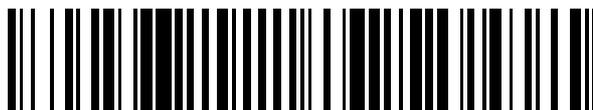


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 334**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2008 E 08795003 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013 EP 2182981**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para el tratamiento y el diagnóstico de la fibrosis**

30 Prioridad:

02.08.2007 US 963214 P

02.08.2007 US 963246 P

02.08.2007 US 963282 P

02.08.2007 US 963249 P

02.08.2007 US 963248 P

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

30.04.2013

73 Titular/es:

GILEAD BIOLOGICS, INC (100.0%)

333 Lakeside Drive

Foster City, CA 94404, US

72 Inventor/es:

SMITH, VICTORIA;

OGG, SCOTT;

VAN VLASSELAER, PETER;

BARRY, VIVIAN E.;

MARSHALL, DEREK;

HOLZER, ALISON KAY;

RODRIGUEZ, HECTOR;

OYASU, MIHO;

MCCAULEY, SCOTT ALAN;

GARCIA, CARLOS AURELIO y

BIERMANN, DONNA HIROKO TOKUOKA

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 402 334 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

Procedimientos y composiciones para el tratamiento y el diagnóstico de la fibrosis

5 **Antecedentes**1. **Cáncer**

[0001] El cáncer es un grave problema de salud pública en los Estados Unidos y otros países desarrollados. Actualmente, una de cada cuatro muertes en los Estados Unidos son debidas al cáncer. El tratamiento contra el cáncer implica tratar pacientes con fármacos quimioterapéuticos para eliminar las células tumorales. Sin embargo, subconjuntos de células tumorales son frecuentemente resistentes al tratamiento con fármacos y sobreviven para repoblar los sitios de origen y sitios metastásicos distantes, conduciendo a una recurrencia y morbilidad detectables de la enfermedad. Se cree que muchas células tumorales de carcinoma que tienen las propiedades de capacidad invasiva y metastásica aumentadas, y una resistencia a los fármacos alterada, han experimentado una transformación morfológica que abarca o es similar a la EMT (transición epitelial-mesenquimal). Las células que experimentan la EMT pierden las propiedades de adherencia normales de las células epiteliales y experimentan un espectro de cambios que incluyen la pérdida de expresión de la caderina-E y la expresión de los marcadores mesenquimales, aumento de la motilidad, aumento de la invasividad y aumento de la resistencia a la muerte celular.

[0002] Las terapias principales para el cáncer son actualmente la cirugía, la radiación y la quimioterapia. Las soluciones quimioterapéuticas tales como los antibióticos antitumorales, los agentes alquilantes, los compuestos de nitrosourea, los alcaloides de la vinca, las hormonas esteroideas, y los antimetabolitos forman el grueso de las terapias de las que disponen los oncólogos. A pesar de los avances en el campo del tratamiento del cáncer, el cáncer sigue siendo un problema de salud principal.

2. **Angiogénesis**

[0003] La angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos además de los capilares preexistentes, es una secuencia de acontecimientos que es de importancia clave en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos. El crecimiento normal del tejido, tal como en el desarrollo embrionario, la cicatrización de las heridas, y el ciclo menstrual, está caracterizado por la dependencia en la formación de nuevos vasos para el suministro de oxígeno y nutrientes, así como la eliminación de productos residuales. Un gran número de enfermedades diferentes y no relacionadas están asociadas también con la formación de nueva vasculatura. En determinadas patologías están las dolencias en las que la angiogénesis es baja, y se debería potenciar para mejorar el estado patológico. Con más frecuencia, sin embargo, la angiogénesis excesiva es una característica importante de diversas patologías, incluyendo las patologías caracterizadas o asociadas con una proliferación anormal o descontrolada de células. Las patologías que implican una angiogénesis excesiva incluyen, por ejemplo, cáncer (tumores sólidos y hematológicos), enfermedades cardiovasculares (tales como aterosclerosis y restenosis), inflamación crónica (artritis reumatoide, enfermedad de Crohn), diabetes (retinopatía diabética), psoriasis, endometriosis, glaucoma neovascular y adiposidad. Estas dolencias pueden beneficiarse de la inhibición quimioterapéutica de la angiogénesis.

[0004] Hablando en general, el proceso angiogénico conlleva la proliferación y la migración de un endotelio normalmente quiescente, la proteólisis controlada de la matriz pericelular, y la síntesis de nuevos componentes de la matriz extracelular mediante el desarrollo de capilares. El establecimiento de nuevos contactos intra e intercelulares y la diferenciación morfológica de células endoteliales en redes tubulares de tipo capilar proporciona el respaldo para su posterior maduración, ramificación, remodelación y regresión selectiva dirigida a formar una red microvascular funcional muy organizada. Las interacciones autocrinas, paracrinas y anficrinas del endotelio vascular con los componentes circundantes de su estroma, así como con las citocinas proangiogénicas y angiostáticas y factores de crecimiento que orquestan la angiogénesis fisiológica, están normalmente estrechamente regulados, tanto espacial como temporalmente.

[0005] La angiogénesis es crucial para el crecimiento de tejidos neoplásicos. Durante más de 100 años, se ha observado que los tumores están más vascularizados que los tejidos normales. Algunos estudios experimentales han sugerido que el crecimiento del tumor primario y la metástasis requieren neovascularización. En contraste a los procesos bien orquestados descritos anteriormente para el crecimiento del tejido normal, la angiogénesis patológica necesaria para el crecimiento del tumor activo es generalmente sostenida y persistente, siendo la adquisición inicial del fenotipo angiogénico un mecanismo común para el desarrollo de una variedad de tipos de tumores sólidos y hematopoyéticos. Los tumores que son incapaces de adquirir y sostener una red vascular permanecen normalmente

inactivos como lesiones asintomáticas in situ. La metástasis es también dependiente de la angiogénesis. Para que una célula tumoral se convierta satisfactoriamente en metastásica, debe generalmente poder acceder a la vasculatura en el tumor primario, sobrevivir en la circulación, captarse en la microvasculatura del órgano diana, salir de esta vasculatura, crecer en el órgano diana, e inducir la angiogénesis en el sitio diana. De esta manera, la angiogénesis parece ser necesaria al comienzo así como en la finalización de la cascada metastásica.

[0006] La criticidad de la angiogénesis para el crecimiento y la metástasis de las neoplasias proporciona de esta manera una óptima diana potencial de los esfuerzos quimioterapéuticos. Los agentes antiangiogénicos adecuados pueden actuar directa o indirectamente para afectar la angiogénesis asociada al tumor tanto retrasando su inicio (es decir, bloqueando un "interruptor angiogénico"), como bloqueando la neovascularización sostenida y focal que es característica de muchos tipos de tumores. Las terapias antiangiogénicas dirigidas contra el endotelio asociado al tumor y los múltiples procesos moleculares y celulares y las dianas implicadas en la angiogénesis patológica sostenida se están evaluando activamente para determinar su seguridad y eficacia en múltiples ensayos clínico. Sin embargo, se ha conseguido hasta la fecha un éxito limitado en el descubrimiento y/o la identificación de agentes antiangiogénicos seguros y/o eficaces.

3. Fibrosis

[0007] La fibrosis es la acumulación anormal de tejido fibroso que se puede producir como parte del proceso de cicatrización de heridas en un tejido dañado. Dicho tejido dañado puede ser el resultado de una lesión física, inflamación, infección, exposición a toxinas, y otras causas. Los ejemplos de fibrosis incluyen formación de la cicatriz cutánea, queloides, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar (por ejemplo, silicosis, asbestosis), fibrosis renal (que incluye nefropatía diabética), escleroderma, y glomerulosclerosis.

[0008] La fibrosis del hígado (hepática), por ejemplo, se produce como parte de la respuesta de cicatrización de la herida a una lesión crónica del hígado: la fibrosis se produce como una complicación de la hemocromatosis, la enfermedad de Wilson, alcoholismo, esquistosomiasis, hepatitis vírica, obstrucción de los conductos biliares, exposición a toxinas, y trastornos metabólicos. Se cree que esta formación del tejido de cicatrización representa un intento del cuerpo para encapsular el tejido lesionado. La fibrosis hepática se caracteriza por la acumulación de una matriz extracelular que se puede distinguir cualitativamente de la del hígado normal. Si no se controla, la fibrosis hepática progresa a cirrosis (definida por la presencia de nódulos encapsulados), insuficiencia hepática, y muerte.

[0009] Tal como han resumido Li y Friedman (Gastroenterol. Hepatol. 14: 618-633, 1999), las estrategias terapéuticas actuales y propuestas para la fibrosis hepática incluyen la eliminación de la causa subyacente (por ejemplo, la toxina o el agente infeccioso), la supresión de la inflamación (utilizando, por ejemplo, corticoesteroides, antagonistas del receptor de la IL-1, u otros agentes), la regulación de la activación por defecto de los astrocitos (por ejemplo, interferón gamma o antioxidantes), la promoción de la degradación de la matriz, o la promoción de la apoptosis de los astrocitos. A pesar de los progresos recientes, muchas de estas estrategias siguen todavía en la etapa experimental, y los tratamientos existentes están dirigidos a suprimir la inflamación en lugar de abordar los procesos bioquímicos subyacentes. De esta manera, sigue existiendo una necesidad en la técnica de materiales y procedimientos para tratar la fibrosis, incluyendo la fibrosis hepática y pulmonar.

[0010] WANG y col, Gastroenterology, vol. 132, nº 4, Supl. 2, abril de 2007 página A827 han notificado la inhibición de la lisil oxidasa después de la ligadura del conducto biliar en ratas y el efecto de la misma sobre la fibrosis.

[0011] Kenyon y col, THORAX vol. 58, nº. 9, páginas 772-777, ilustran un modelo de fibrosis de las vías aéreas en ratón y el efecto de β APN en el modelo.

[0012] Existe una necesidad en la técnica de mejorar los procedimientos para tratar el cáncer, las enfermedades asociadas con la angiogénesis anormal o indeseable, y la fibrosis. La presente divulgación aborda esta necesidad y proporciona ventajas relacionadas.

Resumen

55 I. Inhibición de la LOX o LOXL procesadas

[0013] La presente invención proporciona el inhibidor de la proteína 2 de tipo lisil oxidasa (LOXL2) para uso en un procedimiento para tratar la fibrosis, en el que el inhibidor de la LOXL2 es un anticuerpo dirigido contra LOXL2 o uno de sus fragmentos de unión a antígeno, un ARNip, un shARN o un polinucleótido de sentido contrario. El inhibidor

puede ser un inhibidor no competitivo. La referencia que se realiza a continuación en el presente documento al inhibidor de LOXL2 es un inhibidor tal como se ha definido en este párrafo.

[0014] Las realizaciones adicionales de la invención son como se muestran en los dibujos adjuntos, y se describen a continuación en el presente documento.

[0015] La presente divulgación se refiere a una metodología innovadora y a las composiciones y kits relacionados para evitar y tratar diversas enfermedades asociadas con la fibrosis, utilizando un inhibidor de la proteína de tipo lisil oxidasa (LOXL2): La LOXL2 puede ser una forma de longitud completa o procesada. La LOXL2 de longitud completa es una forma de proenzima o propéptido (es decir, sin la secuencia señal), mientras que la forma procesada, o la forma de escisión es una forma madura. Tanto la forma de longitud completa y como la forma procesada de LOXL2 pueden ser activas. La LOXL2 puede ser una forma secretada, que puede ser también activa. La inhibición de LOXL2 es eficaz en la prevención y el tratamiento de las enfermedades fibróticas.

15 II. Tratamiento por inhibición de LOX y LOXL

[0016] Se describen en el presente documento una metodología innovadora y las composiciones y kits relacionados para evitar y tratar diversas enfermedades asociadas con la proliferación anormal de células, angiogénesis y fibrosis, mediante la inhibición de la lisil oxidasa (LOX) y una o más proteínas del tipo lisil oxidasa (LOXL). La inhibición simultánea de LOX y LOXL es eficaz en la prevención o el tratamiento de la invasión y la metástasis de una amplia variedad de tumores, y para el tratamiento de las enfermedades asociadas con la angiogénesis anormal y las enfermedades fibróticas.

[0017] Se describen en el presente documento procedimientos para tratar o evitar la invasión o la metástasis tumoral en un sujeto *in vivo*, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de LOX y un inhibidor de LOXL.

[0018] Se describen en el presente documento procedimientos para reducir el crecimiento tumoral en un sujeto *in vivo*, que comprenden: administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de LOX y un inhibidor de una LOXL de tal manera que se reduzca el crecimiento tumoral en al menos un 25%, 50%, 75%, 90%, o incluso 95%. De acuerdo con algunas realizaciones, el tumor es un tumor metastásico.

[0019] Se describen en el presente documento procedimientos para aumentar o potenciar las posibilidades de supervivencia de un sujeto con un tumor metastásico, que comprenden: administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un inhibidor de LOX y un inhibidor de una LOXL, aumentando o potenciando por tanto las posibilidades de supervivencia del sujeto tratado en un determinado periodo de tiempo. Por ejemplo, se aumentó la supervivencia del sujeto en al menos 10 días, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 8 años, o incluso 10 años.

[0020] La LOXL2 puede ser una forma de longitud completa o procesada. La LOXL2 puede ser una forma de proenzima o una forma madura, y ambas formas pueden ser activas. La LOXL2 puede ser una forma secretada, que puede ser también activa. La forma procesada de la LOXL2 es una forma posterior al procesamiento o la escisión proteolíticas.

45 III. Terapia de combinación

[0021] La presente divulgación se refiere a las composiciones, kits, procedimientos para evitar y tratar las enfermedades asociadas con la fibrosis, tales como cáncer, tumores, retinopatía diabética, degeneración macular, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, escleroderma, aterosclerosis, y enfermedad de Alzheimer utilizando inhibidores de la LOXL2.

[0022] Se pueden combinar los inhibidores con otros agentes terapéuticos, tales como agentes quimioterapéuticos, agentes biológicos antineoplásicos, agentes antiangiogénicos, y agentes antifibróticos, para evitar o tratar estas enfermedades o dolencias. Se cree que la inhibición de la LOXL2 podría ralentizar o detener la progresión de la transición epitelial-mesenquimal (EMT) en células tumorales, o inducir una transición mesenquimal-epitelial (MET) hacia un estado menos tumorigénico, volviendo por tanto las células tumorales o enfermas más susceptibles a los fármacos quimioterapéuticos, agentes biológicos antineoplásicos, agentes antiangiogénicos, y agentes antifibróticos. Una combinación sinérgica de un inhibidor de la LOXL2 con otro agente terapéutico es útil para evitar o inhibir la invasión y la metástasis tumorales, inhibiendo el crecimiento de los tumores primarios

sensibilizando las células tumorales para los efectos citotóxicos del agente terapéutico, y también para la prevención o el tratamiento eficaces del cáncer.

IV. Selección de agentes

5

[0023] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos innovadores para seleccionar agentes que eviten o inhiban la invasión tumoral, la angiogénesis y la metástasis. De acuerdo con la presente divulgación, LOXL2 puede ralentizar o detener la progresión de la transición epitelial-mesenquimal (EMT) en células tumorales, o inducir una transición mesenquimal-epitelial (MET) hacia un estado menos tumorigénico, evitando o inhibiendo por tanto la invasión, la angiogénesis y la metástasis del tumor, y volviendo las células tumorales primarias más susceptibles a otra intervención terapéutica, tal como irradiación, fármacos quimioterapéuticos, agentes biológicos antineoplásicos, agentes antiangiogénicos, y agentes antifibróticos.

V. Diagnóstico

15

[0024] En otro aspecto más, la presente divulgación se refiere a una metodología innovadora y a las composiciones y kits relacionados para diagnosticar o controlar diversas enfermedades asociadas con la fibrosis, utilizando moléculas o agentes que reconocen específicamente formas activas o maduras de las proteínas lisil oxidasa o de tipo lisil oxidasa. Los inventores creen que la LOXL2 procesada es un importante biomarcador de las enfermedades asociadas con las enfermedades fibróticas. Las formas procesadas de LOXL2 puede ser activas. La LOXL2 puede ser una forma de proenzima o una forma madura. La LOXL2 puede ser también una forma secretada, que puede ser también activa.

[0025] En otra realización, se describen procedimientos para vigilar la respuesta de un sujeto a un tratamiento que incluyen un modulador de la LOXL2 tal como en el tratamiento de enfermedades fibróticas. En otra realización, el procedimiento comprende: detectar un cambio en el nivel de los telopéptidos de colágeno o en el contenido de hidroxiprolina en el sujeto tras la administración de un modulador de la LOXL2 al sujeto, en el que el cambio indica que el modulador de LOX o LOXL tiene un efecto terapéutico sobre el sujeto. El cambio puede ser un aumento o una disminución. Por ejemplo, una disminución en los telopéptidos de colágeno o en el contenido de hidroxiprolina puede ser indicadora de un efecto terapéutico.

[0026] El procedimiento comprende detectar un cambio en el nivel de la proteína C reactiva, u otros reactivos en la fase aguda, en el sujeto tras la administración de un modulador de la LOXL2 al sujeto, en el que el cambio indica que el modulador de la LOXL2 tiene un efecto terapéutico sobre el sujeto. El cambio puede ser un aumento o una disminución en los niveles de la proteína C reactiva. Generalmente, una disminución en los niveles de la proteína C reactiva indica una disminución en la actividad de la LOX.

VI. Tratamiento de la fibrosis

[0027] En otro aspecto, la invención se refiere a procedimientos para evitar, tratar, o mejorar la fibrosis en un sujeto *in vivo*, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de la proteína 2 de tipo lisil oxidasa (LOXL2). El inhibidor de la LOXL2 puede ser un inhibidor de una forma activa de LOXL2.

[0028] Las formas a modo de ejemplo de la fibrosis incluyen, pero no se limitan a, fibrosis cardiaca, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, cicatriz cutánea y queloides, y enfermedad de Alzheimer. En otras realizaciones adicionales, la fibrosis cardiaca está asociada con hipertensión, enfermedad cardiaca hipertensiva (HHD), infarto de miocardio (IM), aterosclerosis, y restenosis.

[0029] La fibrosis renal puede incluir, pero no limitarse a, nefropatía diabética, reflujo vesiculoureteral, fibrosis renal tubulointerstitial, glomerulonefritis o nefritis glomerular (NG), glomeruloesclerosis segmental focal, glomerulonefritis membranosa o GN mesangiocapilar. La fibrosis hepática puede incluir, pero no limitarse a, cirrosis, y dolencias asociadas tales como hepatitis vírica crónica, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis alcohólica (ASH), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis biliar primaria (PBC), cirrosis biliar, hepatitis autoinmune. La fibrosis pulmonar puede incluir fibrosis pulmonar idiopática (FPI) o alveolitis fibrosante criptogénica, neumonía intersticial fibrosante crónica, enfermedad pulmonar intersticial (EPI), y enfermedad difusa del parénquima pulmonar (EDPP). La fibrosis cardiaca, insuficiencia cardiaca congestiva, cardiomiopatía, periodo posterior al infarto de miocardio, son anomalías en la función cardiaca; la aterosclerosis; artritis reumatoide; glaucoma; degeneración macular relacionada con la edad (DMA húmeda y DMA seca); el enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); la esclerosis múltiple; y el asma crónico se pueden también evitar, tratar, o mejorar con las composiciones

descritas en el presente documento.

[0030] Se proporcionan también en el presente documento composiciones, dispositivos, sistemas, y kits para administrar inhibidores de la LOXL2 localmente en el sitio de la fibrosis. Se pueden utilizar dispositivos médicos tales como catéteres y prótesis endovasculares para administrar localmente, reduciendo de esta manera sustancialmente el riesgo de toxicidad u otros efectos secundarios asociados con la administración sistémica de dichos inhibidores de la LOXL2.

[0031] Los inhibidores de LOXL2 se pueden administrar a un sujeto antes de, de forma simultánea, o con posterioridad a dolencia o patología cardíaca, tal como hipertensión, enfermedad cardíaca hipertensiva (HHD), infarto de miocardio (IM), aterosclerosis y restenosis, para evitar el inicio de, para reducir el riesgo de, o para volver a tratar la fibrosis patológica asociada con dicha dolencia o patología cardíaca. Por ejemplo, se puede administrar un inhibidor de la LOXL2 al menos 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, o 10 h, o, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días después del inicio de dicha dolencia o patología cardíaca.

[0032] La LOXL2 puede ser una forma de longitud completa o procesada. La LOXL2 puede ser una forma de proenzima o una forma madura, y ambas formas pueden ser activas. La LOXL2 puede ser una forma secretada, que puede ser también activa. La forma procesada de la LOXL2 es una forma posterior al procesamiento o la escisión proteolítica.

Breve descripción de los dibujos

[0033]

La **FIGURA 1** es un esquema de la genómica de LOX/LOXL y de la organización de la proteína.

La **FIGURA 2** es una alineación de la secuencia de LOX/LOXL con los sitios de N y O glicosilación previstos y determinados, señales de dos componentes de localización nuclear, y sitios de la C proteinasa de procolágeno.

La **FIGURA 3** ilustra la transición epitelial-mesenquimal y su papel en la invasión y la metástasis.

La **FIGURA 4** es un esquema de la EMT y la MET y de los marcadores para evaluar los fenotipos de la EMT o la MET de las células.

La **FIGURA 5** es un esquema de LOX/LOXL en la promoción o la reducción de EMT-MET, y la resistencia o la sensibilidad al fármaco de las células EMT-MET.

La **FIGURA 6** muestra la inducción de la EMT mediante la transfección de células MCF-7 (LOXL2 baja). **(A)** Células MCF-7 naturales (WT) y **(B)** MCF-7-Lox12.clon 1 se tiñeron para la caderina E. Anticuerpo primario: IgG dirigida contra caderina E (10 µg/ml); Anticuerpo secundario: IgG dirigida contra cy3 de ratón (rojo); DAPI. núcleos (azul). **(C)** Células MCF-7 naturales y **(D)** MCF-7-Lox12.clon 1 se tiñeron con rodamina faloidina; citoesqueleto de actina (rojo) y DAPI: núcleos (azul). MCF7 natural muestra fenotipo epitelial, caderina E fuertemente positiva (tinción membranosa) **(A)** y la tinción de rodamina faloidina del citoesqueleto de actina desvela un modelo circular **(C)**. MCF7 transfectado con LOXL2 cambia a un fenotipo mesenquimal, perdiendo la expresión de la caderina E **(B)**, con remodelación del citoesqueleto de la actina (alargamiento, conformado en forma de husillo, fibras de actina largas) **(D)**.

La **FIGURA 7** muestra la inducción de un cambio de tipo MET por agotamiento de LOXL2 en MDA-MB-231. **(A-B)** células MDA-MB-231 WT y **(C-F)** MDA-MB-231 shLoxl2 **(C, D)**: combinado 1; **(E, F)**: combinado 2) células silenciadas estables se tiñeron con rodamina faloidina (tinción del citoesqueleto de actina). Las células se alargaron y se conformaron en forma de husillo en células WT **(A-B)** a la vez que las células silenciadas estables MDA-MB-231 shLoxl2 se redondearon hasta una forma más pequeña **(C-F)**. La tinción de la actina-F (rodamina faloidina) se mueve de fibrilar a circular / células de tipo anillo tras el agotamiento de la LOXL2 por el silenciamiento del shARN.

La **FIGURA 8** muestra los efectos del Medio Acondicionado (CM) derivado de las células CHO-Loxl2 en células MCF-7 WT. **(A-B)** Se hicieron crecer células MCF-7 en medio SFII al 30%: 150 µl de medio SFII (medio utilizado para células CHO-Loxl2) en 350 µl de medio completo MCF-7 regular. **(C-D)** Se hicieron crecer células MCF-7 en medio acondicionado al 30% (CM): 150 µl de CM procedente de células CHO-Loxl2 (concentrado 22X a partir de CM exento de suero de 3 días) en 350 µl de medio completo MCF-7 regular. Las células MCF-7 se trataron con CM

exento de suero concentrado procedente de células CHO-Loxl2 durante 4 días. Las células MCF-7 tratadas con medio acondicionado procedente de células que expresan LOXL2 (**C-D**) experimentan un cambio de fenotipo en comparación con las células tratadas con medio acondicionado control (células CHO que no expresan LOXL2) (**A-B**), tal como se desveló mediante la tinción con rodamina-faloidina del citoesqueleto de actina. Las células se alargaron con fibras de actina F largas, similares a las células que experimentan la EMT, a diferencia de las células tratadas con el control que muestran una tinción del “anillo de actina” más circular. Estos datos apoyan que el cambio de tipo EMT inducido por LOXL2 está inducido por la LOXL2 secretada (extracelular). (**E**) ilustra los efectos de diferentes concentraciones de CM derivadas de células CHO-Loxl2 estables en células MCF-7 WT y sus cambios morfológicos. Las células de tratamiento con concentraciones crecientes de CM que contiene LOXL2 dan como resultado un incremento concordante en el cambio de fenotipo de tipo EMT.

La **FIGURA 9** muestra que los mAb dirigidos contra Loxl2 pueden bloquear el fenotipo EMT observado a partir de la incubación de MBA-MD-MB-231 (que expresan elevados niveles de LOXL2) en CM con células MCF-7. (**A, C, E**) células MCF-7 WT con CM procedentes de células MCF-7 y (**B, D, F**) células MCF-7 con CM procedentes de células MBA-MD-231, con (**C-F**) células que se muestran con CM que se ha preincubado con mAb dirigidos contra Loxl2 antes de la adición de células MCF-7 (**C, D**): mAb nº 418 (**E, F**): mAb nº 423, respectivamente), con concentración variable del anticuerpo (**C, E**). 2 µg, (**D, F**): 4 µg).

La **FIGURA 10** demuestra el efecto de bloqueo específico del cambio de tipo EMT a partir de la incubación de MDA-MB-231 en CM con células MCF-7. (**A**) “Preincubación”: CM, recogido y clarificado, se preincubó con mAb nº 418 o nº 422 dirigidos contra Loxl2 (1,5 h a temperatura ambiente (RT)), a continuación se aplicó a células MCF-7 durante 4 días. (**B**) “Sin preincubación”: CM con células MDA-MB-231 se puso en presencia de mAb nº 418 o mAb nº 422 dirigidos contra Loxl2 (3 días) y se recogió y clasificó antes, a continuación se aplicó a células MCF-7 durante 4 días. La morfología de tipo EMT se bloqueó en (**A**) y (**B**). Como control no de tipo EMT, (**C**) células MCF-7 tratadas con Medio Acondicionado durante 3 días (CM) a partir de células MCF-7 durante 4 días y tuvieron una morfología redondeada y aplanada que es normal de células MCF-7 WT. Como controles de tipo EMT, (**D**) células MCF-7 tratadas con CM durante 3 días procedentes de células MDA231 que no se habían incubado con ningún mAb dirigido contra loxl2 (4 días de incubación) y (**E**) células MCF-7 tratadas con CM durante 3 días procedentes de células MDA231 que se habían preincubado con un anticuerpo dirigido contra actina (4 días de incubación). En (**D**) y (**E**) se observa una morfología de tipo EMT en células conformadas en forma de husillo.

La **FIGURA 11** muestra la inducción de un cambio de fenotipo de tipo EMT tratando células MCF-7 (LOXL2 baja) con medio acondicionado procedente de células tumorales Hs578t (que expresan elevados niveles de LOXL2) y los mAb dirigidos contra Loxl2 pueden bloquear el fenotipo de la EMT observado. (**A**) Se aplicó medio acondicionado procedente de Medio Acondicionado (CM) de 3 días derivado de células MCF-7 a células MCF-7 durante 4 días y que tenían morfología redondeada y aplanada que es típica de las células MCF-7 WT. (**B, C, D**). Se aplicó medio acondicionado procedente de células Hs-578t (LOXL2 alta) a células MCF-7 (LOXL2 baja/negativa). (**A-D**) Células teñidas con rodamina-faloidina (actina F, rojo) y DAPI (núcleos, azul). Confirmando que estos efectos son específicos de LOXL2 y no de otras proteínas, se mezcló medio acondicionado con 4 µg tanto de (**C**) anticuerpo dirigido contra actina β como un control negativo o (**D**) anticuerpo dirigido contra LOXL2. Se bloqueó el fenotipo de tipo EMT cuando el medio acondicionado procedente de células Hs578 se preincubó con un anticuerpo dirigido contra LOXL2 antes de la adición a células MCF7 (**D**). Tratando el CM de la misma manera con un anticuerpo dirigido contra la actina β no se consiguió bloquear el cambio de fenotipo en las células MCF-7 (**C**), respaldando que el bloqueo por el anticuerpo dirigido contra LOXL2 fue específico y no un efecto no específico debido a la adición de anticuerpo a CM.

La **FIGURA 12** muestra células SW620 incubadas con medio acondicionado (CM) procedente de células MDA MB 231 que experimentan cambios del fenotipo de EMT. (**A-B**) Se incubaron células SW620 con Medio Acondicionado (CM) procedente de células MDA MB 231, a 20X y 40X. Las flechas indican la morfología de células SW620 que experimentan fenotipo de tipo EMT. Las células experimentan cambios del fenotipo de EMT (tal como se indica mediante la tinción con rodamina faloidina) 72 horas después. (**C-D**) Se incubaron células SW620 con medio acondicionado (CM) procedente de células 293 naturales que mantienen una forma redondeada “normal típica” –72 horas después, a 20X y 40X. El medio acondicionado (CM) procedente de células MDA MB 231 o 293 es CM de 3 días.

La **FIGURA 13** muestra células SW620 incubadas con CM procedente de transfectantes 293:Loxl2.MCD. (**A, C, E**) muestran células que experimentan cambios en el fenotipo de EMT (tal como se indica mediante la tinción con rodamina faloidina) – 72 horas después (CM al 50%: medio competente al 50%). (**B, C, E**) son aumentos de (**A, C, E**), respectivamente, con flechas que indican la morfología de células SW620 que experimentan el fenotipo de EMT.

Las 293:Loxl2.MCD fueron células 293 transfectadas con y que expresaban un fragmento de LOXL2, denominadas LOXL2-MCD, que incluye el dominio enzimático de la lisil oxidasa. Parece que esta porción de LOXL2 es suficiente por sí misma para inducir al menos un cambio de fenotipo de tipo EMT. No todas las células están experimentando el cambio de fenotipo, pero los grupos de células que lo están, son claramente distinguibles.

5

La **FIGURA 14** es un esquema **(A)** de LOX/LOXL sin escisión e intracelular y LOX/LOXL con escisión y activa y **(B)** la captación y la actividad celular de la LOX/LOXL activa promueve la EMT, mientras que la captación de la LOX/LOXL activa está bloqueada cuando se une a un inhibidor tal como un anticuerpo, reduciendo la EMT y/o aumentando la EMT.

10

La **FIGURA 15** es una gráfica que muestra que la actividad de LOX asociada a superficie en células 3T3 está inhibida por BAPN, mAb dirigido contra LOX, y ARNip de LOX. La actividad específica de LOX es evidente sobre la superficie celular de células 3T3 cuantificada con un procedimiento de ensayo fluorescente acoplado a peroxidasa de rábano picante basado en la oxidación de Amplex Ultra Red con un sustrato de 1,5-diaminopentano. La actividad de LOX fue inhibida con el inhibidor de molécula pequeña BAPN irreversible, con un anticuerpo monoclonal sensibilizado contra un péptido LOX, y con un oligonucleótido de ARNip dirigido específicamente al ARNm de LOX.

15

La **FIGURA 16** muestra 2 formas de LOXL2 predominantes en líneas celulares. **(A)** Expresión y secreción de la proteína LOXL2 en líneas celulares. Líneas celulares de tumores de mama: Hs578t, MDA-MB-231, MCF7; Línea celular de tumor de pulmón: A549. **(B)** Esquema de formas de LOXL2 comúnmente detectadas.

20

La **FIGURA 17** muestra la expresión de la proteína LOXL2 purificada a partir de células CHO. LOXL2 etiquetada con Myc-His (extremo C) se expresó en células CHO. 2 formas predominantes (tal como en la **FIGURA 16**): el propéptido de LOXL2 y LOXL2 se escindieron entre SRCR2 y SRCR3. LOXL2 se secreta también en células CHO.

25

La **FIGURA 18** muestra la separación de la especie de LOXL2 mediante cromatografía. **(A)** Un cromatograma de la especie de LOXL2 separada. **(B)** Un análisis de transferencia Western que confirma la separación de la especie de LOXL2.

30

La **FIGURA 19** muestra un ensayo enzimático *in vitro* que indica que ambas formas de LOXL2 están activas.

La **FIGURA 20** es una gráfica de la CI50 de LOXL2. La inhibición de LOXL2 se llevó a cabo en un ensayo enzimático *in vitro* utilizando LOXL2 activa y un anticuerpo dirigido contra LOXL2. AB0023. M1 y M20 son ambos AB0023. Asc = ascites generado, no marcado = biorreactor generado, idénticos resultados. Dosis respuesta que muestra una disminución de actividad con una creciente concentración de anticuerpo. La preparación de LOXL2 incluye ambas formas procesadas (propéptido y madura).

35

La **FIGURA 21** es una gráfica que demuestra un modo de inhibición de LOXL2. **(A)** AB0023 es un inhibidor no competitivo de LOXL2, mientras que **(B)** β APN es un inhibidor competitivo de LOXL2. E = enzima, P = producto, S = sustrato, I/A = inhibidor/anticuerpo.

40

La **FIGURA 22** muestra una región mínima del dominio catalítico (MCD) de LOXL2 que es enzimáticamente activa. **(A)** es un esquema de la construcción LOXL2 MCD. **(B)** LOXL2 MCD se secreta eficazmente. **(C)** LOXL2 MCD es enzimáticamente activa.

45

La **FIGURA 23** ilustra la internalización y la captación del anticuerpo dirigido contra LOX. El análisis de la inmunofluorescencia de LOX en células tumorales *in vivo* se llevó a cabo utilizando anticuerpos. **(A-B)** Células Hs578t se transfectaron con siNP (control con silenciamiento no dirigido) y se incubaron durante 3 horas con mAb. Lox se localizó en el citosol. **(C-D)** Se incubaron células Hs578t durante 3 horas con mAb transfectados con siLOX. La proteína LOX era también periplásmica en la célula. LOX se detectó con M37 **(A, C)** o anticuerpo M64 **(B, D)**. Se obtuvieron resultados similares de internalización y captación de mAb dirigidos contra LOX12. De esta manera, los resultados respaldan las conclusiones de que la tinción es específica de LOX o LOXL2.

50

La **FIGURA 24** muestra la internalización y la captación de anticuerpos de Hs578t confluentes y anticuerpos dirigidos contra LOX de células **(A)** permeabilizadas o **(B)** no permeabilizadas. Las células tuvieron 2 días de postconfluencia, 4 días después del plaqueo a 50.000 células/pocillo en un porta de 8 cámaras. Se incubaron las células durante 3 horas con M64 dirigido contra Lox y se detectaron con Alexa 488-verde. Se obtuvieron resultados similares de la internalización y la captación de mAb dirigidos contra Loxi2.

55

La **FIGURA 25** ilustra la internalización y la captación de anticuerpos dirigidos contra LOX en células Hs578t transfectadas con ARNip y se transfectaron células Hs578t con **(A, B)** siNT o **(C, D)** siLOX y se incubaron con anticuerpo dirigido contra LOX durante 5 horas. Se tomaron imágenes de las células, detectadas con M64 dirigido contra Lox **(A, C)** o anti-colágeno I **(B, D)**, se tomaron 7 días después de la transfección. Se obtuvieron resultados 5 similares de internalización y captación de los mAb dirigidos contra Loxl2.

La **FIGURA 26** muestra la especificidad de LOX Pep2 M64. Se cribaron los mAb por su capacidad para inhibir la invasión y la migración celular a través de **(A)** Colágeno I y/o **(B)** matriz de Colágeno IV. **(C)** Se detectó la especificidad de M64Mab en células Hs578T en portas de cámara (posterior a la confluencia. Día 6). **(D)** 10 Localización de LOX en comparación con las células Hs578T de colágeno en portas de cámara (posterior a la confluencia: Día 6). Las células no se permeabilizaron y las imágenes se tomaron con un aumento 63X.

La **FIGURA 27** muestra un estudio del curso temporal de las células Hs578T desde el Día 0 al Día 15 después de la confluencia.

15 La **FIGURA 28** representa gráficamente la inmunohistoquímica (IHC) utilizando anticuerpos dirigidos contra LOXL2 y LOX en una muestra de tejido de tumor de mama metastásico (ganglio linfático) Se llevó a cabo la IHC utilizando Breast TMA: CC08-21-002 (Cybrdi), una muestra de carcinoma ductal infiltrante no específico metastásico, con **(A, B)** LOXL2, **(C, D)** Ki67, un marcador de la proliferación celular, y **(E, F)** y LOX. LOXL2 y LOX se expresan en las 20 células tumorales y existe evidencia de expresión de LOXL2 y LOX en células del estroma. (tinción marrón). **(A, C, E)** aumento de 20X; **(B, E, F)** aumento de 40X.

La **FIGURA 29** representa gráficamente la inmunohistoquímica (IHC) utilizando anticuerpos dirigidos contra LOXL2 y LOX en muestras de tumor de mama primario. Se llevó a cabo la IHC utilizando Breast TMA: CC08-21-002 (Cybrdi), 25 una muestra de carcinoma ductal infiltrante no específico de grado II, con **(A, B)** LOXL2, **(C, D)** Ki67, un marcador de la proliferación celular, y **(E, F)** y LOX. Existe una expresión simultánea de LOXL2 y LOX en el tumor de mama primario, y la proteína LOXL2 se detecta con fuerza en células tumorales y la proteína LOX se detecta principalmente en células del estroma, que rodean de forma inmediata las células tumorales (fibroblastos del estroma y/o miofibroblastos del estroma). **(A, C, E)** aumento de 20X, **(B, E, F)** aumento de 40 X.

30 La **FIGURA 30** es una gráfica que muestra los niveles de ARNm de LOX y LOXL2 expresadas en exceso en tumores y tejidos enfermos fibróticos en comparación con tejidos normales y medidos utilizando chips de ADN proporcionados por Affymetrix, Inc.

35 La **FIGURA 31** representa gráficamente la expresión de LOX/LOXL en muestras de adenocarcinoma de pulmón con respecto a la expresión en tejido normal adyacente del mismo paciente A) LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL4, y B) tienen los mismos datos que **(A)** solo con LOX y LOXL2 representándose solo gráficamente LOX y LOXL2. T: tumor; N: normal.

40 La **FIGURA 32** representa gráficamente la expresión de LOX/LOXL en muestras de adenocarcinoma de pulmón normalizadas con un gen RPL19 constitutivo. Las muestras normales tumorales y adyacentes se representaron gráficamente por separado, **(A)** LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL4 y **(B)** se representaron gráficamente solamente LOX y LOXL2, basándose en los mismos datos que (A). T: tumor; N: normal.

45 La **FIGURA 33** muestra la expresión simultánea de LOX y LOXL2 en células MCF-7 hipóxicas. LOX y LOXL2 se indujeron mediante hipoxia en células MCF-7, que normalmente expresan niveles muy bajos de LOX y LOXL2 (las veces de regulación en exceso frente a las células que crecen en condiciones normóxicas se representan gráficamente en el eje de la izquierda). Se hicieron crecer las células en una incubadora de cultivo de tejidos ajustada a O₂ al 2%, CO₂ al 5% durante 3 días (frente a la normoxia: ~ O₂ al 20%, CO₂ al 5%). MCF7: línea celular 50 de tumor de mama.

La **FIGURA 34** muestra los niveles de ARNm de los miembros de la familia lisil oxidasa en líneas celulares humanas. Se llevó a cabo la qRT-PCR en una etapa en 100 ng/rxn de ARN. MCF7, MB231, BT549, Hs578t: líneas celulares de tumor de mama; A549: línea celular de tumor pulmonar; HT1080: línea celular de fibrosarcoma; HFF: línea celular de 55 fibroblastos.

La **FIGURA 35** es una gráfica de validación de la RT PCR de **(A)** shARN y **(B)** ARNip silenciado de LOX/LOXL2 en las FIGURA 36-39. **(C)** Se llevó a cabo también un ensayo de migración que utiliza células MDA-MB 231 transfectadas con ARNip de Lox, Loxl2, Lox/Loxl2. El ARNip silenciado de Lox inhibe las propiedades invasivas de

las células MDA MB 231 en un 52% en comparación con el ARNip del control no dirigido. **(D)** El respaldo de los datos de Taqman para el ARNip silenciado en células MDA MB 231 se muestra en **(C)**.

La **FIGURA 36** es una gráfica que muestra la sensibilidad a erlotinib de células shLOXL2. La línea celular shLOXL2 silenciada (shLOXL2.195) mostró aproximadamente una reducción de 7 veces en la viabilidad celular. La CI50 calculada se comparó con la línea del control (sh control) la línea celular parenteral es MDA-MB-231. El porcentaje de crecimiento (viabilidad) se representó gráficamente en el eje izquierdo. Erlotinib representa el tipo de fármaco de los inhibidores de EGFR, que incluyen gefitinib.

10 La **FIGURA 37** es una gráfica que muestra la sensibilidad a metotrexato (MTX) de la línea celular MDA-MB-231 shLOX. Se representó gráficamente el porcentaje de crecimiento (viabilidad) en el eje de la izquierda. La línea celular shLOX silenciada mostró aproximadamente una reducción de 2 veces en la viabilidad en comparación con la línea del control (control GFP).

15 La **FIGURA 38** es una gráfica que muestra la sensibilidad al cisplatino (DDP) con el anticuerpo dirigido contra sLOX/LOXL2 o el anticuerpo dirigido contra LOX. **(A)** Líneas celulares MDA-MB-231 siLOX y siLOXL2 o **(B)** Líneas celulares MiaCapa 2 con anticuerpo dirigido contra LOX y su sensibilidad a DDP. Se representó gráficamente la viabilidad en el eje de la izquierda. Las líneas celulares siLOX y SiLOXL2 silenciadas tuvieron una reducción de aproximadamente el 25% en la viabilidad en comparación con la línea del control (control no dirigido). **(C)** La CI50 de

20 DDP de MiaCaPa 2 y otras líneas celulares tratadas con o sin anticuerpo dirigido contra LOX. **(D)** Una gráfica del crecimiento de la inhibición del anticuerpo (M64) dirigido contra LOX o del anticuerpo (M20) dirigido contra LOXL2 solos en comparación con el no tratado (Unt).

La **FIGURA 39** muestra la sensibilidad a la doxorubicina del ARNip o shARN de las líneas celulares MDA-MB-231.

25 **(A)** Líneas celulares siLOX, siLOXL2, y siLOX/LOXL2. Se representó gráficamente la viabilidad en el eje de la izquierda. Las líneas celulares siLOX, siLOXL2 y siLOX/siLOXL2 doblemente silenciadas muestran una creciente sensibilidad a la doxorubicina, mostrando la CI50 calculada una disminución del 27% - 55% en comparación con la línea celular progenitora (control). **(B)** Una gráfica que muestra la sensibilidad de la doxorubicina de las líneas celulares MDA-MB-231 siLOX, siLOXL2, y siLOX/LOXL2 genéticamente inactivadas en comparación con **(C)** la

30 sensibilidad a la doxorubicina de las líneas celulares MDA-MB-231 shLOX y shLOXL2. Se representó gráficamente la viabilidad en el eje de la izquierda.

La **FIGURA 40** es una gráfica que muestra el promedio de la ganancia del tamaño del implante procedente de células tumorales MCF7 y células MCF7 transfectadas con LOXL2 implantadas en la cápsula subrenal de ratones

35 sin pelo. Se dejó a los implantes formar tumores durante 16 días. La transfección estable de LOXL2 en MCF7 (MCF7-LOXL2) dio como resultado tumores primarios muy grandes / más agresivos que los observados en las células MCF-7 naturales.

La **FIGURA 41** es una gráfica que muestra el promedio de la ganancia del tamaño del implante procedente del implante de células tumorales HT1080 en la cápsula subrenal de ratones sin pelo. Se dejó a los implantes formar tumores durante 10 días. Los ratones se trataron dos veces por semana con diversos anticuerpos (30 mg/kg, inyección intraperitoneal). Cada grupo de cinco ratones se trató con. AC1: anticuerpo control negativo; M64, M5, o M11: anticuerpos "no dirigidos contra LOXL2" (anticuerpos dirigidos contra LOX); o AB23: anticuerpo dirigido contra LOXL2. La tendencia con AB23: tamaño de tumor promedio más pequeños de aproximadamente ~ 25% en este

45 modelo agresivo de tumor primario.

La **FIGURA 42** ilustra la enzimología de la lisil oxidasa. Las enzimas LOX/LOXL actúan mediante un mecanismo de ping-pong que se puede describir mediante la cinética de Michaelis-Menten.

50 La **FIGURA 43** ilustra los modos comunes de inhibición enzimática.

La **FIGURA 44** ilustra los modos de inhibición enzimática, tales como la inhibición de LOXL2.

Descripción detallada

55

I. Tratamiento mediante inhibición de LOX o LOXL

[0034] Se describen en el presente documento la metodología y las composiciones y kits relacionados para evitar y tratar diversas enfermedades asociadas con la proliferación anormal de células, angiogénesis y fibrosis, utilizando

un inhibidor de la forma procesada de las proteínas lisil oxidasa (LOX) o de tipo lisil oxidasa (LOXL).

[0035] Sin pretender quedar vinculado por ninguna teoría, la inhibición de las formas procesadas de LOX o LOXL es eficaz en la prevención o el tratamiento de la invasión tumoral y la metástasis, y para tratar enfermedades asociadas con la angiogénesis anormal y las enfermedades fibróticas.

[0036] Se describen en el presente documento los procedimientos que se proporcionan para tratar o evitar la invasión o la metástasis tumoral en un sujeto *in vivo*, que comprenden: administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de una LOX o LOXL.

[0037] Se describen en el presente documento los procedimientos que se proporcionan para reducir el crecimiento tumoral en un sujeto *in vivo*, que comprenden: administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de una LOX o LOXL procesada de tal manera que el crecimiento del tumor se reduce en al menos un 25%, 50%, 75%, 90%, o 95%. De acuerdo con algunas realizaciones, el tumor puede ser un tumor metastásico.

[0038] Se describen en el presente documento los procedimientos que se proporcionan para aumentar o potenciar las posibilidades de supervivencia de un sujeto con un tumor metastásico, que comprenden: administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un inhibidor de la LOX o LOXL procesada, aumentando o potenciando por tanto las posibilidades de supervivencia del sujeto tratado en un determinado periodo de tiempo. En algunas realizaciones, la supervivencia del sujeto aumenta en al menos 10 días, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 8 años, o 10 años.

[0039] En algunas realizaciones, el inhibidor LOXL es un anticuerpo que se une específicamente a una región de LOXL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 11 o 16.

[0040] Tal como se describe en más detalle a continuación y en la sección de EJEMPLOS, los inhibidores de la LOXL activa (tales como pequeñas moléculas o anticuerpos) se pueden utilizar para inhibir la invasión tumoral, la angiogénesis o la metástasis, y para tratar el cáncer, los tumores, y las enfermedades asociadas con la angiogénesis anormal y las enfermedades fibróticas.

II: Tratamiento mediante inhibición de LOX y LOXL

[0041] Se describen en el presente documento una metodología innovadora y las composiciones y kits relacionados para evitar y tratar diversas enfermedades asociadas con la proliferación celular anormal, la angiogénesis y la fibrosis, utilizando un inhibidor de una forma procesada de las proteínas lisil oxidasa (LOX) o de tipo lisil oxidasa.

[0042] La inhibición simultánea de LOX y LOXL es eficaz en la prevención o el tratamiento de la invasión y la metástasis de una amplia variedad de tumores, y para tratar las enfermedades asociadas con la angiogénesis anormal y las enfermedades fibróticas.

[0043] Se describen en el presente documento los procedimientos que se proporcionan para tratar o evitar la invasión o la metástasis tumoral en un sujeto *in vivo*, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de LOX y un inhibidor de una LOXL.

[0044] Se describen en el presente documento los procedimientos que se proporcionan para reducir el crecimiento tumoral en un sujeto *in vivo*, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de LOX y un inhibidor de una LOXL de tal manera que se reduzca el crecimiento del tumor en al menos un 25%, 50%, 75%, 90%, o 95%. De acuerdo con algunas realizaciones, el tumor puede ser un tumor metastásico.

[0045] Se describen en el presente documento los procedimientos que se proporcionan para aumentar o potenciar las posibilidades de supervivencia de un sujeto con un tumor metastásico, que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un inhibidor de LOX y un inhibidor de una LOXL, aumentando o potenciando por tanto las posibilidades de supervivencia del sujeto tratado en un determinado periodo de tiempo. En algunas realizaciones, la supervivencia del sujeto se aumenta en al menos 10 días, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 8 años, o 10 años.

III. Terapia combinada

[0046] La presente divulgación proporciona también una metodología innovadora y las composiciones y kits relacionados para evitar y tratar diversas enfermedades asociadas con la proliferación anormal de células, angiogénesis y fibrosis, utilizando un tratamiento combinado que incluye un inhibidor de LOXL2.

5 [0047] Tal como se describe en detalle a continuación, la inhibición de LOX o LOXL podría ralentizar o detener la progresión de la transición epitelial-mesenquimal (EMT) en células tumorales, o inducir una transición mesenquimal-epitelial (MET) hacia un estado menos tumorigénico, volviendo por tanto el tumor o las células enfermas más susceptibles a la irradiación, los fármacos quimioterapéuticos, los agentes biológicos antineoplásicos, los agentes antiangiogénicos, y los agentes antifibróticos.

10

IV. Selección de agentes

[0048] La presente divulgación describe procedimientos innovadores para seleccionar agentes que eviten o inhiban la invasión tumoral, la angiogénesis y la metástasis. Estos agentes se pueden utilizar solos o en
15 combinación con otros agentes terapéutico para evitar o tratar enfermedades asociadas con la proliferación celular anormal, la angiogénesis y la fibrosis, tal como el cáncer, tumores, retinopatía diabética, degeneración macular, escleroderma, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, escleroderma, aterosclerosis, y enfermedad de Alzheimer.

20 [0049] Los procedimientos que se muestran en el presente documento se pueden utilizar para seleccionar un inhibidor de la invasión tumoral, la angiogénesis o la metástasis, que comprenden poner en contacto células que están en un estado de transición epitelial-mesenquimal (EMT) con un inhibidor de la proteína lisil oxidasa (LOX) o una proteína de tipo lisil oxidasa (LOXL); detectar un cambio en el estado de EMT de las células, en el que la reducción del estado de EMT o un cambio del estado de EMT al estado de MET indica que el inhibidor de LOX o de
25 LOXL es un inhibidor de la fibrosis, la invasión tumoral, la angiogénesis o la metástasis. De esta manera, se proporcionan también en el presente documento procedimientos para utilizar los ensayos de EMT-MET para cribar los inhibidores de LOX/LOXL que facilitan la transición de EMT a MET en células tumorales.

[0050] Aunque sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, el papel de LOX y LOXL en la EMT está asociado
30 con la captación de LOX o LOXL activos por células tumorales, permitiendo a LOX o LOXL interactuar con cofactores intracelulares relevantes; y la inhibición de LOX o de LOXL podría ralentizar o detener la progresión de la EMT en células tumorales, o inducir una MET hasta un estado menos tumorigénico, evitando o inhibiendo por tanto la invasión, la angiogénesis y la metástasis del tumor, y volviendo las células del tumor primario más susceptibles a otra intervención terapéutica, tal como la irradiación, los fármacos quimioterapéuticos, los agentes biológicos
35 antineoplásicos, los agentes antiangiogénicos, y los agentes antifibróticos.

[0051] Un estado de EMT de las células tiene las características de la tinción positiva de la vimentina o la fibronectina con bajos niveles de tinción de la caderina-E y un citoesqueleto de actina alargado y remodelado tal como se ha desvelado por la tinción de la faloidina de la actina F. De esta manera, la reducción del estado de EMT o
40 un cambio de estado de EMT a MET se pueden vigilar midiendo o detectando una disminución en la tinción de la vimentina o la fibronectina, un aumento en la tinción de la caderina E, y/o remodelando el citoesqueleto de actina mediante la tinción de la faloidina de la actina F.

[0052] Opcionalmente, se puede utilizar la invasión o la migración tumoral *in vitro* o *in vivo* para evaluar los
45 fenotipos de la EMT o de la MET de las células, ya que la invasividad y la capacidad migratoria crecientes están asociadas con EMT. Por ejemplo, la cicatrización de la herida *in vitro* o un ensayo de cicatrización se pueden usar para vigilar la transición desde el estado de EMT a MET, ya que las células en un estado de EMT que son más invasivas y migratorias deben rellenar la cicatriz más rápidamente que las células menos invasivas o migratorias.

50 [0053] Tal como se describe con más detalle a continuación y en la sección de EJEMPLOS, se pueden ensayar diversos inhibidores LOX o LOXL (tal como pequeñas moléculas o anticuerpos) para su capacidad de inhibir la invasión tumoral, la angiogénesis o la metástasis utilizando el ensayo de transición EMT- MET. La inhibición de las formas de longitud completa o procesadas de LOX o LOXL es eficaz en la prevención o el tratamiento de la invasión y la metástasis tumorales. De esta manera, se proporcionan también en el mismo procedimientos para cribar,
55 seleccionar y diseñar compuestos candidatos para la inhibición de las formas activas de LOX o LOXL, y procedimientos para generar anticuerpos contra las formas activas de LOX o LOXL.

V. Diagnóstico

[0054] La presente divulgación proporciona una metodología innovadora y las composiciones y kits relacionados para el diagnóstico o la vigilancia de diversas enfermedades asociadas con la fibrosis, utilizando moléculas o agentes que reconocen específicamente una forma procesada de las proteínas lisil oxidasa (LOX) o de tipo lisil oxidasa (LOXL). Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, las formas procesadas de LOX o LOXL son importantes biomarcadores de la invasión y la metástasis tumorales, y de las enfermedades, y de las enfermedades asociadas con la angiogénesis anormal y las enfermedades fibróticas.

[0055] Tal como se describe con más detalle a continuación, se pueden evaluar los niveles de LOX o LOXL procesadas mediante diversos procedimientos que incluyen, pero no se limitan a inmunohistoquímica utilizando anticuerpos que se unen específicamente a la forma procesada de LOX o LOXL. Se puede medir la actividad enzimática de LOX o LOXL activas utilizando diversos procedimientos que incluyen, pero no se limitan a ensayos cromogénicos y fluorométricos.

VI Tratamiento de la fibrosis

15

[0056] Se describen también composiciones, procedimientos, y kits para evitar y tratar diversas enfermedades asociadas con la fibrosis, utilizando un inhibidor de una forma activa de las proteínas lisil oxidasa (LOX) o de tipo lisil oxidasa (LOXL).

20 **[0057]** En un aspecto, se describe en el presente documento un procedimiento para tratar una dolencia o patología cardíaca en un sujeto, que comprende: administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de LOX o LOXL. Por ejemplo, la dolencia o patología cardíaca puede ser hipertensión, enfermedad cardíaca hipertensiva (HHD, infarto de miocardio (IM), aterosclerosis, oestenosis.

25 **[0058]** En otro aspecto, se describe en el presente documento un procedimiento para evitar una dolencia o patología cardíaca en un sujeto, que comprende: administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de LOX o LOXL antes de, de forma simultánea, o con posterioridad a un acontecimiento cardíaco adverso. El acontecimiento cardíaco adverso puede ser infarto de miocardio, tal como infarto de miocardio agudo.

30 **[0059]** El inhibidor de LOX o de LOXL se puede administrar antes de, de forma simultánea, o con posterioridad al acontecimiento cardíaco adverso. Por ejemplo, el inhibidor se puede administrar al menos 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, o 10 h, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días después del infarto de miocardio.

[0060] El inhibidor de LOX o LOXL se puede administrar al sujeto localmente en el sitio de la fibrosis producida por el acontecimiento cardíaco adverso.

40 **[0061]** En otro aspecto más, se describe en el presente documento un dispositivo para evitar o tratar una dolencia o patología cardíaca en un sujeto, que comprende: un componente que comprende un inhibidor de LOX o de LOXL. El componente puede ser una prótesis endovascular que incorpora un inhibidor de LOX o de LOXL, que puede ser una molécula pequeña con un peso molecular por debajo de 500 Dalton, tal como β -aminopropionitrilo (BAPN). La prótesis endovascular puede estar revestida por el inhibidor.

[0062] De forma alternativa, el dispositivo puede comprender un catéter para administrar el inhibidor de LOX o de LOXL localmente en el sitio de la fibrosis cardíaca producida por el acontecimiento cardíaco adverso.

45

[0063] En otro aspecto más, se describe en el presente documento un kit que comprende: una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de LOX o de LOXL en un excipiente farmacéuticamente aceptable; e instrucciones acerca de la forma de tratar o evitar un dolencia o patología cardíaca utilizando una composición farmacéutica.

50

[0064] Se describen también en el presente documento procedimientos, composiciones, y kits para tratar o evitar una enfermedad asociada con la fibrosis en un sujeto, que comprenden: administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de LOXL2. La enfermedad asociada con la fibrosis se puede seleccionar entre fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, cicatrización cutánea y formación de queloides, y enfermedad de Alzheimer.

55

1. Proteínas de lisil oxidasa y de tipo lisil oxidasa

[0065] Tal como se usa en el presente documento, el término "lisil oxidasa" se refiere a una enzima que cataliza la siguiente reacción: $\text{peptidil-L-lisil-péptido} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{peptidil-alilsilil-péptido} + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$. Otros sinónimos de la

lisil oxidasa (EC 1.4.3.13) incluyen proteína-lisina 6-oxidasa y proteína-L-lisina:oxígeno 6 oxidorreductasa (desaminante). Véanse, por ejemplo, Harris y col., *Biochim. Biophys. Acta* 341: 332-44 (1974); Rayton y col., *J. Biol. Chem.* 254: 621-26 (1979); Stassen, *Biophys. Acta* 438: 49-60 (1976). Una quinoproteína que contiene cobre con un aducto de lisilo de la tirosil quinona en su centro activo, la lisil oxidasa cataliza la oxidación de la peptidil lisina para dar como resultado la formación del peptidilo alfa-aminoadípico-delta-semialdehído. Una vez formado, este semialdehído se puede condensar de forma espontánea con los aldehídos adyacentes o con otros grupos de las retículas intra e intercatenarias. Véase, por ejemplo, Rucker y col., *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 996S-1002S (1998). Un ejemplo de proteína lisil oxidasa o de tipo lisil oxidasa incluye la enzima que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a un polipéptido expresado o traducido a partir de una de las secuencias: EMBL/GenBank con números de acceso M94054; AAA59525.1 -- ARNm; S45875; AAB23549.1 -ARNm; S78694; AAB21243.1 - ARNm; AF039291; AAD02130.1 -ARNm; BC074820; AAH74820.1 -ARNm; BC074872; AAH74872.1 - ARNm; M84150; AAA59541.1—ADN genómico. Una realización de LOX es una preproteína lisil oxidasa humana (hLOX).

[0066] Se describen ejemplos de una enzima o proteína de tipo lisil oxidasa en Molnar y col., *Biochim Biophys Acta.* 1647: 220-24 (2003); Csiszar, *Prog. Nucl. Acid Res.* 70: 1-32 (2001); y en el documento WO 01/83702 publicado el 8 de noviembre de 2001, todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia. (se señala que en estas 3 publicaciones, "LOXL1" se ha denominado "LOXL", mientras que en la presente divulgación "LOXL" se refiere de manera general a la proteína de tipo lisil oxidasa, no exactamente a LOXL1). Estas enzimas incluyen LOXL1, codificada por el ARNm depositado en el GenBank/EMBL BC015090; AAH15090.1; LOXL2, derivado funcional retiene al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% de su actividad de oxidación del lisilo. Se pretende también que una lisil oxidasa pueda incluir sustituciones conservativas de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad. Los expertos en esta técnica conocen las sustituciones conservativas adecuadas de los aminoácidos que se pueden hacer por lo general sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en la técnica reconocen que, en general, la sustitución de un único aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no altera sustancialmente la actividad biológica. Véase, por ejemplo, Watson, y col., *Molecular Biology of the Gene*, 4ª Edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224.

[0067] "Lisil oxidasa" o LOX abarca también un fragmento funcional de un derivado que retiene sustancialmente su actividad enzimática catalizando la desaminación de los restos de lisilo. Normalmente, un fragmento o derivado funcional retiene al menos un 50% de su actividad de oxidación del lisilo. En algunas realizaciones, un fragmento o derivado funcional retiene al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% de su actividad de oxidación del lisilo. Se pretende también que una lisil oxidasa pueda incluir sustituciones conservativas de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad. Los expertos en esta técnica conocen las sustituciones conservativas adecuadas de los aminoácidos que se pueden hacer por lo general sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en la técnica reconocen que, en general, la sustitución de un único aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no altera sustancialmente la actividad biológica. Véase, por ejemplo, Watson, y col., *Molecular Biology of the Gene*, 4ª Edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224.

[0068] Se proporcionan a continuación detalles de algunos ejemplos de proteínas lisil oxidasa o de tipo lisil oxidasa.

[0069] La lisil oxidasa es una amina oxidasa que contiene cobre, que oxida los sustratos de aminas primarias para reactivar los aldehídos. La lisil oxidasa cataliza la desaminación oxidativa de los restos de peptidil lisina e hidrolisina a colágenos, y los restos de peptidil lisina a elastina, y es esencial para la formación de la matriz extracelular. Los aldehídos de peptidilo resultantes se condensan espontáneamente y experimentan reacciones de oxidación para formar las retículas covalentes derivadas de lisina requeridas para obtener una integridad estructural normal de la matriz extracelular. Junto al producto de aldehído de peptidilo, se liberan cantidades estequiométricas de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y amonio. Véase, por ejemplo, Kagan y col., *J. Cell. Biochem* 88: 660-672 (2003).

[0070] La actividad principal de LOX es la oxidación de los restos específicos de lisina a colágeno y elastina en el exterior de la célula, sin embargo, esta puede actuar también intracelularmente, donde puede regular la expresión génica (Li y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12817-12822 (1997), Giampuzzi y col., *J. Biol. Chem.* 275: 36341-36349 (2000)). Además, LOX induce la quimiotaxis de los monocitos, los fibroblastos y las células del músculo liso (Lazarus y col., *Matrix Biol.* 14: 727-731 (1995) Nelson y col., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 188: 346-352 (1988)). La propia LOX está inducida por numerosos factores de crecimiento y esteroides tales como TGF-β, TNF-α e interferón (Csiszar, *Prog. Nucl. Acid Res.* 70: 1-32 (2001)). Recientes estudios han atribuido otros papeles a LOX en diversas funciones biológicas tales como la regulación del desarrollo, la supresión de tumores, la motilidad celular, y la senescencia celular. El papel diverso de LOX, y su recientemente descubierta familia de la amina oxidasa, de tipo LOX (LOXL), puede jugar importantes papeles con su localización intracelular y extracelular.

[0071] Se sabe que existen cinco lisil oxidasas diferentes en seres humanos y ratones, LOX y cuatro relacionadas con LOX, o proteínas de tipo LOX (LOXL, LOXL2, LOXL3, LOXL4), denominadas conjuntamente "LOX/LOXL" a los fines de esta divulgación. Las cinco formas de lisil oxidasa residen en cinco cromosomas diferentes. Estos miembros

de la familia muestran algún solapamiento en la estructura y la función, pero parecen también tener distintas funciones. Por ejemplo, la eliminación dirigida de LOX mediante mutagénesis parece ser letal en el parto en ratones (Hornstra y col., *J. Biol. Chem.* 278: 14387-14393 (2003)), mientras que la deficiencia en LOXL no produce un fenotipo de desarrollo grave (Bronson y col., *Neurosci. Lett.* 390: 118-122 (2005)).

5

[0072] LOX tiene dominios de proteínas muy conservados, conservados en algunas especies que incluyen al ser humano, ratón, rata, pollo, peces y *Drosophila*. La familia LOX humana tiene una región del extremo C muy conservada que contiene el dominio catalítico LOX de 205 aminoácidos. La región conservada contiene la unión al cobre (Cu), el dominio conservado del tipo receptor de la citocina (CRL), y el sitio del cofactor lisil-tirosilquinona (LTQ). Las secuencias señal extracelulares previstas están representadas por las secuencias sombreadas. Se conservan también de forma similar doce restos de cisteína, en el que dos de ellos residen en el interior de una región del propéptido y diez están en la forma procesada catalíticamente activa de LOX (Csiszar, *Prog. Nucl. Acid Res.* 70: 1-32 (2001)). La región conservada incluye también un dominio de unión a la fibronectina.

10

[0073] La región del propéptido de LOX contiene el péptido señal, y se escinde, estando el sitio de escisión previsto entre Cys21-Ala22, para generar un péptido secuencia señal y una forma de propéptido de aminoácidos de 48 kDa de LOX, denominada también en el presente documento como forma de longitud completa. El propéptido queda N-glicosilado durante el paso a través del Aparato de Golgi y se secreta en el ambiente extracelular en el que la proenzima, o el propéptido, se escinde entre Gly168-Asp169 por una metaloendoproteasa, una proteinasa C de procolágeno, que son productos de los genes *Bmp1*, *Tll1* y *Tll2* para producir una forma procesada o madura de la enzima. BMP I (proteína I morfogenética ósea) es una proteinasa C de procolágeno que procesa el propéptido para dar como resultado una enzima funcional de 30 kDa y un propéptido de 18 kDa. La secuencia de codificación del propéptido está moderadamente conservada (&O-70%), mientras que la secuencia de codificación de la región del extremo C de 30 kDa de la proenzima en la que está localizado el sitio activo está muy conservada (aproximadamente un 95%). (Kagan y Li, *J. Cell. Biochem.* 88: 660-672 (2003); Kagan y col., *J. Cell Biochem.* 59: 329-38 (1995)). Las unidades de N-glicosilo se han eliminado también posteriormente.

20

25

[0074] Se han previsto potenciales péptidos señal similares en el término amino de LOXL, LOXL2, LOXL3, y LOXL4. Los sitios previstos de escisión de la señal están entre Gly25-Gln26 para LOXL, entre Ala25-Gln26, para LOXL2, y entre Gly25-Ser26 para LOXL3. El consenso para la escisión de BMP-1 en procolágenos y pro-LOX está entre Ala/Gly-Asp, y a menudo va seguido por un resto ácido o cargado. Un sitio de escisión potencial para procesar la LOXL procesada es Gly303-Asp304, sin embargo, este va seguido de una Pro atípica. LOXL3 también tiene un sitio de escisión potencial en Gly447-Asp448, que va seguido por una Asp, el procesamiento en este sitio puede dar como resultado un péptido maduro de tamaño similar a la LOX madura. Se identificó también un sitio de escisión potencial de BN4P- en el interior de LOXL4, en los restos Ala569-Asp570 (Kim y col., *J. Biol. Chem.* 278: 52071-52074 (2003)). LOXL2 puede escindirse también proteolíticamente de forma análoga a los otros miembros de la familia LOXL y se secreta en el medio (Akiri y col., *Cancer Res.* 63: 1657-1666 (2003)).

30

35

[0075] Una característica que no se sabe si es común entre LOX y LOXL es la de los dominios del receptor secuestrado rico en cisteína (SRCR). LOX y LOXL carecen de dominios SRCR, mientras que LOXL2, LOXL3, y LOXL4 tienen cada uno cuatro dominios SRCR en el extremo N. Los dominios SRCR se encuentran en proteínas de matriz secretadas, transmembrana, o extracelulares. Se sabe también que los dominios SRCR median en la unión al ligando en numerosas proteínas secretadas y receptoras (Hoheneste y col., *Nat. Struct. Biol.* 6: 228-232 (1999); Sasaki y col., *EMBO J.* 17: 1606-1613 (1998)). Otro dominio único en LOXL es la presencia de un dominio rico en prolina (Molnar y col., *Biochimica Biophysica Acta* 1647: 220-224 (2003)).

40

45

[0076] La distribución del tejido puede diferir también entre LOX y los diversos LOXL. LOX está muy expresada en el corazón, la placenta, los testículos, el pulmón, el riñón y el útero, pero, marginalmente, en el cerebro y el hígado. LOXL 1 se expresa en la placenta, el riñón, el músculo, el corazón, el pulmón, y el páncreas, y como con LOX, tiene mucha menor expresión en el cerebro y el hígado (Kim y col., *J. Biol. Chem.* 270: 7176-7182 (1995)). LOXL2 está muy expresada en el útero, la placenta, y otros órganos, pero de forma similar a LOX y LOXL, se expresa de forma muy baja en el cerebro y el hígado (Jourdan Le-Saux y col., *J. Biol. Chem.* 274: 12939: 12944 (1999)). LOXL3 está muy expresada en los testículos, bazo, y próstatas, moderadamente en la placenta, y no en el hígado, mientras que LOXL4 está muy expresada en el hígado (Huang y col., *Matrix Biol.* 20: 153-157 (2001); Maki y Kivirikko, *Biochem. J.* 355: 381-387 (2001); Jourdan Le-Saux y col., *Genomics* 74: 211-218 (2001); Asuncion y col., *Matrix Biol.* 20: 487-491 (2001)).

50

55

[0077] La expresión, o la implicación de LOX y de las diferentes proteínas LOXL, en enfermedades, puede variar también. Esto puede deberse a numerosos motivos, tales como la diferencia en la distribución del tejido, el

procesamiento, los dominios, la regulación de la actividad, así como otras diferencias entre las proteínas. Por ejemplo, LOX y LOXL están implicadas en las enfermedades fibróticas ya que ambas, LOX y LOXL, están muy expresadas en los miofibroblastos alrededor de las zonas fibróticas (Kagen, *Pathol. Res. Pract.* 190: 910-919 (1994); Murawaki y col., *Hepatology* 14: 1167-1173 (1991); Siegel y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2945-2949 (1978); 5 Jourdan Le-Saux y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 199: 587-592 (1994); Kim y col., *J. Cell Biochem.* 72: 181-188 (1999)). LOX y las diversas LOXL están también implicadas en numerosos cánceres. Por ejemplo, se ha demostrado que LOXL1 y LOXL4 están epigenéticamente silenciadas y pueden inhibir la ruta de señalización de la cinasa regulada por la señal extracelular de ras en el cáncer de vejiga humano (Wu y col., *Cancer Res.* 67: 4123-4129 (2007)). Otras han mostrado una regulación en exceso y una amplificación selectivas del gen LOXL4 en el 10 carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Gorrough y col., *J. Pathol.* 212: 74-82 (2007)). Se ha implicado a LOX y LOXL2 en numerosos tumores, tales como cánceres de colon y esofágicos (Csiszar, *Prog. Nucl. Acid Res.* 70: 1-32 (2001)). En el cáncer de mama, LOX y los miembros de la familia LOXL se han vinculado al cáncer (Kirschmann y col., *Cancer Res.* 62: 448-4483 (2002)).

15 2. Selección de moduladores de LOX/LOXL activa

[0078] Se pueden seleccionar también los moduladores de la LOX/LOXL activa utilizando una amplia variedad de ensayos de selección. Se puede seleccionar la LOX/LOXL activa, tras la secreción y la escisión proteolítica de la preproteína, utilizando una amplia variedad de ensayos de selección. En una realización, se proporcionan 20 procedimientos para seleccionar un compuesto que se une a una LOX/LOXL activa, que comprenden incubar un compuesto de unión candidato con un polipéptido de una LOX o LOXL activa; y determinar si se ha producido la unión.

[0079] En otra realización, se proporcionan procedimientos para identificar un modulador, por ejemplo, 25 activadores/agonistas o inhibidores/antagonistas de una LOX/LOXL activa, que comprenden incubar un compuesto candidato con LOX/LOXL activa; ensayar una actividad biológica de la LOX/LOXL activa; y determinar si se ha alterado la actividad biológica de la LOX/LOXL activa.

[0080] En otra realización, se proporcionan procedimientos para identificar activadores de los inhibidores de la 30 LOX/LOXL activa, que comprenden incubar un compuesto candidato en un cultivo celular que contiene la LOX/LOXL activa; y detectar el cambio de actividad biológica de las células en el cultivo, en el que el cambio de la actividad biológica de las células en el cultivo es indicativo de un activador de los inhibidores de la LOX/LOXL activa. El cambio en la actividad biológica puede ser una función específica de LOX/LOXL, la actividad enzimática de LOX/LOXL, o los niveles de LOX/LOXL. En algunas realizaciones, la actividad biológica es una función celular, tal 35 como la migración, la EMT/MET, u otras, y se compara el cambio para el control o la(s) muestra(s) de referencia. Por ejemplo, los controles pueden ser muestras de control negativas que pueden incluir un cultivo con niveles decrecientes de LOX/LOXL a los cuales se añade el compuesto candidato o un cultivo con la misma cantidad de LOX/LOXL activa, pero sin añadir el compuesto candidato. En algunas realizaciones, cultivos separados que contienen diferentes cantidades de la LOX/LOXL activa se ponen en contacto con un compuesto candidato. Por 40 ejemplo, si se observa un cambio en la actividad biológica, y si el cambio es mayor en el cultivo que tiene mayores cantidades de LOX/LOXL activa, el compuesto se identifica como un activador de la LOX/LOXL activa.

[0081] En otro ejemplo, se puede usar una cantidad que expresa de manera significativa LOX y/o LOXL, como 45 fuente de LOX/LOXL activa para los ensayos de selección descritos en el presente documento, mientras que el lisado celular completo podría contener no solo LOX y/o LOXL activas sino también LOX y/o LOXL inactivas.

[0082] El compuesto o la pluralidad de compuestos pueden sintetizarse químicamente o producirse 50 microbiológicamente y/o estar comprendidos en, por ejemplo, muestras, por ejemplo, extractos de células procedentes, por ejemplo, de plantas, animales o microorganismos. Además, el(los) compuesto(s) pueden ser conocidos en la técnica pero saber hasta la fecha que sean capaces de suprimir o activar la LOX/LOXL activa. La mezcla de reacción puede ser un extracto exento de células o puede comprender un cultivo celular o cultivo de tejidos: Los expertos en la técnica conocen las configuraciones adecuadas del procedimiento de la divulgación y se describen de forma general, por ejemplo en Alberts y col., *Molecular Biology of the Cell*, tercera edición (1994) y en los ejemplos adjuntos. Se pueden añadir, por ejemplo, una pluralidad de compuestos a la mezcla de reacción, el 55 medio de cultivo, inyectado en una célula o aplicado de otra manera a un animal transgénico. La célula o el tejido que se pueden emplear en el procedimiento de la divulgación es una célula hospedadora, una célula de mamífero o un animal transgénico no humano de la divulgación.

[0083] Si la muestra que contiene un compuesto o una pluralidad de compuestos se identifica en el procedimiento

de la divulgación, a continuación es posible tanto aislar el compuesto de la forma original identificada que contiene el compuesto de suprimir o activar la LOX/LOXL activa, o bien se puede subdividir adicionalmente la muestra original, por ejemplo, si esta consta de una pluralidad de diferentes compuestos, con el fin de reducir el número de diferentes sustancias por muestra y repetir el procedimiento con las subdivisiones de la muestra original. Dependiendo de la complejidad de las muestras, las etapas descritas anteriormente se pueden llevar a cabo varias veces, por ejemplo, hasta que la muestra identificada de acuerdo con el procedimiento de la divulgación comprenda solo un número limitado de o solo una(s) sustancia(s). En algunas realizaciones, la muestra comprende sustancias de similares propiedades químicas y/o físicas, y en algunas realizaciones, las sustancias son idénticas.

10 **[0084]** Las personas expertas en la técnica conocen algunos procedimientos para producir y cribar bibliotecas grandes para identificar los compuestos que tienen afinidad específica por una diana, tal como la LOX/LOXL activa. Estos procedimientos incluyen el procedimiento de expresión en fago en el que péptidos aleatorizados se expresan en fago y se criban mediante cromatografía de afinidad con un receptor inmovilizado; véanse, por ejemplo, los documentos WO 91/17271, WO 92/01047, la Patente de los Estados Unidos N° 5. 223.409.

15

[0085] En otra solución, se sintetizan bibliotecas combinatorias de polímeros inmovilizados sobre un chip utilizando fotolitografía; véanse, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 5.143.854, los documentos WO 90/15070 y WO 92/10092. Los polímeros inmovilizados se ponen en contacto con un receptor marcado y se someten a barrido de la marca para identificar la unión de los polímeros con el receptor. Se describe la síntesis y el cribado de bibliotecas de péptidos sobre soportes continuos de membrana de celulosa que se pueden utilizar para identificar los ligandos de unión del polipéptido de la divulgación y, de esta manera, posibles inhibidores y activadores, por ejemplo, en Kramer, *Methods Mol. Biol.* 87 (1998), 25-39. Este procedimiento se puede utilizar también, por ejemplo, para determinar los sitios de unión y los motivos de reconocimiento en la LOX/LOXL activa. De una manera similar, se determinó la especificidad del sustrato de la chaperona DnaK y los sitios de contacto entre la interleucina-6 humana y su receptor; véanse Rudiger, *EMBO J.* 16 (1997), 1501-1507 y Weiergraber, *FEBS Lett.* 379 (1996), 122-126, respectivamente.

[0086] Además, se pueden utilizar los procedimientos anteriormente mencionados en la construcción de los epítomos de unión derivados de la LOX/LOXL activa. Se describe una solución similar de forma satisfactoria para los antígenos peptídicos del anticuerpo monoclonal dirigido contra p24 (VIH-1), véase Kramer, *Cell* 91 (1997), 799-809. Se ha descrito una ruta general para el análisis de la huella genética de las interacciones péptido-anticuerpo utilizando la biblioteca peptídica de aminoácidos agrupados en Kramer, *Mol. Immunol.* 32 (1995), 459-465. Además, se pueden derivar antagonistas de la LOX/LOXL activa e identificarse a partir de anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con el polipéptido de la divulgación de acuerdo con los procedimientos tal como se describe en Doring, *Mol. Immunol.* 31 (1994), 1059-1067.

[0087] Más recientemente, el documento WO 98/25146 describe procedimientos adicionales para cribar bibliotecas de complejos para buscar compuestos que tienen una propiedad deseada, por ejemplo, la capacidad de agonizar, unirse a, o antagonizar un polipéptido o su receptor celular. Los complejos de dichas bibliotecas comprenden un compuesto en ensayo, una etiqueta que registra al menos una etapa de la síntesis del compuesto, y una atadura susceptible de modificación por una molécula indicadora. Se utiliza la modificación de la atadura para significar que un complejo contiene un compuesto que tiene una propiedad deseada. Se puede descodificar la etiqueta para desvelar al menos una etapa de la síntesis de dicho compuesto. Otros procedimientos para identificar compuestos que interactúan con los polipéptidos de acuerdo con la divulgación o las moléculas de ácido nucleico que codifican dichas moléculas son, por ejemplo, el cribado *in vitro* con el sistema de expresión en fago así como los ensayos de unión a filtro o la medida en "tiempo real" de la interacción utilizando, por ejemplo el equipo BIAcore (Pharmacia).

[0088] Todos estos procedimientos de acuerdo con la presente divulgación se pueden utilizar para identificar activadores/agonistas e inhibidores/antagonistas de la LOX/LOXL activa del polipéptido relacionado.

50

[0089] Se pueden emplear diversas fuentes para establecer la estructura básica de dicho activador o inhibidor y comprenden, por ejemplo, análogos miméticos de los polipéptidos de la divulgación. Los análogos miméticos del polipéptido de la divulgación o sus fragmentos biológicamente activos se pueden generar mediante, por ejemplo, la sustitución de los aminoácidos que se espera que sean esenciales para la actividad biológica con, por ejemplo, estereoisómeros, es decir, aminoácidos D; véase, por ejemplo, Tsukida, *J. Med. Chem.* 40 (1997), 3534-3541. Además, se utilizan fragmentos en el caso del diseño de componentes análogos de promiméticos biológicamente activos que se pueden incorporar en un péptido para restablecer al menos alguna de las propiedades conformacionales que pueden haberse perdido tras la eliminación de parte del polipéptido original; véase, por ejemplo, Nachman, *Regul. Pept.* 57 (1995), 359-370. Además, la LOX/LOXL activa se puede utilizar para identificar

péptidos miméticos químicos sintéticos que se unen a o pueden funcionar como un ligando, sustrato, ligando de unión o receptor del polipéptido de la divulgación tan eficazmente como lo hace el polipéptido natural; véase, por ejemplo, Engleman, *J. Clin. Invest.* 99 (1997), 2284-2292. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo las simulaciones del plegado y el rediseño informatizado de los motivos estructurales de la LOX/LOXL activa utilizando programas informáticos adecuados (Olszewski, *Proteins* 25 (1996), 286-299; Hoffman, *Comput. Appl. Biosci.* 11 (1995), 675-679). Se puede utilizar la modelización informática del plegado de la proteína para realizar los análisis conformacionales y energéticos de los modelos de péptidos y proteínas detallados (Monge, *J. Mol. Biol.* 247 (1995), 995-1012; Renouf, *Adv. Exp. Med. Biol.* 376 (1995), 37-45). Se pueden utilizar programas adecuados para identificar los sitios interactivos del polipéptido lisil oxidasa y sus proteínas interactuantes mediante búsquedas asistidas por ordenador para determinar las secuencias peptídicas complementarias (Fassina, *Immunomethods* 5 (1994), 114-120). Se han descrito en la técnica anterior sistemas informáticos adecuados adicionales para el diseño de la proteína y los péptidos, por ejemplo, en Berry, *Biochem. Soc. Trans.* 22 (1994), 1033-1036; Wodak, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 501 (1987), 1-13; Pabo, *Biochemistry* 25 (1986), 5987-5991. Se pueden utilizar los resultados obtenidos a partir del análisis informático anteriormente descrito en, por ejemplo, la preparación de péptidos miméticos de la proteína de la divulgación o de sus fragmentos. Dichos análogos de pseudopéptidos de la secuencia de aminoácidos natural de la proteína pueden imitar muy eficazmente la proteína progenitora (Benkirane, *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 33218-33224). Por ejemplo, la incorporación de restos aquirales o de o-aminoácidos fácilmente disponibles a una proteína de la divulgación o uno de sus fragmentos da como resultado la sustitución de los enlaces amida por unidades de polimetileno de una cadena alifática, proporcionando de este modo una estrategia conveniente para construir un peptidomimético (Banerjee, *Biopolymers* 39 (1996), 769-777). Se describen análogos de peptidomiméticos superactivos de pequeñas hormonas peptídicas en otros sistemas en la técnica anterior (Zhang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224 (1996), 327-331). Se pueden identificar también los peptidomiméticos adecuados de un modulador de una LOX/LOXL activa mediante la síntesis de bibliotecas combinatorias de peptidomiméticos a través de alquilaciones sucesivas de la amida y el ensayo de los compuestos resultantes, por ejemplo para sus propiedades de unión e inmunológicas. Se describen los procedimientos para la generación y el uso de bibliotecas combinatorias de peptidomiméticos en la técnica anterior, por ejemplo, en Ostresh, *Methods in Enzymology* 267 (1996), 220-234 y Dörner, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996), 709-715. Además, se puede utilizar una estructura tridimensional y/o cristalográfica del polipéptido de la divulgación para el diseño de los inhibidores de los peptidomiméticos inhibidores de la actividad biológica del polipéptido de la divulgación (Rose, *Biochemistry* 35 (1996), 12933-12944; Rutenber, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996), 1545-1558).

[0090] Se describe además el diseño basado en la estructura y la síntesis de moléculas sintéticas de bajo peso molecular que imitan la actividad del polipéptido biológico natural en, por ejemplo, Dowd, *Nature Biotechnol.* 16 (1998), 190-195; Kieber-Emmons, *Current Opinion Biotechnol.* 8 (1997), 435-441; Moore, *Proc. West Pharmacol. Soc.* 40 (1997), 115-119; Mathews, *Proc. West Pharmacol. Soc.* 40 (1997), 121-125; Mukhija, *European J. Biochem.* 254 (1998), 433-438.

[0091] Análogamente, las personas expertas en la técnica saben bien que es posible diseñar, sintetizar y evaluar miméticos de compuestos orgánicos pequeños que, por ejemplo, pueden actuar como sustrato o ligando de la LOX/LOXL activa o del polipéptido relacionado. Por ejemplo, se ha descrito que la D-glucosa mimética de hapalosina presenta una eficacia similar a la de la hapalosina en proteínas antagonizantes asociadas a la asistencia de la resistencia multifármacos relativa a la citotoxicidad; véase Dinh, *J. Med. Chem.* 41 (1998), 981-987.

[0092] Los inhibidores dados a conocer en el presente documento, tales como anticuerpos, pueden unirse a LOX/LOXL y pueden ser inhibidores competitivos o inhibidores no competitivos. Con respecto a la inhibición competitiva, un inhibidor comporta normalmente una similitud estructural con el sustrato. La inhibición será perceptible a bajas concentraciones de sustrato, pero puede ser superada a elevadas concentraciones del sustrato. Con respecto a la inhibición no competitiva, un inhibidor se une en el sitio que queda disponible después que el sustrato se ha unido en el sitio activo. La inhibición será más perceptible a una elevada concentración del sustrato. Con respecto a la inhibición no competitiva, un inhibidor se une en el sitio lejos del sitio de unión del sustrato y una inhibición relativa será generalmente la misma en todas las concentraciones del sustrato. En una realización, un anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión, descritos en el presente documento, se une específicamente a la LOX O LOXL2 de longitud completa y procesada. En un aspecto, la LOX o LOXL2 de longitud completa y procesada son formas activas de la enzima.

55

3. Anticuerpos contra LOX/LOXL

[0093] Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" significa un agente de unión aislado o recombinante que comprende las secuencias de la región variable necesarias para unirse específicamente a un

epítipo antigénico. De este modo, un anticuerpo es cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que presenta la actividad biológica deseada, *por ejemplo*, la unión con el antígeno diana específico. De esta manera, se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, 5 anticuerpos quiméricos, nanocuerpos, diacuerpos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y los fragmentos de anticuerpos que incluyen, pero no se limitan a scFv, Fab, y Fab₂, siempre que presenten la actividad biológica deseada. El término “anticuerpo humano” se refiere por tanto a los anticuerpos que contienen secuencias de origen humano, excepto para posibles regiones de CDR no humanas, y no implica que la estructura completa de una molécula de Ig esté presente solo que el anticuerpo tiene mínimo efecto inmunogénico 10 en un ser humano.

[0094] “Fragmentos de anticuerpo” comprende una porción de un anticuerpo intacto, por ejemplo, la unión con el antígeno o la región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata y col., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)); 15 moléculas de anticuerpos de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. La digestión con la papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, denominados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento “Fc” residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina da como resultado un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con antígeno que son aún capaces de la reticulación del 20 antígeno.

[0095] “Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de 25 cadena ligera, en una estrecha asociación, no covalente. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero V_H-V_L. En conjunto, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (de la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad inferior que el sitio de unión completo.

[0096] El fragmento “Fab” contiene también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH₁) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi del dominio CH₁ de la cadena pesada que incluyen una o más cisteínas procedentes de la 30 región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en la que el(los) resto(s) de cisteína del dominio constante soportan un grupo tiol. Los fragmentos del anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellas. Se conocen también otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpo.

[0097] Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno o dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basándose en las secuencias de 40 aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, se pueden asignar inmunoglobulinas a diferentes tipos. Existen cinco tipos principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, y algunas de estas pueden dividirse adicionalmente en subtipos (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2.

[0098] Los fragmentos de anticuerpos “sFv” o “Fv de cadena única” comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L, que permite que el sFv conforme la estructura deseada de unión al antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun en The 45 Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-50 315 (1994).

[0099] El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la 55 cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

[0100] Un anticuerpo “aislado” es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un

componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos y no proteínicos. En algunas realizaciones, el anticuerpo estará purificado (1) en más de un 95% en peso del anticuerpo tal como se ha determinado mediante el procedimiento de Lowry, por ejemplo, más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos n terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones de reducción o sin reducción utilizando la tinción del azul de Coomassie o la tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ en el interior de células recombinantes debido a que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará en al menos una etapa de purificación.

[0101] En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido contra LOX/LOXL es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas o fragmentos de inmunoglobulinas de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) que contienen la secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales, los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor están sustituidos por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos ejemplos, los restos marco de Fv de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados pueden comprender también restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o el marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones de la CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana.

[0102] El anticuerpo humanizado comprenderá también óptimamente al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana (Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332: 323-329(1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992)).

[0103] Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en el mismo procedentes de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo restos "de importación" o "donantes", que se capturan normalmente procedentes de un dominio variable "de importación" o "donante". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., *Nature*, 321:522 525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332:323 327 (1988)); Verhoeyen y col. *Science*, 239:1534 1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de las CDR de roedores o de las CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con esto, dichos anticuerpos "humanizados" incluyen anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos restos del FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

[0104] Se pueden producir también anticuerpos humanos utilizando diversas técnicas conocidas en la materia, que incluyen las bibliotecas de expresión en fago (Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)). Están también disponibles las técnicas de Cole y col. y de Boerner y col., para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner y col., *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991)). De forma similar, se pueden realizar anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de la inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Tras el estímulo, se observó la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja estrechamente a la que se observa en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la redistribución de los genes, en ensamblaje, y el repertorio de anticuerpos. Se describe esta solución, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos N°s 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks y col., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg y col., *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812 13 (1994); Fishwald y col., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

[0105] Se pueden hacer madurar los anticuerpos también mediante afinidad utilizando procedimientos de selección y/o mutagénesis conocidos tal como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, los anticuerpos madurados mediante afinidad tienen una afinidad que es cinco veces, más de diez veces, más de veinte veces, o incluso más de treinta veces mayor que la del anticuerpo de partida (generalmente de murino, conejo, pollo, 5 humanizado o humano) a partir de la cual se prepara el anticuerpo madurado.

[0106] El anticuerpo dirigido contra LOXL2 puede ser también un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, y pueden ser anticuerpos tanto de origen humano como humanizados que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de 10 unión es para LOXL2, la otra es para cualquier otro antígeno, por ejemplo, para una proteína superficial celular o receptor o subunidad del receptor.

[0107] El anticuerpo dirigido contra LOXL2 puede ser también un inmunoconjugado. Dichos inmunoconjugados comprenden un anticuerpo dirigido contra LOXL2 conjugado con un agente citotóxico, tal como un agente 15 quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de bacterias, hongos, plantas o de origen animal, o uno de sus fragmentos), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

[0108] Un anticuerpo que se “une específicamente a” o es “específico de” un polipéptido o un epítipo particulares en un polipéptido particular es aquel que se une al polipéptido o epítipo particulares en un polipéptido particular sin 20 unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo del polipéptido. En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente divulgación se une específicamente a una LOXL2 humana con una constante de disociación K_d igual a o menor de 100 nM, opcionalmente menor de 10 nM, opcionalmente menor de 1 nM, opcionalmente menor de 0,5 nM, opcionalmente menor de 0,1 nM, opcionalmente menor de 0,01 nM, u opcionalmente menor de 0,005 nM, en la forma de un anticuerpo monoclonal, scFv, Fab, u otra forma de anticuerpo medida a una temperatura de 25 aproximadamente 4°C, 25 °C, 37°C o 42 °C.

[0109] Opcionalmente, el anticuerpo de la presente divulgación se une a uno o más sitios de escisión proteolítica de LOXL2, tales como el sitio de escisión para el procesamiento de una forma madura de LOXL2, bloqueando por 30 tanto eficazmente el procesamiento de LOXL2 para reducir el nivel de la LOXL2 activa.

[0110] Opcionalmente, el anticuerpo de la presente divulgación se une específica y selectivamente a la forma de longitud completa de LOXL2, con una mayor afinidad de unión, por ejemplo, al menos 10 veces, al menos 100 veces, o incluso al menos 1000 veces más, que la afinidad de unión con la preproteína de la LOXL2 humana, la LOXL2 humana madura o procesada, véanse Molnar y col. (2003) Biochim Biophys. Acta. 1647: 220-224; Csiszar, 35 Prog. Nucl. Acid Res. 70: 1-32 (2001); y el documento WO 01/83702 publicado el 8 de noviembre de 2001).

[0111] Opcionalmente, el anticuerpo de la presente divulgación se une específica y selectivamente a la forma madura o procesada de LOXL2, con una mayor afinidad de unión, por ejemplo, al menos 10 veces, al menos 100 veces, o incluso al menos 1000 veces más, que la afinidad de unión con la preproteína de la LOXL2 humana, la 40 forma de longitud completa de la LOXL2 humana, véase Molnar y col. (2003) Biochim Biophys. Acta. 1647: 220-224).

[0112] En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo en una región de la HLOX seleccionada entre las SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 11 o 16. 45

[0113] Opcionalmente, el anticuerpo de la presente divulgación no se une solamente a LOXL2 sino que reduce o inhibe también la actividad enzimática de la lisil oxidasa de LOXL2. Se cree que dicho anticuerpo reduciría la EMT y de esta manera es útil para las aplicaciones dadas a conocer en el presente documento.

50 **[0114]** Se llevó a cabo la unión de LOXL2 con otras proteínas, tales como receptores celulares (por ejemplo, receptor de captación de la integrina beta I), BTK (agammaglobulinemia por tirosina cinasa de Bruton), u otras integrinas, utilizando el ensayo anteriormente mencionado, en el que en vez de proteínas ECM se utilizan receptores celulares) BTK (agammaglobulinemia por tirosina cinasa de Bruton) o se utilizan otras integrinas.

55 **[0115]** Los anticuerpos LOXL2 que inhiben la unión de LOXL2 con proteínas ECM, receptores celulares, e integrinas, se seleccionan como candidatos para desarrollo adicional.

[0116] Las enzimas LOX/LOXL actúan mediante un mecanismo de ping-pong que se puede describir mediante la dinámica de Michaelis-Menten (**FIGURA 41**). Los anticuerpos LOX/LOXL de la presente divulgación pueden ser

inhibidores competitivos, inhibidores anticompetitivos o inhibidores no competitivos de LOX/LOXL. El mecanismo de acción de los anticuerpos que actúan como inhibidores competitivos, inhibidores anticompetitivos e inhibidores no competitivo se ilustra en la **FIGURA 42**. Con respecto a la inhibición competitiva, un inhibidor comparte usualmente una similitud estructural con el sustrato. La inhibición será perceptible a bajas concentraciones del sustrato, pero se puede superar a elevadas concentraciones del sustrato. Con respecto a la inhibición no competitiva, un inhibidor se une en el sitio que queda disponible después que el sustrato se une en el sitio activo, un inhibidor se une en el sitio lejos del sitio de unión al sustrato. La inhibición relativa será generalmente la misma en todas las concentraciones de sustrato. De esta manera, los inhibidores pueden ser anticuerpos dirigidos contra LOXL2, que son inhibidores competitivos, inhibidores anticompetitivos o inhibidores no competitivos (**FIGURA 43**).

4. Polinucleótidos que se dirigen a LOXL2

[0117] Los inhibidores de los niveles o de la actividad de LOXL2 pueden verse afectados cuando se utiliza un polinucleótido de sentido contrario capaz de hibridarse específicamente con un transcrito de ARNm que codifica LOXL2.

[0118] Opcionalmente, los inhibidores de polinucleótidos de la presente divulgación pueden reducir o inhibir la captación o la internalización de LOXL2. Se cree que dicho inhibidor de polinucleótidos podría reducir la EMT y de esta manera es útil para las aplicaciones dadas a conocer en el presente documento.

[0119] Opcionalmente, los inhibidores de polinucleótidos de la presente invención pueden reducir o inhibir la actividad enzimática de la lisil oxidasa de LOXL2. Se cree que dicho inhibidor de polinucleótidos podría reducir la EMT y de esta manera es útil en las aplicaciones dadas a conocer en el presente documento.

[0120] El diseño de moléculas de sentido contrario que se pueden utilizar para regular por defecto eficazmente LOXL2 se ve afectado normalmente si se consideran a la vez los factores de los dos aspectos utilizados en la solución de sentido contrario. El primer aspecto es la administración del oligonucleótido en el citoplasma de las células adecuadas, mientras que el segundo aspecto es el diseño de un oligonucleótido que se une específicamente con el ARNm designado en el interior de las células de tal manera que inhibe su traducción.

[0121] Se tienen en cuenta normalmente algunas consideraciones cuando se diseñan oligonucleótidos de sentido contrario. Para la inhibición eficaz *in vivo* de la expresión génica utilizando oligonucleótidos o análogos de sentido contrario, los oligonucleótidos o análogos cumplen los siguientes requerimientos (i) suficiente especificidad en la unión a la secuencia diana, (ii) solubilidad en agua, (iii) estabilidad frente a las nucleasas intra y extracelulares, (iv) capacidad de penetración a través de la membrana celular, y (v) cuando se usa para tratar un organismo, baja toxicidad. Se encuentran disponibles algoritmos para identificar aquellas secuencias con la afinidad de unión prevista más elevada por su ARNm diana basándose en un ciclo termodinámico que tiene en cuenta la energía de las alteraciones estructurales en el ARNm diana y el oligonucleótido, por ejemplo, tal como se describe en Walton y col. *Biotechnol Bioeng* 65:1-9 (1999).

[0122] Dichos algoritmos se han utilizado satisfactoriamente para implementar una solución de sentido contrario en las células. Por ejemplo, el algoritmo desarrollado por Walton y col. permitió a los científicos diseñar de forma satisfactoria oligonucleótidos de sentido contrario para los transcritos de β -globina de conejo (RGB) y factor α de necrosis tumoral (TNF α). El mismo grupo de investigación ha notificado también que la actividad de sentido contrario de los oligonucleótidos seleccionados razonadamente frente a tres modelos de ARNm diana (lactato deshidrogenasa A y B humanas y gp 130 de rata) en cultivos celulares, tal como se ha evaluado mediante una técnica cinética de la PCR que ha demostrado ser eficaz en casi todos los casos, incluyendo los ensayos frente a tres diferentes dianas en dos tipos de células con las químicas de oligonucleótidos de fosfodiéster y fosforotioato.

[0123] Además, se han publicado también algunas soluciones para diseñar y prever la eficacia de oligonucleótidos específicos utilizando un sistema *in vitro* (Matveeva y col., *Nature Biotechnology* 16: 1374-1375 (1998)).

[0124] Una molécula de sentido contrario que se puede utilizar con la presente divulgación incluye un polinucleótido o un análogo de polinucleótido de al menos 10 bases, por ejemplo, entre 10 y 15, entre 15 y 20 bases, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 22, al menos 25, al menos 30, o incluso al menos 40 bases que son hibridables *in vivo*, en condiciones fisiológicas, con una porción de una cadena de polinucleótido que codifica un polipéptido al menos un 50% homólogo con la SEQ ID NO: 1, 4, 5, o 7 o al menos un 75% homólogo con una de sus porciones del extremo N tal como se ha determinado utilizando el software BestFit del paquete de análisis de secuencias Wisconsin, utilizando el algoritmo de Smith y Waterman, en el que la penalización por

creación de huecos es igual a 8 y la penalización por extensión de huecos es igual a 2.

[0125] Los oligonucleótidos de sentido contrario utilizados en la presente divulgación se pueden expresar a partir de una construcción de ácidos nucleicos administrada en el tejido, en cuyo caso se pueden utilizar promotores inducibles de tal manera se puede activar e inactivar la expresión de sentido contrario, o, de forma alternativa, dichos oligonucleótidos se pueden sintetizar químicamente y administrarse directamente en el tejido, como parte de, por ejemplo, una composición farmacéutica.

[0126] La capacidad de sintetizar químicamente oligonucleótidos y sus análogos que tienen una secuencia predeterminada seleccionada ofrece medios para modular por defecto la expresión génica. Se pueden considerar cuatro tipos de estrategias de modulación de la expresión génica.

[0127] Al nivel de la transcripción, los oligonucleótidos de sentido contrario o de sentido directo o los análogos que se unen al ADN genómico mediante el desplazamiento de la cadena o la formación de una triple hélice, puede evitar la transcripción. Al nivel del transcrito, los oligonucleótidos o análogos de sentido contrario que se unen a las moléculas de ARNm diana conducen a la escisión enzimática del híbrido mediante la ARNasa H intracelular. En este caso, hibridando con el ARNm diana, los oligonucleótidos o análogos de oligonucleótidos proporcionan un híbrido duplete reconocido y destruido por la enzima ARNasa H. de forma alternativa, dicha formación del híbrido puede conducir a una interferencia con el corte y empalme correctos. Como resultado, en ambos casos, el número de transcritos intactos del ARNm diana listos para la traducción se reduce o elimina.

[0128] Al nivel de la traducción, los oligonucleótidos o análogos de sentido contrario que se unen a las moléculas de ARNm evitan, mediante impedimento estérico, la unión de los factores de traducción esenciales (ribosomas), al ARNm diana, un fenómeno conocido en la técnica como detención de la hibridación, inactivando la traducción de dichos ARNm.

[0129] Los oligonucleótidos no modificados son normalmente poco prácticos para el uso como secuencias de sentido contrario debido a que tienen cortas semividas *in vivo*, durante las cuales son degradados rápidamente por las nucleasas. Además, son a menudo difíciles de preparar en cantidades mayores de los miligramos. Adicionalmente, dichos oligonucleótidos son normalmente malos penetradores de la membrana celular. De esta manera, los análogos de oligonucleótidos se diseñan normalmente de manera adecuada.

[0130] Por ejemplo, surgen problemas relacionados con el reconocimiento del ADN bicatenario (ADNds) debido a que se ha disminuido la formación de una triple hélice mediante un enlace químico "que se ha vuelto cambiar" de manera inteligente, en el que se ha reconocido una secuencia de polipurina en una cadena, y "se ha vuelto a cambiar" una secuencia de homopurina en la otra cadena que se puede reconocer. También, se ha obtenido una buena formación de la hélice utilizando bases artificiales, mejorando por tanto las condiciones de unión con respecto a la fuerza iónica y el pH.

[0131] Se pueden utilizar también oligonucleótidos de ARN para la inhibición de sentido contrario ya que forman un duplete ARN-ARN con la diana, lo que sugiere una eficaz inhibición. Sin embargo, debido a su baja estabilidad, los oligonucleótidos de ARN se expresan normalmente en el interior de las células utilizando vectores diseñados para este fin. Se puede utilizar esta solución cuando se intenta dirigir un ARNm que codifica una proteína abundante y duradera.

[0132] Se pueden utilizar oligonucleótidos terapéuticos de sentido contrario para tratar muchas enfermedades potencialmente fatales con numerosas ventajas sobre los fármacos tradicionales. Los fármacos tradicionales intervienen normalmente después de la formación de una proteína que produce una enfermedad. Los oligonucleótidos terapéuticos de sentido contrario, sin embargo, pueden bloquear la transcripción/traducción del ARNm e intervenir antes de que se haya formado la proteína, y como los oligonucleótidos terapéuticos de sentido contrario se dirigen solamente a un ARNm específico, pueden ser más eficaces con menos efectos secundarios que los tratamientos actuales de inhibición de la proteína.

[0133] Algunos ensayos químicos han demostrado seguridad, factibilidad y actividad de oligonucleótidos de sentido contrario. Por ejemplo, se han utilizado con éxito oligonucleótidos de sentido contrario adecuados para el tratamiento del cáncer (Holmund y col. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1: 372-385 (1999)), mientras que el tratamiento de neoplasias hematológicas mediante oligonucleótidos de sentido contrario dirigidos contra el gen *c-myc*, *p53* y *Bcl-2* se introdujeron en ensayos clínicos y se ha demostrado que son tolerados por los pacientes (Gerwitz, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1: 297-306 (1999)).

[0134] De forma más reciente, se ha notificado la supresión mediada por oligonucleótidos de sentido contrario de la expresión del gen de la heparanasa humana para inhibir la diseminación pleural de células cancerosas humanas en un modelo de ratón (Uno y col., *Cancer Res* 61: 7855-60 (2001)).

5

[0135] La FDA ha aprobado recientemente el primer fármaco de sentido contrario. El fármaco, Fomivirsen, ha sido desarrollado por Isis, y está indicado para el tratamiento local del citomegalovirus en pacientes con SIDA que son intolerantes a o que tienen una contraindicación a otros tratamientos para la retinitis por CMV que fueron insuficientemente sensibles a tratamientos anteriores para la retinitis por CMV (Pharmacotherapy News Network).

10

[0136] De esta manera, el consenso actual es que los desarrollos en el campo de la tecnología de sentido contrario que, tal como se ha descrito anteriormente, han conducido a la generación de algoritmos de diseño de sentido contrario muy precisos y a una amplia variedad de sistemas de administración de oligonucleótidos, permite a un técnico normalmente experto diseñar e implementar soluciones de sentido contrario adecuadas para la regulación por defecto de la expresión de secuencias conocidas sin tener que recurrir a ensayos innecesarios y a errores de experimentación.

15

[0137] Otro mecanismo para inhibir LOXL2 es la interferencia del ARN (ARNi), una solución que utiliza moléculas de ARNs interferente pequeño (ARNip o ARN de horquilla pequeña, shARN) que son homólogas respecto del ARN diana y conducen a su degradación (Carthew, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13: 244-248 (2001)). Por ejemplo, la infección de diversos tipos de células cancerosas con la expresión de un shARN específico de LOXL2 es eficaz para alterar su morfología y capacidad de invasión.

20

[0138] La interferencia del ARN es normalmente un proceso en dos etapas. En la primera etapa, que se denomina etapa de inicio, el ARNs que entra se digiere en ARN interferentes pequeños (ARNip) de 21-23 nucleótidos (nt), probablemente debido a la acción de Dicer, un miembro de la familia de la ARNasa II de las ribonucleasa específicas de ARNs, que procesa (escinde) el ARNs (introducido directamente o mediante un transgén o un virus) de una manera dependiente de ATP. Sucesivos episodios de escisión degradan el ARN a dupletes de 19-21 pb (ARNip), cada uno con salientes 3' de 2 nucleótidos (Hutvagner y Zamore, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 225-232 (2002); Bernstein, *Nature* 409: 363-366 (2001)).

30

[0139] En la etapa efectora, los dupletes de ARNip se unen a un complejo de la nucleasa para formar el complejo silenciador inducido por el ARN (RISC). Se requiere un desenrollamiento del duplete de ARNip dependiente de ATP para la activación del RISC. A continuación, el RISC activo dirige el transcrito homólogo mediante interacciones de emparejamiento de bases y escinde normalmente el ARNm en aproximadamente 12 fragmentos de nucleótidos a partir del extremo 3' del ARNip (Hutvagner y Zamore, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 225-232 (2002); Hammond y col., *Nat. Rev. Gen.* 2: 110-119 (2001); Sharp, *Genes. Dev.* 15: 485-490 (2001)). Aunque el mecanismo de escisión está todavía por elucidar, la investigación indica que cada RISC contiene un único ARNip y una ARNasa (Hutvagner y Zamore, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 225-232 (2002)).

40

[0140] Debido a la remarcable potencia del ARNi, se ha sugerido una etapa de amplificación en la ruta del ARNi. La amplificación se produciría copiando los ARNs que entran, lo que podría generar más ARNip, o mediante replicación de los ARNip formados. Alternativamente o de forma adicional, la amplificación podría efectuarse mediante múltiples episodios de renovación del RISC (Hutvagner and Zamore, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 225-232 (2002); Hammond y col., *Nat. Rev. Gen.* 2: 110-119 (2001); Sharp, *Genes. Dev.* 15: 485-490 (2001)). Se ha descrito también un ARNi en Tuschl, *Chem. Biochem.* 2: 239-245 (2001); Cullen, *Nat. Immunol.* 3: 597-599 (2002); y Brantl, *Biochem. Biophys. Act.* 1575: 15-25 (2002).

45

[0141] La síntesis de moléculas de ARNi adecuadas para el uso con la presente divulgación, se puede llevar a cabo de la siguiente forma. En primer lugar, la secuencia de ARNm de LOX o LOXL se escanea en la dirección 3' del codón de inicio AUG para las secuencias de dinucleótidos AA. La incidencia de cada AA y de 19 nucleótidos 3' adyacentes se registra como potenciales sitios diana del ARNip. Los sitios diana del ARNip se seleccionan entre el marco de lectura abierto, ya que las regiones no traducidas (UTR) son más ricas en sitios de unión a la proteína reguladora. Las proteínas de unión a UTR y los complejos de inicio de la traducción pueden interferir con la unión del complejo de la endonucleasa del ARNip (Tuschl, *Chem. Biochem.* 2: 239-245 (2001)). Se apreciará empero, que los ARNip dirigidos a regiones no traducidas pueden ser también eficaces, tal como se ha demostrado para GAPDH, en el que el ARNip dirigido a las 5UTR medió aproximadamente un 90% de la disminución en el ARNm del GAPDH celular y suprimió el nivel de la proteína (www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html). En segundo lugar, los sitios diana potenciales se compararon con una base de datos genómica adecuada (por ejemplo, de seres humanos, ratón, rata,

55

etc) utilizando cualquier software de alineación de secuencias, tal como el software BLAST, disponible en el servidor de la NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Se filtraron los posibles sitios diana que presentaban una homología significativa con otras secuencias de codificación.

5 **[0142]** Se seleccionaron las secuencias diana calificadas como moldes para la síntesis del ARNip. Las secuencias seleccionadas pueden incluir aquellas con un bajo contenido en G/C ya que estas han demostrado ser más eficaces en la mediación del silenciamiento del gen en comparación con las que poseen un contenido de G/C mayor del 55%. Se pueden seleccionar algunos sitios diana junto con la longitud del gen diana para la evaluación. Para una mejor evaluación de los ARNip seleccionados, se utilizó conjuntamente un control negativo. El ARNip del control negativo
10 puede incluir la misma composición de nucleótidos que los ARNip pero carece de una homología significativa para el genoma. De esta manera, se puede utilizar una secuencia de nucleótidos mezclada del ARNip, con la condición de que no presente ninguna homología significativa con cualquier otro gen.

[0143] Las moléculas de ARNip de la presente divulgación se pueden transcribir a partir de vectores de expresión
15 que pueden facilitar la expresión estable de los transcritos de ARNip una vez introducidos en una célula hospedadora. Estos vectores se diseñan mediante ingeniería genética para expresar los shARN, que se procesan *in vivo* en moléculas de ARNip capaces de llevar a cabo el silenciamiento específico del gen (Brummelkamp y col., *Science* 296: 550-553 (2002); Paddison y col., *Genes Dev.* 16: 948-958 (2002); Paul y col., *Nature Biotech.* 20: 505-508 (2002); Yu y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6047-6052(2002)).

20 **[0144]** Los shARN son polinucleótidos monocatenarios con una estructura de tallo en horquilla. El polinucleótido monocatenario tiene un segmento de lazo que se une al extremo 3' de la cadena en la región bicatenaria y al extremo 5' de la otra cadena en la región bicatenaria. La región bicatenaria está formada a partir de una primera secuencia que se puede hibridar con una secuencia diana, tal como un polinucleótido que codifica LOX o LOXL, o
25 un ARNm de LOX o LOXL, y una segunda secuencia que es complementaria de la primera secuencia, de esta manera, la primera y la segunda secuencia forman una región bicatenaria a la cual conectan los extremos de la secuencia de unión para formar la estructura de lazo de horquilla. La primera secuencia se puede hibridar a cualquier porción de un polinucleótido que codifica LOX/LOXL. El dominio del tallo bicatenario del shARN comprende un sitio de la endonucleasa de restricción.

30 **[0145]** La estructura de tallo-lazo de los shARN puede tener nucleótidos salientes opcionales, tales como salientes de 2 pb, por ejemplo, salientes 3'UU. Aunque puede existir variación, los tallos varían normalmente de aproximadamente 15 a 49, aproximadamente 15 a 35, aproximadamente 19 a 35, aproximadamente 21 a 31 pb, o
35 aproximadamente 21 a 29 pb, y los lazos pueden oscilar desde aproximadamente 4 a 30 pb, por ejemplo, aproximadamente 4 a 23 pb.

[0146] Para la expresión de los shARN en las células, se pueden emplear vectores plásmidos que contienen tanto la polimerasa III H1-ARN o el promotor U6, un sitio de clonación para la inserción del ARN de tallo-lazo, y 4 señales de terminación de la transcripción de. Los promotores de la polimerasa III tienen sitios de inicio y detención bien
40 definidos y sus transcritos carecen de colas poli(A). La señal de terminación para estos promotores se define en el tracto de la politimidina, y el transcrito se escinde normalmente después de la segunda uridina. La escisión en esta posición genera un saliente 3'UU en el shARN expresado, que es similar a los salientes 3' de los ARNip sintéticos. Se describen procedimientos adicionales para expresar el shARN en células de mamíferos en las referencias citadas anteriormente.

45 **[0147]** Un ejemplo de un vector de expresión adecuado es el pSUPERTM, que incluye el promotor del gen de la polimerasa III H1-ARN con un inicio de la transcripción bien definido y una señal de terminación que consiste en cinco timidinas en una hilera (T5) (Brummelkamp y col., *Science* 296: 550-553 (2002)). La escisión del transcrito en el sitio de terminación se ubica en el sitio tras la segunda uridina, dando como resultado de esta manera un
50 transcrito que se asemeja a los extremos de los ARNip sintéticos, que contienen también nucleótidos salientes. El ARNip se clona de tal manera que incluya la secuencia de interés, es decir LOX o LOXL separados por separador corto del complemento inverso de la misma secuencia. El transcrito resultante se repliega sobre sí mismo para formar una estructura de tallo-lazo, que media en el ARNi de LOX o LOXL.

55 **[0148]** Otro vector de expresión de ARNip adecuado codifica el ARNip de sentido directo y sentido contrario bajo la regulación de los promotores pol III (Miyagishi y Taira, *Nature Biotech.* 20: 497-500 (2002)). El ARNip generado por este vector incluye también una señal de terminación de cinco timidinas (T5).

[0149] Debido a que las soluciones para introducir ARNip sintético en células mediante lipofección pueden dar

como resultado bajas eficacias de transfección en algunos tipos de células y/o persistencia a corto plazo de los efectos de silenciamiento, se han desarrollado procedimientos mediados por vectores.

- [0150]** De esta manera, las moléculas de ARNi utilizadas por la presente divulgación pueden administrarse en la célula utilizando retrovirus. La administración de ARNi utilizando retrovirus proporciona algunas ventajas sobre procedimientos tales como la lipofección, debido a que la administración retroviral es normalmente más eficaz, uniforme y selecciona de forma inmediata células "silenciadas" estables (Devroe y Silver, BMC Biotechnol. 2: 15 (2002)).
- 10 **[0151]** Recientes publicaciones científicas han validado la eficacia de dichas moléculas cortas de ARN bicatenario en la inhibición de la expresión del ARNm diana y de esta manera, han demostrado con claridad el potencial terapéutico de dichas moléculas. Por ejemplo, se ha utilizado el ARNi para inhibir la expresión de la hepatitis C (McCaffrey y col., Nature 418: 38-39 (2002)), VIH-1 (Jacque y col., Nature 418: 435-438 (2002)), células de cáncer de cuello de útero (Jiang y Milner, Oncogene 21:6041-6048 (2002)) y células leucémicas (Wilda y col., Oncogene 21, 15 5716-5724 (2002)).

5. Agentes antineoplásicos o antifibróticos

- [0152]** De acuerdo con la presente divulgación, se puede combinar un inhibidor de LOXL2 con un agente quimioterapéutico para sensibilizar las células tumorales (por ejemplo, transición desde el estado de EMT al estado de MET) al agente quimioterapéutico, evitando o inhibiendo no solo de esta manera la invasión y la metástasis tumoral sino inhibiendo también el crecimiento del tumor primario.

- [0153]** Tal como se usa en el presente documento, el término "agente quimioterapéutico" o "quimioterapéutico" (o "quimioterapia", en el caso del tratamiento con un agente quimioterapéutico) se entiende que abarca cualquier compuesto químico no proteínico (es decir, no peptídico) útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™; alquil sulfonamida, tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carbocina, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, 30 trietilfosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (por ejemplo, bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (que incluye un análogo sintético de topotecan); briostatina; calistatina; CC-1065 (que incluye su adozelesina, carzelesina y análogos sintéticos de bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clomafazina, colofosfamida, 35 estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas Tales como carmustina, clorozotocina, foremustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo caliceamicina, de forma especial caliceamicina gamma11 y caliceamicina phil1, véase, por ejemplo, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así 40 como el cromóforo neocarzinostatina y los cromóforos relacionados con el antibiótico de cromoproteína enedina), aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabina, carminocina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (Adramycin™) (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolinodoxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y 45 desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como demopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiapiquina, tioguanina; análogos de 50 pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitiostano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico tal como ácido froilínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatrexato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una 55 epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguantrona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK™; razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (por ejemplo, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; citosina arabinoside ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL™, Bristol Meyers Squibb

Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (TAXOTERE™, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (Gemzar™); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (Navelbine™); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeoloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Se incluyen también en la definición de "agente quimioterapéutico" los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas en los tumores tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM), que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo Nolvadex™), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston™); inhibidores de la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglucetimidida, acetato de megestrol (Megace™), exemestano, formestano, fadrozol, vorozol (Rivisor™), letrozol (Femara™), y anastrozol (Arimidex™); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolído, y goserelina; y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

[0154] En algunas realizaciones, el agente antineoplásico en combinación con el modulador de LOX/LOXL es un inhibidor de la tirosina cinasa. Por ejemplo, ZD1839 (Iressa™ de AstraZeneca K.K.) muestra un efecto competitivo para el ATP en un sitio de unión a ATP de la tirosina cinasa del EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), e inhibe la actividad de la tirosina cinasa inhibiendo la autofosforilación de la tirosina cinasa.

[0155] Como resultado, el efecto anticanceroso se expresa bloqueando la transducción de la señal que suministra EGFR (ligandos tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) se unen al dominio extracelular de EGFR, seguido por la activación de la tirosina cinasa de EGFR en el dominio intracelular, lo que da lugar no solo a la autofosforilación de EGFR sino también a la fosforilación de diversas proteínas diana intracelulares, transduciéndose a continuación las señales de proliferación procedentes de la superficie de células cancerosas al núcleo, lo que da como resultado la proliferación, infiltración, metástasis, y angiogénesis de las células cancerosas.

[0156] IMC-C225 o cetuximab (Erbix™, que es un anticuerpo monoclonal dirigido contra EGFR) reconoce la parte del receptor de EGFR sobre una superficie de la membrana celular e inhibe la autofosforilación de EGFR inhibiendo por tanto la actividad de la tirosina cinasa. Herceptina, un anticuerpo monoclonal dirigido contra Her2/Neu que es homólogo a EGFR, y mesilato de imatinib (GLEEVEC™, anteriormente STI-571) puede inhibir las actividades de la tirosina cinasa de BCR-Abl y c-kit (documento N° 2 no de patente). Sorafenib (Nexavar™) es un pequeño inhibidor molecular de la cinasa Raf, PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), cinasas 2 y 3 del receptor de VEGF y c-kit.

[0157] Tal como se usa en el presente documentos, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos tumorales son anticuerpos estimulados contra los antígenos expresados por los tumores y las células leucémicas, por ejemplo, antígenos específicos del tumor. El anticuerpo monoclonal incluye también anticuerpos completamente humanos y humanizados.

[0158] Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos para el tratamiento del cáncer incluyen Trastuzumab (HERCEPTIN™; La expresión en exceso de la proteína HER2 está asociada con una enfermedad más agresiva y pronóstico peor en el hospital) Rituximab (RITUXAN™) que está sensibilizado contra CD20 en células de linfoma y agota selectivamente los linfocitos B maduros y no maduros CD20⁺ normales y malignos; Alemtuzumab (CAMPATH™), un anticuerpo monoclonal que se dirige específicamente al antígeno CD52 que se encuentra en los linfocitos B y T y se utiliza para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC) y el linfoma; y Gemtuzumab zogamicina (MYLOTARG™), un anticuerpo conjugado que combina un anticuerpo específico dirigido contra CD33 con un fármaco quimioterapéutico (zogamicina) y está indicado para el tratamiento de las recaídas de la leucemia mielocítica aguda en adultos.

[0159] En otra realización, el agente antiangiogénico se combina con un inhibidor de LOX/LOXL para tratar el cáncer y otras enfermedades asociadas con la angiogénesis anormal o indeseable. Los ejemplos de agentes antiangiogénicos incluyen, pero no se limitan a, ácido retinoico y sus derivados, 2-metoxiestradiol, ANGIOSTATIN™, ENDOSTATIN™, suramina, escualamina, inhibidor tisular de la metaloproteinasa-I, inhibidor tisular de la metaloproteinasa-2, inhibidor-1 activador del plasminógeno, inhibidor-2 activador del plasminógeno, inhibidor derivado de cartílago, paclitaxel, factor 4 plaquetario, sulfato de protamina (clupeína), derivados de quitina sulfatados (preparados a partir de conchas de cangrejo reina), complejo de peptidoglicano de polisacárido sulfatado (sppg), estaurosporina, moduladores del metabolismo de la matriz, que incluyen, por ejemplo, análogos de prolina ((I-

azetidina-2-ácido carboxílico (LACA), cishidroxi prolina, d,l-3,4-deshidroprolina, tiaprolina, α -dipiridilo, β -aminopropionitrilo fumarato, 4-propil-5-(4-piridinil)-2(3h)-oxazolona; metotrexato, mitoxantrona, heparina, interferones, 2 macroglobulina-suero, chimp-3, quimostatina, tetradecasulfato de β -ciclodextrina, eponemicina; fumagilina, tiomalato de oro sodio, d-penicilamina (CDPT), beta.-1-anticolagenasa-suero, alfa.2-antiplasmina, 5 bisantreno, lobenzarit disódico, ácidon-2-carboxifenil-4-cloroantrónilico disódico o "CCA", talidomida; esteroide angiostático, carboxinaminolmidazol; inhibidores de la metaloproteinasa tales como BB94. Otros agentes antiangiogénesis incluyen anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales dirigidos contra estos factores de crecimiento angiogénicos: bFGF, aFGF, FGF-5, isoformas de VEGF, VEGF-C, HGF/SF y Ang-1/Ang-2. Ferrara N. y Alitalo, K. "Clinical application of angiogenic growth factors and their inhibitors" (1999) Nature Medicine 5: 1359-1364.

10 Otros agentes antiangiogénesis pueden incluir inhibidores de la transcripción de VEGF.

[0160] Los agentes antifibróticos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a los compuestos tales como β -aminopropionitrilo (BAPN), así como los compuestos dados a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 4.965.288 de Palfreyman, y col., otorgada el 23 de octubre de 1990, titulada "Inhibitors of lysyl oxidase, relating to inhibitors of lysyl oxidase and their use in the treatment of diseases and conditions associated with the abnormal deposition of collagen; el documento U.S. 4.997.854 de Kagan, y col., otorgada el 5 de marzo de 1991, titulada "Anti-fibrotic agents and methods for inhibiting the activity of lysyl oxidase in situ using adjacently positioned diamine analogue substrate", que se refiere a los compuestos que inhiben la LOX para el tratamiento de diversas patologías fibróticas, que se incorporan en el presente documento por referencia. Los inhibidores a modo de ejemplo 15 adicionales se describen en el documento U.S. 4.943.593 de Palfreyman, y col., otorgado el 24 de julio de 1990, titulado "Inhibitors of lysyl oxidase", que se refiere a compuestos tales como 2-isobutil-3-flúor, cloro, o bromo alilamina; así como, por ejemplo, los documentos U.S. 5.021.456; U.S. 5.5059.714; U.S. 5.120.764; U.S. 5.182.297; U.S. 5.252.608 (que se refiere a la 2-(1-naftiloximetil)-3-fluoroalilamina); y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2004/0248871, que se incorporan en el presente documento por referencia. Los agentes antifibróticos a 25 modo de ejemplo incluyen también las aminas primarias que reaccionan con el grupo carbonilo del sitio activo de las lisil oxidasas, incluyendo aquellos que producen, tras la unión con el carbonilo, un producto estabilizado por resonancia, tal como las siguientes aminas primarias: etilendiamina, hidrazina, fenilhidrazina, y sus derivados, derivados de semicarbazida, y urea, aminonitrilos, tales como β -aminopropionitrilo (BAPN), o 2-nitroetilamina, haloaminas insaturadas o saturadas, tales como 2-bromo-etilamina, 2-cloroetilamina, 2-trifluoroetilamina, 3- 30 bromopropilamina, p-halobencilaminas, selenohomocisteína lactona. En otra realización, los agentes antifibróticos son agentes quelantes de cobre, que penetran o no penetran en las células. Los compuestos a modo de ejemplo adicionales incluyen inhibidores indirectos tales como compuestos que bloquean los derivados de aldehído que se originan a partir de la desaminación oxidativa de los restos de lisilo e hidroxilisilo por las lisil oxidasas, tales como tiolaminas, por ejemplo D-penicilamina, o sus análogos tales como el ácido 2-amino-5-mercapto-5-metilhexanoico, el 35 ácido D-2-amino-3-metil-3-((2-acetamidoetil)ditio)butanoico, sulfinato de sodio-4-((p-1-dimetil-2-amino-2-carboxietil)ditio)butano, sulfanato de 2-acetamidoethyl-2-acetamidoethanetioli, sodio-4-mercaptobutanosulfinato trihidrato.

6. Formulaciones, kits y rutas de administración

40 **[0161]** Se contemplan también composiciones terapéuticas que comprenden compuestos identificados como inhibidores de LOXL2 que utilizan los procedimientos dados a conocer. En una realización, se proporciona en el presente documento una composición terapéutica para la profilaxis y el tratamiento del crecimiento del tumor metastásico, comprendiendo la composición una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de LOXL2 en una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable; en el que el inhibidor inhibe la LOXL2, en el que la cantidad del 45 inhibidor es eficaz en la prevención y el tratamiento del crecimiento tumoral metastásico que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición para profilaxis y el tratamiento del crecimiento del tumor metastásico que comprende una cantidad eficaz de un inhibidor de LOXL2 en un vehículo farmacéuticamente aceptable en combinación con radiación, cirugía, quimioterapia, o un agente biológico anticanceroso que no es el inhibidor de LOXL2.

50 **[0162]** Tal como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico que cuando se administra solo o en combinación con otro agente terapéutico a una célula, tejido, o sujeto, es eficaz para evitar o mejorar el estado de la enfermedad o la progresión de la enfermedad. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere además a la cantidad de compuesto 55 suficiente para dar como resultado la mejora de los síntomas, por ejemplo, el tratamiento, la curación, la prevención o la mejora de la dolencia médica relevante, o un incremento en la velocidad de tratamiento, la curación, la prevención o la mejora de dichas dolencias. Cuando se aplica a un principio activo individual administrado solo, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere solo a este ingrediente. Cuando se aplica a una combinación, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a cantidades combinadas de los principios activos que dan como resultado el

efecto terapéutico, tanto si se administra en combinación, en serie o de forma simultánea. Por ejemplo, cuando se emplea la administración *in vivo* de un anticuerpo dirigido contra LOXL2, las cantidades de dosificación normales pueden variar de aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más por día, por ejemplo, aproximadamente 1 µg/kg/día a 50 mg/kg/día, de forma opcional aproximadamente 100 µg/kg/día a 20 mg/kg/día, 500 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, o 1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la ruta de administración.

[0163] Los expertos en la técnica conocerán diversas composiciones y técnicas farmacéuticas para su preparación y uso a la luz de la presente divulgación. Para un listado detallado de las composiciones farmacológicas adecuadas y de las técnicas administrativas asociadas se puede hacer referencia a las enseñanzas detalladas en el presente documento, que se pueden suplementar adicionalmente por textos tales como los de Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* 20ª Ed. (Lippincott, Williams & Wilkins 2003).

[0164] Las composiciones incluyen además materiales, composiciones o vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, solvente o material encapsulante, es decir, vehículos. Estos vehículos están implicados en el transporte del compuesto químico sujeto desde un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; maltosa; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio, aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semillas de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol, y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua exenta de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico soluciones de tampón fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en las formulaciones farmacéuticas. Pueden estar también presentes en las composiciones agentes humectantes, emulsificantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de revestimiento, agentes endulzantes, agentes aromatizantes y agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes.

[0165] Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a kits para llevar a cabo la administración combinada del inhibidor de LOXL2 con el otro agente terapéutico. En una realización, el kit comprende un inhibidor de LOXL2 formulado en un vehículo farmacéutico, y al menos un agente terapéutico que no es el inhibidor de LOXL2, formulado según sea adecuado, en una o más preparaciones farmacéuticas separadas.

[0166] La formulación y los procedimientos de administración se adaptarán generalmente de acuerdo con el sitio y la enfermedad que se va a tratar. Las formulaciones a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, aquellas adecuadas para la administración parenteral, *por ejemplo*, administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, o subcutánea, que incluye formulaciones encapsuladas en micelas, liposomas, o cápsulas de liberación del fármaco (agentes activos incorporados en un revestimiento biocompatible diseñado para una liberación retardada), formulaciones ingeribles; formulaciones para uso tópico, tales como cremas, pomadas y geles; y otras formulaciones tales como inhaladores, aerosoles y pulverizadores. La dosificación de los compuestos de la divulgación variará de acuerdo con la extensión y la gravedad de la necesidad del tratamiento, la actividad de la composición administrada, el estado de salud general del sujeto, y otras consideraciones bien conocidas por los expertos en la técnica.

[0167] Los agentes que se han descrito en el presente documento se pueden incorporar a composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Dichas composiciones comprenden normalmente el agente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se pueden incorporar también compuestos activos suplementarios en las composiciones.

[0168] En otras realizaciones adicionales, los agentes descritos en el presente documento se administran localmente. La administración localizada permite la liberación del agente de forma no sistémica. Dicha administración local se puede conseguir mediante el uso de diversos dispositivos implantados médicamente que incluyen, pero no se limitan a, prótesis endovasculares y catéteres. Los procedimientos para el revestimiento, el implante, la inmersión y la unión de otra forma de los agentes deseados a dispositivos médicos tales como prótesis endovasculares y catéteres están establecidos en la técnica y se contemplan en el presente documento.

[0169] Se han utilizado prótesis endovasculares implantadas para transportar agentes médicos, tales como agentes trombolíticos. La Patente de los Estados Unidos Nº 5.163.952 da a conocer un dispositivo de tipo prótesis

endovascular plástica que se expande con memoria térmica, formulado para transportar un agente médico en el material de la propia prótesis endovascular. La patente de los Estados Unidos N° 5.92.877 da a conocer una prótesis endovascular de un material polimérico que puede tener un revestimiento asociado con la administración de los compuestos. Otras patentes que se dirigen a los dispositivos del tipo que utiliza polímeros biodegradables y bioabsorbibles incluyen la Patente de los Estados Unidos N° 4.916.193, la patente de los estados Unidos N° 4.994.071, por medio de ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 5.304.121, da a conocer un revestimiento aplicado a una prótesis endovascular que consta de un polímero de hidrogel y unos compuestos preseleccionados tales como inhibidores del crecimiento celular o heparina. Los procedimientos para preparar una prótesis endovascular revestida que transporta un material terapéutico se describen en la Patente de los estados Unidos n° 5.464.650 en la que un material de revestimiento de polímero se disuelve en un solvente y el material terapéutico se dispersa en el solvente. El solvente se evapora a continuación tras la aplicación.

[0170] La Patente de los Estados Unidos N° 6.120.536 describe tipos adicionales de revestimientos para uso con una amplia variedad de dispositivos protésicos, que incluyen prótesis endovasculares. Los ejemplos de dispositivos médicos o protésicos adicionales que pueden ser útiles con los agentes descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, dispositivos de intercambio de sangre, puertos de acceso vascular, catéteres venosos centrales, catéteres cardiovasculares, circuitos extracorpóreos, injertos vasculares, bombas, válvulas cardiacas, y suturas cardiovasculares. Con respecto a las realizaciones detalladas tal como se describe en el presente documento, no se debe considerar la aplicabilidad de la divulgación limitada con respecto al diseño del implante, la localización del implante o los materiales de construcción. El uso de dispositivos revestidos con los agentes descritos en el presente documento, que incluyen prótesis endovasculares y catéteres, permite administrar los agentes en sitios específicos o localizados. Dicha administración específica del sitio puede proporcionar un medio para el uso de dosificaciones y fármacos tales como beta-aminopropionitrilo (BAPN) y los compuestos relacionados u otros inhibidores de la amina oxidasa (tales como aquellos inhibidores de molécula pequeña de LOX/LOXL descritos anteriormente) que no son susceptibles a la administración sistémica debido a la solubilidad, problemas de toxicidad sistémica, u otras características. Por medio de ejemplo, se sabe que BAPN es útil para la inhibición de LOX, pero este compuesto es muy tóxico, presentando problemas para su uso eficaz cuando se administra sistémicamente. El uso de una prótesis endovascular, catéter, u otro dispositivo médico para la administración de un agente o compuesto activo tal como BAPN permite el uso del compuesto en dosificaciones eficaces de una manera dirigida o localizada, disminuyendo de esta manera los efectos tóxicos sistémicos asociados con dichos compuestos y las vías actuales de administración.

7. Indicaciones de la composición

[0171] Las formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente divulgación se pueden usar para tratar una amplia variedad de enfermedades.

[0172] Tal como se usa en el presente documento "prevención" incluye la profilaxis, prevención del inicio de los síntomas, prevención de la progresión de una enfermedad o trastorno asociado con fibrosis o correlacionado con la actividad de LOXL2. Tal como se usa en el presente documento, "inhibición", "tratamiento", "tratar", y "mejorar" se usan de forma indistinta y se refieren a, por ejemplo, la estasis de los síntomas, la prolongación de la supervivencia, la mejora parcial o completa de los síntomas y la erradicación parcial o completa de una dolencia, enfermedad o trastorno asociado con fibrosis o correlacionado con la actividad de LOXL2.

[0173] Se pueden administrar las composiciones a un paciente (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano o un animal no humano tal como un primate, roedor, vaca, caballo, cerdo, oveja, etc) en cantidades terapéuticamente eficaces que sean eficaces para producir un efecto terapéutico deseado mediante la inhibición de una enfermedad o trastorno tal como los descritos en el presente documento que están asociados con fibrosis o actividad de LOXL2, en una relación de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Para la administración humana de las presentes composiciones, se pueden formular las composiciones utilizando la metodología conocida por las personas normalmente expertas en la técnica. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que consigue al menos parcialmente un efecto terapéutico o profiláctico deseado en un órgano o tejido. En un ejemplo, la cantidad de un inhibidor de LOXL2 necesaria para llevar a cabo la producción y/o el tratamiento terapéutico de una enfermedad o trastorno no es fija per se. La cantidad de un inhibidor de LOXL2 administrada variará con el tipo de enfermedad o trastorno, la extensión de la enfermedad o trastorno, y el tamaño del mamífero que padece la enfermedad o trastorno.

[0174] Se consigue una respuesta cuando el paciente experimenta un alivio parcial o total, o la reducción de los signos o los síntomas de la enfermedad, e incluye de forma específica, sin limitación, la prolongación de la

supervivencia. Los tiempos esperados de supervivencia exenta de progresión se pueden medir de meses a años, dependiendo de los factores de pronóstico que incluyen el número de recaídas, la etapa de la enfermedad y otros factores. La prolongación de la supervivencia incluye, sin limitación, tiempos de al menos 1 mes, aproximadamente al menos 2 meses, aproximadamente al menos 3 meses, aproximadamente al menos 4 meses, aproximadamente al menos 6 meses, aproximadamente al menos 1 año, aproximadamente al menos 2 años, aproximadamente al menos 3 años, o más. La supervivencia global puede medirse también en meses a años. Los síntomas del paciente pueden seguir siendo estáticos o pueden disminuir.

[0175] Las indicaciones no limitantes que se pueden tratar utilizando las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen aquellas que implican proliferación celular indeseable o descontrolada. Dichas indicaciones incluyen tumores benignos, diversos tipos de cánceres tales como tumores primarios y tumores metastásicos, restenosis (por ejemplo, lesiones coronarias, de la carótida, y cerebrales), trastornos hematológicos, estimulación anormal de las células endoteliales (ateroesclerosis), lesiones en el tejido corporal debidas a cirugía, cicatrizaciones anormales de heridas, angiogénesis anormal, enfermedades que producen la fibrosis del tejido, degeneración macular, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, escleroderma, aterosclerosis, y enfermedad de Alzheimer, trastornos repetitivos del movimiento, trastornos de tejidos que no están muy vascularizados, y respuestas proliferativas asociadas con trasplantes de órganos.

[0176] Generalmente, las células de un tumor benigno retienen sus características diferenciadas y no se dividen de manera completamente incontrolada. Un tumor benigno está normalmente localizado y no es metastásico. Los tipos específicos de tumores benignos que se pueden tratar utilizando la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, hemangiomas, adenoma hepatocelular, hemangioma cavernoso, hiperplasia nodular focal, neuromas acústicos, neurofibroma, adenoma del conducto biliar, cistoma del conducto biliar, fibroma, lipomas, leiomiomas, mesoteliomas, teratomas, mixomas, hiperplasia regenerativa nodular, tracomias y granulomas piogénicos.

[0177] En una neoplasia las células se vuelven indiferenciadas, no responden a las señales de control del crecimiento del cuerpo, y se multiplican de una manera descontrolada. La neoplasia es invasiva y capaz de diseminarse a sitios distantes (metastatización). Las neoplasias se dividen generalmente en dos categorías: primarias y secundarias. Los tumores primarios surgen directamente del tejido en el que se encuentran. Un tumor secundario, o metástasis, es un tumor que se origina en cualquier parte del cuerpo pero que se ha diseminado ahora a un órgano distante. Las rutas comunes para la metástasis son el crecimiento directo en estructuras adyacentes, la diseminación a través de los sistemas vascular o linfático, y seguimiento a lo largo de los tejidos planos y los espacios corporales (fluido peritoneal, fluido cerebroespinal, etc).

[0178] Los tumores primarios y metastásicos que se pueden tratar mediante los procedimientos dados a conocer en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón (que incluye, pero no se limita a, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, carcinoma bronquioalveolar, carcinoma de células no pequeñas, carcinoma de células pequeñas, mesotelioma); cáncer de mama (que incluye, pero no se limita a, carcinoma ductal, carcinoma lobular, cáncer de mama inflamatorio, carcinoma de células claras, carcinoma mucinoso); cáncer colorrectal (que incluye, pero no se limita a, cáncer de colon, cáncer de recto); cáncer anal; cáncer de páncreas (que incluye, pero que no se limita a, adenocarcinoma de páncreas, carcinoma de islotes celulares, tumores neuroendocrinos); cáncer de próstata; carcinoma de ovario (que incluye, pero que no se limita a, carcinoma epitelial de ovario o tumor epitelial-estromal superficial que incluye tumor seroso, tumor endometriode, y cistadenocarcinoma mucinoso, tumor estromal del cordón sexual; carcinoma de hígado y conducto biliar (que incluye, pero que no se limita a, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, hemangioma); carcinoma esofágico (que incluye, pero no se limita a, adenocarcinoma esofágico y carcinoma de células escamosas); linfoma no de Hodgkin; carcinoma de vejiga, carcinoma del útero (que incluye, pero no se limita a, adenocarcinoma de endometrio, carcinoma seroso papilar uterino, carcinoma de células claras uterino, sarcomas uterinos y leiomiosarcomas, tumores mixtos mullerianos); glioma, glioblastoma, meduloblastoma, y otros tumores del cerebro; cánceres de riñón (que incluyen, pero que no se limitan a, carcinoma de células renales, carcinoma de células claras, tumor de Wilm); cáncer de cabeza y de cuello (que incluye, pero que no se limita a, carcinomas de células escamosas); carcinoma del estómago (que incluye, pero que no se limita a, adenocarcinoma de estómago, tumor estromal gastrointestinal), mieloma múltiple; cáncer de testículos, tumor de células germinales; tumor neuroendocrino; cáncer de cuello de útero; carcinoides del tracto gastrointestinal, mama, y otros órganos; y carcinoma de células en anillo de sello.

[0179] Los tumores mesenquimales pueden incluir, pero no se limitan a, sarcomas, fibrosarcomas, hemangioma, angiomatosis, hemangiopericitoma, hiperplasia estromal pseudoangiomatosa, miofibroblastoma, fibromatosis, tumor miofibroblástico inflamatorio, lipoma, angioliopoma, tumor de células granulares, neurofibroma, schwannoma,

angiosarcoma, liposarcoma, rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, leiomioma, y leiomyosarcoma.

[0180] Los tipos específicos de cánceres o neoplasias, tanto primarios como secundarios, que se pueden tratar utilizando esta divulgación incluyen también, pero no se limitan a, cáncer de piel, cáncer de hueso, cáncer de cerebro, cáncer de laringe, de vesícula biliar, de páncreas de paratiroides, de tiroides, adrenal, del tejido neural, de cabeza y cuello, de bronquios, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas de tipo ulcerante y papilar, carcinoma de piel metastásico, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, sarcoma de células reticulares, mieloma, tumor de células gigantes, tumor de pulmón de células pequeñas, cálculos biliares, tumor de islotes celulares, tumor cerebral primario, tumores linfocíticos y granulocíticos agudos y crónicos, tumor de células pilosas, adenoma, hiperplasia, carcinoma medular, feocromocitoma, neuromas mucosales, ganglioneuromas intestinales, tumor hiperplásico del nervio de la córnea, tumor de hábito marfanoide, seminoma, tumor de ovario, tumor leiomiomatoso, displasia cervical y carcinoma in situ, neuroblastoma, retinoblastoma, sarcoma de tejido blando, carcinoide maligno, lesión de la piel tóxica, micosis fungoide, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Kaposi, sarcoma osteogénico y otros, hipercalcemia maligna, tumor de células renales, policitemia verdadera, adenocarcinoma, glioblastoma multiforme, leucemias, linfomas, melanomas malignos, carcinomas epidermoides, y otros carcinomas y sarcomas.

[0181] Los trastornos hematológicos incluyen crecimiento anormal de células de la sangre que puede conducir a cambios displásicos en las células de la sangre y neoplasias malignas tales como diversas leucemias. Los ejemplos de trastornos hematológicos incluyen, pero no se limitan a, leucemia mieloide aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena crónica, los síndromes mielodisplásicos, y anemia falciforme.

[0182] La leucemia mieloide aguda (LMA) es el tipo más común de leucemia aguda que se produce en adultos. Algunos trastornos genéticos heredados y estados de inmunodeficiencia están asociados con un aumento del riesgo de LMA. Estos incluyen trastornos con defectos en la estabilidad del ADN, que conducen a la rotura cromosómica aleatoria, tales como el síndrome de Bloom, la anemia de Fanconi, síndrome familiar de Li-Frameuni, ataxia-telangiectasia, y agammaglobulinemia relacionada con X.

[0183] La leucemia promielocítica aguda (LPMA) representa un subgrupo distinto de LMA. Este subtipo está caracterizado por formas celulares inmaduras promielocíticas que contienen la translocación cromosómica 15;17. Esta translocación conduce a la generación del transcrito de fusión comprendido por el receptor del ácido retinoico y una secuencia PML.

[0184] La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una enfermedad heterogénea con distintas características clínicas que presentan diversos subtipos. Se ha demostrado que se vuelven a producir anomalías citogenéticas en la LLA. La anomalía citogenética más común es la translocación 9;22. El cromosoma Philadelphia resultante representa un pronóstico malo para el paciente.

[0185] La leucemia mielógena crónica (LMC) es un trastorno mieloproliferativo clonal de un citoblasto pluripotente. La LMC está caracterizada por una anomalía cromosómica específica que implica la translocación de los cromosomas 9 y 22, creando el cromosoma Philadelphia. La radiación ionizante está asociada con el desarrollo de la LMC.

[0186] Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son trastornos de los hemocitoblastos clonales heterogéneos agrupados debido a la presencia de cambios displásicos en uno o más de los linajes hematopoyéticos que incluyen cambios displásicos en la serie mieloide, eritroide, y megacariocítica. Estos cambios dan como resultado citopenias en uno o más de los tres linajes: Los pacientes que padecen SMD desarrollan complicaciones relacionadas con anemia, neutropenia (infecciones), o trombocitopenia (sangrado). Generalmente, de aproximadamente 10% a aproximadamente 70% de pacientes con SMD desarrollan leucemia aguda.

[0187] El tratamiento de la proliferación celular anormal debida a lesiones en el tejido corporal durante la cirugía puede ser posible para una variedad de procedimientos quirúrgicos, que incluyen la cirugía de articulaciones, la cirugía de intestino, y la cicatriz queloide. Las enfermedades que producen tejido fibrótico incluyen el enfisema. Los trastornos del movimiento repetitivos que se pueden tratar utilizando la presente divulgación incluyen el síndrome del túnel carpiano. Un ejemplo de trastornos celulares proliferativos que se pueden tratar utilizando la divulgación es un tumor óseo.

[0188] Las respuestas proliferativas asociadas con trasplante de órganos que se pueden tratar utilizando esta divulgación incluyen aquellas respuestas proliferativas que contribuyen a potenciales rechazos de órganos o complicaciones asociadas. De forma específica, se pueden producir estas respuestas proliferativas durante el

trasplante de corazón, pulmón, hígado, riñón y otros órganos o sistemas de órganos corporales.

[0189] Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden usar para la prevención o el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades que tiene la reticulación del colágeno o el aumento de la fibrosis como una parte de su etiología. Por ejemplo, la indicación para la composición puede incluir también fibrosis. La fibrosis es una acumulación anormal de tejido fibroso que se puede producir como parte del proceso de cicatrización de la herida en un tejido dañado. Dicho tejido dañado puede ser el resultado de una lesión física, inflamación, infección, exposición a toxinas, y otras causas. Los ejemplos de fibrosis incluyen la formación de la cicatriz cutánea, queloides, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar (por ejemplo, silicosis, asbestosis), fibrosis renal (que incluye nefropatía diabética), y glomeruloesclerosis. Otros ejemplos incluyen, pero no se limitan a, enfisema y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); esclerosis múltiple; asma crónica; aterosclerosis; artritis reumatoide; glaucoma; y degeneración macular relacionada con la edad (DMA húmeda y DMA seca).

Fibrosis cardiovascular

[0190] Se proporcionan composiciones, procedimientos, sistemas, dispositivos médicos y kits para el tratamiento o la prevención de la fibrosis cardiovascular o cardíaca, por ejemplo, asociada con enfermedades cardiovasculares tales como insuficiencia cardíaca congestiva, cardiomiopatía, fase posterior al infarto miocárdico, defectos en la función cardíaca, insuficiencia cardíaca hipertensiva (HHD), infarto de miocardio (IM), aterosclerosis, restenosis (por ejemplo, lesiones coronarias, de la carótida y cerebrales, y enfermedad cardíaca asociada con episodios isquémicos cardíacos).

[0191] La expresión de lisil oxidasas específicas puede estar asociada con diferentes etapas de la respuesta inflamatoria y la cicatrización de la herida tras el infarto de miocardio. Inhibiendo de forma específica la(s) lisil oxidasas(s) particular(es) asociada(s) con la respuesta fibrótica posterior, se pueden evitar las consecuencias perjudiciales de la remodelación cardíaca y de la cicatrización de la herida, permitiendo a la vez que se produzca la inmediata reparación post-IM/proceso de cicatrización.

[0192] La respuesta de cicatrización post-IM puede inducir la expresión de LOX/LOXL, pero si este proceso continúa sin control, la reticulación en exceso conduce a la remodelación de la matriz extracelular o a la fibrosis, que da como resultado la disfunción cardíaca. Los enzimas que rompen las matrices y reticulan el colágeno o la elastina parecen funcionar más lentamente o menos eficazmente y son superadas por los episodios de reticulación. Puesto que la LOX/LOXL juega también un papel en la transición epitelial-mesenquimal (EMT), esta contribuye además a la remodelación de los cardiomiocitos y a la hipertrofia de los cardiomiocitos, además de la remodelación de la matriz.

[0193] La fibrosis reparadora inicial inducida por el IM puede ser de utilidad (por ejemplo, evita aneurismas y los daños relacionados) y se puede dejar proseguir sin impedirla. Sin embargo, sin pretender quedar vinculado a teoría alguna o mecanismo de acción concretos, los inventores creen que el tratamiento dirigido contra LOXL2 iniciado tras esta fase de fibrosis reparadora podría atenuar la fibrosis reactiva (de mala adaptación) que conduce a la disfunción cardíaca. Por ejemplo, se puede iniciar el tratamiento dirigido contra LOXL2 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 16, 20, 22, 24, 36, 48 o más horas después del IM, incluyendo la totalidad de los números enteros y tiempos entre medias. De forma adicional, se puede iniciar el tratamiento dirigido contra LOXL2 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o más días después del IM. De forma similar, el aumento de la presión sanguínea (hipertensión) da como resultado un aumento de la deposición del colágeno y una reducción de la degradación de la proteína en el tejido cardíaco (Berk y col., J. Clin. Invest., 117(3): 568-575 (2007)). El tratamiento dirigido contra LOX/LOXL iniciado tras el diagnóstico y/o el establecimiento de la enfermedad cardíaca hipertensiva o hipertensión puede evitar, reducir, o mejorar la fibrosis asociada con la hipertensión. Dicho tratamiento dirigido contra LOXL2 se inicia 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más día después que se diagnostica o detecta un aumento en la hipertensión o en la tensión arterial sistémica.

[0194] En algunas realizaciones, se pueden utilizar biomarcadores para determinar cuándo se puede producir un nivel no adecuado de reticulación; los niveles de LOX han mostrado estar correlacionados con la proteína C reactiva (CRP), un biomarcador comúnmente utilizado, y el tratamiento puede comenzar cuando se elevan los niveles de CRP por encima de los niveles normales adecuados. De forma más directa, existen procedimientos y kits de ensayo para medir la liberación de los telopéptidos de colágeno reticulados en orina o sangre. Niveles elevados de estos fragmentos de colágeno pueden indicar una transición de fibrosis reparadora a reactiva (de mala adaptación). Además, se pueden realizar medidas de la función y el gasto cardíaco, que incluyen las asociadas con la contracción eficaz del ventrículo.

[0195] En algunas realizaciones, se prevé una duración limitada del tratamiento. El tratamiento debe mantenerse

solo el tiempo suficiente para evitar o atenuar la fibrosis reactiva para evitar o reducir la disfunción cardiaca. Por ejemplo, se utilizan fragmentos de anticuerpo Fab de vida corta cuando se desean duraciones de tratamiento más cortas. De forma alternativa, se pueden usar anticuerpos de longitud completa que tienen una semivida más larga en suero, con una dosificación limitada sobre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o más semanas, inclusive entre todos los días. Se pueden usar ensayos normalizados de la función cardiaca para vigilar el progreso y el ajuste de la dosificación según sea necesario, junto con la evaluación de los biomarcadores relevantes descritos anteriormente. La duración limitada del tratamiento se añade a la seguridad de esta solución.

[0196] Las indicaciones para la administración de las composiciones descritas en el presente documento incluyen también las fibrosis que se encuentra fuera de las indicaciones cardiovasculares. La fibrosis es la acumulación anormal de tejido fibroso que se puede producir como parte del proceso de cicatrización de la herida en el tejido dañado. Dicho tejido dañado puede ser el resultado de una lesión física, inflamación, infección, exposición a toxinas, así como de otras causas. Los ejemplos de fibrosis incluyen la formación de la cicatriz cutánea, los queloides, la fibrosis hepática, fibrosis pulmonar (por ejemplo, silicosis, asbestosis), y fibrosis renal (que incluye la nefropatía diabética y la glomeruloesclerosis). De forma adicional, se han implicado a la fibrosis y a la deposición de colágenos en la formación de placas de β -amiloide, contribuyendo de esta manera al desarrollo y a la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Las composiciones descritas en el presente documento se contemplan también para el tratamiento, la prevención, y/o la mejora de las siguientes dolencias fibróticas.

20 Formación de la cicatriz cutánea y del queloide

[0197] Se sabe que la formación de la cicatriz cutánea y del queloide implican una deposición en exceso de colágeno y/o la desregulación de la deposición del colágeno. Esta desviación procedente de la remodelación del fibroblasto normal del tejido dérmico lesionado puede dar como resultado una cicatriz gruesa y fea. Se sabe que los queloides son, en parte, el resultado de una cicatrización de la herida desregulada y un posterior aumento de la deposición del colágeno. Los queloides, a diferencia de las cicatrices que se observan en la cicatrización normal de la herida no se disuelven o retraen en el tiempo. Aunque los queloides son normalmente tumores dérmicos, son antiestéticos y se pueden acumular en deformaciones y/o lesiones de la piel más problemáticas (Appleton, I., y col., Apoptosis, Necrosis, and Proliferation: Possible Implications in the Etiology of Keloids, *Am. J. Pathol.*, 149(5): 1441-1447 (1996)). La acumulación de colágeno en la piel está también implicada en el escleroderma, un término generalizado para numerosas dolencias de engrosamiento o endurecimiento del tejido dérmico, en el que el elemento común es la producción en exceso o la desregulación del colágeno en los tejidos dérmicos por los fibroblastos (Akagi, A. y col., Expression of Type XVI Collagen in Human Skin Fibroblasts: Enhanced Expression in Fibrotic Skin Disease, *J. Invest. Dermatol.*, 113: 246-250 (1999)). Dado el papel central de la deposición del colágeno en enfermedades de la piel fibróticas tales como el escleroderma y la formación del queloide, las composiciones descritas en el presente documento son útiles en la prevención, el tratamiento, y/o la mejora de las enfermedades de la piel fibrótica, que incluyen, pero no se limitan a, escleroderma y formación del queloide.

Fibrosis hepática

[0198] La fibrosis del hígado está implicada en la patología de numerosas enfermedades hepáticas. Tal como se ha señalado anteriormente, la fibrosis se produce como una complicación de la hemocromatosis, la enfermedad de Wilson, el alcoholismo, esquistosomiasis, hepatitis vírica, obstrucción del conducto biliar, exposición a toxinas, y trastornos metabólicos. Si no se controla, la fibrosis hepática progresa a cirrosis definida por la presencia de nódulos encapsulados, insuficiencia hepática, y muerte.

[0199] La fibrosis hepática, que incluye, pero que no se limita a, cirrosis, y las dolencias asociadas, tales como hepatitis vírica crónica, enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD), esteatohepatitis alcohólica (ASH), y esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis biliar primaria (PBC), cirrosis biliar, y hepatitis autoinmune, se puede tratar mediante las composiciones y procedimientos dados a conocer en el presente documento.

[0200] Las lesiones crónicas en el hígado debidas a fuentes tales como parásitos e infección vírica (por ejemplo, VHB, VHC, VIH, esquistosomiasis) o el estrés a largo plazo debido al consumo de alcohol dan normalmente como resultado la remodelación del hígado, presumiblemente para encapsular la zona dañada y proteger el tejido hepático restante del daño (Li y Friedman, *Gastroenterol. Hepatol.* 14:618-633, 1999). La fibrosis hepática da como resultado cambios en la matriz extracelular, que incluyen un aumento de 3-10 veces en el contenido total del colágeno y la sustitución de la membrana basal de baja densidad con una matriz de alta densidad, que afecta a la función metabólica y de síntesis de los hepatocitos, los astrocitos hepáticos y las células endoteliales (Girogescu, M., Non-invasive Biochemical Markers of Liver Fibrosis, *J. Gastrointest. Liver Dis.*, 15(2): 149-159 (2006)). Las

composiciones descritas en el presente documento son por tanto útiles en la prevención, el tratamiento, y/o la mejora de las enfermedades hepáticas fibróticas, y se contempla dicho uso en el presente documento

Fibrosis renal

5

[0201] De la misma forma que la fibrosis, la fibrosis renal puede ser el resultado de diversas enfermedades y lesiones en los riñones. Los ejemplos de dichas enfermedades y lesiones incluyen la enfermedad renal crónica, el síndrome metabólico, el reflujo vesiculouretral, la fibrosis renal tubulointerstitial, la diabetes (que incluye la nefropatía diabética), y la nefritis glomerular resultante (NG), que incluye, pero no se limita a, glomerulosclerosis segmental focal y glomerulonefritis membranosa, NG mesangiocapilar.

10

[0202] Se ha llegado a reconocer que el síndrome metabólico es una agrupación de anomalías que incluyen hitos diabéticos tales como la resistencia a la insulina, así como la obesidad central o visceral y la hipertensión. En casi todos los casos, la desregulación de la glucosa da como resultado la estimulación de la liberación de la citocina y la regulación en exceso de la deposición de la matriz extracelular. Los factores adicionales que contribuyen a la enfermedad renal crónica, diabetes, síndrome metabólico, y la nefritis glomerular incluyen hiperlipidemia, hipertensión y proteinuria, todas las cuales dan como resultado un daño adicional en los riñones y estimulan además la deposición de la matriz extracelular. De esta manera, con respecto a la primera causa, las lesiones en los riñones pueden dar como resultado una fibrosis renal y la pérdida simultánea de la función renal. (Schena, F. y Gesualdo, L., Pathogenic Mechanisms of Diabetic Nephropathy, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16: S30-33 (2005); Whaley-Connell, A., y Sower, J.R., Chronic Kidney Disease and the Cardiometabolic Syndrome, *J. Clin. Hypert.*, 8(8): 546-48 (2006)). Las composiciones descritas en el presente documento son de esta manera útiles para la prevención, el tratamiento, y/o la mejora de las enfermedades renales fibróticas (enfermedad renal crónica, nefropatía diabética, nefritis glomerular, síndrome metabólico) y se contempla dicho uso en el presente documento.

25

Fibrosis pulmonar

[0203] La fibrosis del pulmón incluye muchos síndromes y enfermedades. Las enfermedades a modo de ejemplo incluyen la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), neumonía intersticial idiopática, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). La fibrosis pulmonar puede incluir también, pero no se limita a, alveolitis fibrosante criptogénica, neumonía intersticial fibrosante crónica, enfermedad pulmonar intersticial (EPI), y enfermedad difusa pulmonar parenquimal (EDPP).

30

[0204] La patogénesis de la mayoría de fibrosis pulmonares, que incluyen las enfermedades anteriormente mencionadas no se entiende bien, sin embargo, se caracterizan todas por una entrada de células inflamatorias y un posterior aumento en la síntesis y la deposición de una matriz extracelular rica en colágeno. (Chua y col., *Am J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 33:9-13 (2005); Tzortzaki y col., *J. Histochem. & Cytochem*, 54(6): 693-700 (2006); Armstrong y col., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 160: 1910-1915 (1999)). Dado el papel identificado de aumento del colágeno y deposición de la matriz extracelular en las fibrosis pulmonares, las composiciones descritas en el presente documento son útiles para la prevención, el tratamiento, y/o la mejora de las fibrosis pulmonares mediante la inhibición de LOX/LOXL.

35

Enfermedad de Alzheimer

[0205] La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo progresivo caracterizado por la pérdida neuronal debida a la acumulación de placas de beta amiloide, y se sabe también que la actividad de la lisil oxidasa está aumentada en la enfermedad de Alzheimer. (Gilad y col., *Neurosci. Lett.*, 376(3): 210-13 (2005)). El beta amiloide contiene múltiples restos de lisina que representan dianas para la actividad de LOX/LOXL, de esta manera, la inhibición de LOX/LOXL puede tratar, evitar, o mejorar la acumulación de placas de amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Las placas de beta amiloide se sabe también que consisten en proteínas adicionales. Una de dichas proteínas que contribuye a la formación y al contenido de placas de beta amiloide es una proteína de colágeno denominada CLAC-P. CLAC-P es similar al colágeno de Tipo XII en la estructura, pero se distribuye en las neuronas. CLAC-P se une con el beta amiloide y contribuye a la formación de placas de beta amiloide (Soederberg y col., *J. Biol. Chem.*, 280(2): 1007-1015 (2005)). Las composiciones descritas en el presente documento son por tanto útiles para la prevención, el tratamiento, y/o la mejora de la enfermedad de Alzheimer, incluyendo, pero sin limitarse a, la prevención de la formación de la placa de beta amiloide así como la reducción en la persistencia de las placas de beta amiloide.

50

55

[0206] La angiogénesis anormal que se puede tratar o evitar utilizando los procedimientos y composiciones

descritos en el presente documento incluyen la angiogénesis anormal que acompaña a la artritis reumatoide, la reperfusión isquémica relacionada con edema y lesión cerebral, isquemia cortical, hiperplasia de ovario e hipervascularidad, (síndrome de ovario poliquístico), endometriosis, psoriasis, retinopatía diabética, y otras enfermedades angiogénicas oculares tales como retinopatía precoz (fibroplasia retrolentol), degeneración macular, 5 rechazo del injerto de la córnea, glaucoma neurovascular y síndrome de Oster Webber.

10 **[0207]** Las enfermedades asociadas con la angiogénesis anormal requieren o inducen el crecimiento vascular. Por ejemplo, la angiogénesis de la córnea implica tres fases: un periodo latente prevascular, una neovascularización activa, y una maduración y regresión vascular.

15 **[0208]** En otra realización, las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden utilizar para tratar las enfermedades asociadas con la angiogénesis no deseada o anormal. El procedimiento comprende administrar al paciente que padece de la angiogénesis no deseada o anormal, un inhibidor de LOXL2 en combinación con el agente antineoplásico o el agente antiangiogénico que no es el inhibidor de LOXL2. La 20 dosificación concreta de estos agentes requerida para inhibir la angiogénesis y/o las enfermedades angiogénicas puede depender de la gravedad de la dolencia, la vía de administración, y de factores relacionados que puede decidir el médico a cargo del tratamiento. Generalmente, las dosis diarias aceptadas y eficaces son la cantidad suficiente para inhibir eficazmente la angiogénesis y/o las enfermedades angiogénicas.

25 **[0209]** De acuerdo con esta realización, las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden usar para tratar una variedad de enfermedades asociadas con la angiogénesis indeseable tal como la neovascularización retinal/coroidal y la neovascularización de la córnea. Los ejemplos de neovascularización retinal/coroidal incluyen, pero no se limitan a, enfermedades de Bests, miopía, fosas ópticas, enfermedades de Stargarts, enfermedad de Pagets, oclusión de la vena, oclusión de la arteria, anemia falciforme, sarcoide, sífilis, 30 pseudoxantoma elástico, enfermedades obstructivas de la carótida, uveítis/vitritis crónicas, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus sistémico eritematoso, retinopatía precoz, enfermedad de Eales, retinopatía diabética, degeneración macular, enfermedades de Bechets, infecciones que producen retinitis o coroiditis, histoplasmosis ocular presunta, pars planitis, desprendimiento crónico de retina, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, trauma y complicaciones tras cirugía con láser, enfermedades asociadas con rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades producidas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso que incluye todas las formas de vitreorretinopatías proliferativas. Los ejemplos de neovascularización de la córnea incluyen, pero no se limitan a, queratoconjuntivitis epidérmica, deficiencia de 35 vitamina A, exceso de uso de lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, pterygium queratitis sicca, síndrome de sjogrens, rosácea de acné, filectenulosis, retinopatía diabética, retinopatía precoz, rechazo del injerto de córnea, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratolisis marginal, poliarteritis, sarcoidosis de Wagener, escleritis, queratotomía radial penfigoide, glaucoma neovascular, y fibroplasia retrolentol, sífilis, infecciones por Mycobacteria, degeneración lípida, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por herpes simple, infecciones por herpes zoster, infecciones por protozoos y sarcoma de Kaposi.

40 **[0210]** En otra realización más, las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden utilizar para tratar enfermedades inflamatorias crónicas asociadas con la angiogénesis anormal. El procedimiento comprende administrar a un paciente que padece una enfermedad inflamatoria crónica asociada con una angiogénesis anormal un inhibidor de LOXL2 en combinación con un agente antineoplásico o un agente antiangiogénico que no es el 45 inhibidor de LOXL2. La inflamación crónica depende de la formación continua de brotes de capilares para mantener una entrada de células inflamatorias. La entrada y la presencia de las células inflamatorias produce granulomas, y, de esta manera, mantiene el estado inflamatorio crónico. La inhibición de la angiogénesis utilizando las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación puede evitar la formación de los granulomas, aliviando por tanto la enfermedad. Los ejemplos de enfermedad inflamatoria crónica incluyen, pero no se limitan a, enfermedades 50 inflamatorias del intestino, tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, psoriasis, sarcoidosis, y artritis reumatoide.

55 **[0211]** Las enfermedades inflamatorias del intestino tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa se caracterizan por la inflamación crónica y la angiogénesis en diversos sitios en el tracto gastrointestinal. Por ejemplo, la enfermedad de Crohn se produce como una enfermedad inflamatoria transmural crónica que afecta de forma más común al ileon distal y al colon pero que se puede producir también en cualquier parte del tracto gastrointestinal desde la boca al ano y a la zona perianal. Los pacientes con enfermedad de Crohn tienen generalmente diarrea crónica asociada con dolor abdominal, fiebre, anorexia, pérdida de peso e hinchazón abdominal. La colitis ulcerosa es también una enfermedad ulcerosa e inflamatoria, crónica, no específica que surge en la mucosa colónica y está

caracterizada por la presencia de diarrea sanguinolenta. Estas enfermedades inflamatorias del intestino están producidas generalmente por una inflamación granulomatosa crónica a lo largo del tracto gastrointestinal que implica nuevos brotes de capilares rodeados por un cilindro de células inflamatorias. La inhibición de la angiogénesis por las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación debe inhibir la formación de los brotes y evitar la formación de granulomas. Las enfermedades inflamatorias del intestino presentan también manifestaciones extraintestinales, tales como lesiones de la piel. Dichas lesiones están caracterizadas por la inflamación y la angiogénesis y se pueden producir en muchos sitios diferentes del tracto gastrointestinal. La inhibición de la angiogénesis por las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación debe reducir la entrada de células inflamatorias y evitar la formación de la lesión.

10

[0212] La sarcoidosis, otra enfermedad inflamatoria crónica, está caracterizada como trastorno granulomatoso multisistema. Los granulomas de esta enfermedad pueden formarse en cualquier lugar del cuerpo y, de esta manera, los síntomas dependen del sitio de los granulomas y de si la enfermedad está activa. Los granulomas se crean a partir de brotes de capilares angiogénicos que proporcionan un suministro constante de células inflamatorias. Utilizando las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación para inhibir la angiogénesis, se puede inhibir dicha formación de granulomas. La psoriasis, también una enfermedad inflamatoria crónica y recurrente, está caracterizada por pápulas y placas de diversos tamaños. El tratamiento que utiliza las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación debe evitar la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para mantener las lesiones características y proporcionar el alivio de los síntomas del paciente.

20

[0213] La artritis reumatoide (AR) es también una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por una inflamación no específica de las articulaciones periféricas. Se cree que los vasos sanguíneos del revestimiento sinovial de las articulaciones experimenta la angiogénesis. Además de formar nuevas redes vasculares, las células endoteliales liberan factores y especies de oxígeno reactivas que conducen el crecimiento de paños y a la destrucción del cartílago. Los factores implicados en la angiogénesis pueden contribuir de forma activa a, y ayudar a mantener, el estado crónicamente inflamado de la artritis reumatoide. El tratamiento utilizando las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación solas o en junto con los otros agentes anti AR puede evitar la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para mantener la inflamación crónica y proporcionar al paciente de AR un alivio de los síntomas.

30

8. Diagnóstico de las enfermedades

[0214] Se describen también en el presente documento los procedimientos para el diagnóstico, la vigilancia, la estadificación o la detección de las enfermedades descritas anteriormente utilizando los agentes que reconocen diferentes formas de LOX o LOXL. Por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente, se pueden utilizar para estos fines los anticuerpos contra diferentes formas de LOX o LOXL, la preproteína, la forma madura secretada.

35

[0215] Tal como se ha descrito anteriormente, las formas maduras de LOX o LOXL se escinden y se pueden detectar en virtud de los cambios en el peso molecular (inmunotransferencia) o mediante el uso de anticuerpos que detectan la forma no escindida frente a la forma escindida de LOX/LOXL, junto con la localización celular utilizando diversos procedimientos de detección tal como la inmunohistoquímica (IHC).

40

[0216] Se cree que la matriz extracelular y el medio acondicionado (por ejemplo, véase el Ejemplo 4) deben contener LOX o LOXL proteolíticamente procesadas mientras que la LOX/LOXL escindida debe localizarse intracelularmente. Algunas LOX/LOXL escindidas se pueden detectar en el interior de la célula como consecuencia de la captación desde el espacio extracelular.

45

[0217] Se pueden recoger muestras de individuos y analizarse determinando los niveles de LOX inactiva o activa o los niveles de diferentes formas de LOX/LOXL. Se puede llevar a cabo este análisis antes del inicio del tratamiento, utilizando el tratamiento específico de la lisil oxidasa para identificar los tumores que tienen una expresión o actividad elevadas de la LOX/LOXL activa. Dicho análisis diagnóstico puede llevarse a cabo utilizando cualquier muestra que incluye, pero no se limita a células, proteínas o extractos de membranas de las células, fluidos biológicos tales como esputo, sangre, suero, plasma, u orina, o muestras biológicas tales como muestras de tejido, secciones de tejido fijadas con formalina o congeladas.

50

[0218] Se puede emplear cualquier procedimiento adecuado para la detección y el análisis de la LOX/LOXL inactiva y/o activa. Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra" se refiere a una muestra procedente de un ser humano, animal o a una muestra de investigación, por ejemplo, una célula, tejido, órgano, fluido, gas, aerosol, suspensión coloide o material coagulado. La muestra puede ensayarse *in vivo*, *por ejemplo*, sin

55

extirpar del ser humano o animal, o se puede ensayar *in vitro*. La muestra puede ensayarse tras procesamiento, por ejemplo, mediante procedimientos histológicos. El término "muestra" se puede referir también a una célula, tejido, órgano, o fluido que se toma recientemente de un ser humano o animal, o a una célula, tejido, órgano, o fluido que se procesa o almacena.

5

[0219] Se describen también en el presente documento procedimientos para diagnosticar la metástasis cancerosa en un sujeto, que comprenden evaluar los niveles de la LOX o la LOXL activa o la actividad en la sangre, por lo que un cambio en los niveles o en la actividad de la LOX o la LOXL en la sangre en comparación con una muestra de referencia indica la presencia de crecimiento de tumos metastásico. En algunos casos, los niveles o actividades de la LOX o la LOXL activa en la sangre pueden ser inferiores a los que se midieron con anterioridad, lo que puede indicar que el sujeto tiene un riesgo mayor de metástasis cancerosa; que el cáncer ha experimentado metástasis, o que la metástasis cancerosa ha aumentado.

[0220] Se describen también en el presente documento procedimientos para diagnosticar la metástasis cancerosa en un sujeto que tiene un tumor, que comprenden evaluar los niveles o la actividad de la LOX o la LOXL activa en el tumor, por lo que un cambio en los niveles o en la actividad de la LOX o la LOXL activa en el tumor, en comparación con una muestra de referencia indica la presencia de crecimiento tumoral metastásico. En algunos casos, los niveles o las actividades de la LOX o la LOXL activa en el tumor pueden ser mayores que aquellos cuando se midieron con anterioridad, lo que puede indicar que el sujeto tiene un riesgo mayor de metástasis cancerosa; que el cáncer ha experimentado metástasis; o que la metástasis cancerosa ha aumentado.

[0221] La muestra de referencia puede derivar del mismo sujeto, tomarse del mismo tumor en un punto temporal diferente o procedente de otro sitio del cuerpo, o de otro individuo.

[0222] La medida de los niveles de la LOX o la LOXL activa pueden tomar la forma de un ensayo inmunológico, que detecta la presencia de una proteína LOX o LOXL activa con un anticuerpo dirigido contra la proteína, por ejemplo, un anticuerpo unido específicamente a la LOX o a la LOXL activa o secretada.

[0223] Se pueden usar también inmunoensayos junto con fluorescencia inducida con láser (véase, por ejemplo, Schmalzing y Nashabeh, *Electrophoresis* 18: 2184-93 (1997)); Bao, J. *Chromatogr. B. Biomed. Sci.* 699: 463-80 (1997), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia). Se pueden usar también inmunoensayos de liposomas, tales como inmunoensayos de liposomas mediante inyección de flujo e inmunosensores de liposomas (Rongen y col., *J. Immunol. Methods* 204: 105-133 (1997), para determinar los niveles de la LOX o LOXL activa de acuerdo con el procedimiento de la divulgación). Los inmunoensayos, tales como los enszimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), son útiles en los procedimientos proporcionados en el presente documento. Un radioinmunoensayo puede ser también útil para determinar si una muestra es positiva para la LOX o la LOXL activa o para determinar el nivel de la LOX o la OLX activa. Se puede usar un radioinmunoensayo que utiliza, por ejemplo, un anticuerpo secundario marcado con yodo-125.

[0224] Además, se puede medir la actividad de la LOX o la LOXL activa, ignorando de esta manera la cantidad de enzima inactiva. Se puede medir la actividad enzimática de la LOX o LOXL activa de numerosas maneras, utilizando una elastina soluble o colágeno soluble con lisina marcada como un sustrato. Se proporcionan detalles de un ensayo de actividad en Royce y col., "Copper metabolism in mottled mouse mutants. The effect of copper therapy on lysyl oxidase activity in brindled (Mobr) mice," *Biochem J.* 15 de febrero de 1982; 202(2): 369-371. Se pueden usar ensayos cromogénicos. Se describe uno en Palamakumbura, y col. "A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples," *Anal Biochem.* 15 de enero de 2002; 300 (2):245-51.

[0225] Se describe también en el presente documento un procedimiento para vigilar la respuesta de un sujeto a un tratamiento que incluye un modulador de la LOX/LOXL tal como el tratamiento de cáncer, tumores, y enfermedades fibróticas. El procedimiento comprende: detectar un cambio en el nivel de la proteína C reactiva o de otros reactivos en la fase aguda, en el sujeto, tras la administración de un modulador de la LOX o de la LOXL al sujeto, en el que el cambio indica que el modulador de la LOX o de la LOXL tiene un efecto terapéutico sobre el sujeto. Una proteína C reactiva es un importante marcador farmacodinámico de la inflamación sistémica. Además, se cree que la proteína C reactiva potencia la expresión de LOX (Li y col., *Circulation Research*; (2004) 95: 877). De esta manera, sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, un nivel reducido de proteína C reactiva (por ejemplo, en la muestra de sangre del sujeto) en comparación con la anterior a la administración del inhibidor de la LOX o de la LOXL puede ser indicador de la respuesta del sujeto al tratamiento que utiliza un inhibidor de la LOX o de la LOXL. Los procedimientos incluyen la vigilancia del aumento o la disminución de los niveles de proteína C reactiva, que serían indicadores de la respuesta del sujeto al tratamiento.

[0226] En otra realización, se proporcionan procedimientos para vigilar la respuesta de un sujeto a un tratamiento, que incluyen un modulador de la LOX/LOXL tal como en el tratamiento del cáncer, tumores, y enfermedades fibróticas. El procedimiento comprende: detectar un cambio en el nivel de los telopéptidos de colágeno o en el contenido de hidroxiprolina en el sujeto tras la administración de un modulador de la LOX o de la LOXL al sujeto, en el que el cambio indica que el modulador de la LOX o de la LOXL tiene un efecto terapéutico en el sujeto. El cambio puede ser un aumento o disminución. Por ejemplo, una disminución en los telopéptidos de colágeno o en el contenido de hidroxiprolina puede ser indicadora de un efecto terapéutico.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayo de EMT/MET

[0227] Para detectar si una célula está en un estado EMT o MET, se tiñeron las células con anticuerpos específicos de los marcadores de la proteína celular para los estados epitelial o mesenquimal tales como la caderina E, la vimentina, fibronectina, y faloidina, para detectar la actina F (**FIGURA 4**).

Protocolo de tinción con rodamina faloidina

[0228] Se sembraron las células 24 horas antes de la tinción; las células deben estar a aproximadamente un 80% de confluencia 24 horas después en un porta de 8 cámaras. Al siguiente día, se aspiró el medio y se enjuagaron las cámaras con 1XPBS. A continuación se fijaron las células con paraformaldehído al 4% (PFA) durante 20 minutos a temperatura ambiente y a continuación se enjuagaron una vez con 1X PBS. Para la permeabilización, las células se trataron con saponina al 0,5% (JT Baker, Phillipsburg, NJ) en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las cámaras se enjuagaron cuidadosamente una vez con 1X PBS y se añadió una dilución 1:100 de rodamina faloidina (Invitrogen, Carlsbad, Ca) en PBS a las células y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las cámaras se enjuagaron dos veces con 1X PBS y los portas se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, Ca).

30 *Protocolo de tinción de la Caderina E*

[0229] Se sembraron las células 24 horas antes del día de la tinción, las células deben estar aproximadamente a un 80% de confluencia al día siguiente en un porta de 8 cámaras. El siguiente día, se aspiró el medio y se enjuagaron las cámaras con 1X PBS. A continuación las células se fijaron con metanol frío en hielo y a continuación se incubaron durante 2 minutos a -20° C. Las células se enjuagaron una vez con 1X PBS y se añadió 1 µg/ml de anticuerpo Ab dirigido contra la caderina E Ab (Calbiochem, Gibbstown, NJ) a las cámaras del porta. A continuación, los portas se incubaron a 37° C durante 1 hora. Tras enjuagar cuidadosamente las cámaras una vez con 1X PBS, se añadió el Ab secundario (cy3 conjugado dirigido contra IgG de ratón, Jackson Immuno Research, West Grove, Pa) y se incubó a temperatura ambiente durante 30-45 minutos. Se enjuagaron las cámaras dos veces con 1X PBS y se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, Ca).

Ejemplo 2: Ensayo de los inhibidores de LOX/LOXL que reducen la EMT/promueven la MET en células que expresan niveles significativos de LOX/LOXL de forma endógena

[0230] Las células BT-549, Hs5788t, MDA-MB-231, o NCI-H226 expresan niveles significativos de LOX/LOXL y se encuentran en un estado EMT o de tipo EMT. Se sembraron las células sobre portas de vidrio de cámaras de 8 pocillos (Nalgene Nunc International, Rochester, Nueva York) a una confluencia de ~ 25-50%. Se incubaron las células durante 18 h en condiciones hipóxicas (oxígeno al 2%), anóxicas (oxígeno al 0,02%), o normóxicas (oxígeno al 21%).

[0231] Se añadieron inhibidores de LOX/LOXL (por ejemplo, anticuerpo dirigido contra LOX/LOXL, ARNip de LOX/LOXL, shARN de LOX/LOXL, inhibidores de moléculas pequeñas, tales como βAPN o D-penicilamina) y los controles (por ejemplo, oligonucleótidos de sentido directo de LOX/LOXL, anticuerpo control irrelevante, vehículo de molécula pequeña tal como DMSO) al medio de cultivo celular. Los niveles de LOX/LOXL se determinaron mediante la RT-PCR y el análisis de inmunotransferencia.

[0232] Después de 48-72 horas, las células se tiñeron de acuerdo con el Ejemplo 1. Las células transfectadas con los oligonucleótidos de sentido directo de LOX/LOXL deben mantener las características de la tinción positiva con vimentina o fibronectina de la EMT con bajos niveles de tinción de la caderina E y un citoesqueleto de actina

alargado y remodelado tal como se desveló mediante la tinción de la faloidina de la actina F. Las células tratadas con los inhibidores de LOX/LOXL candidatos que no se dirigen eficazmente a LOX/LOXL para llevar a cabo la inducción de la MET en las células de la EMT deben mantener también estas características de la EMT.

- 5 **[0233]** Las células tratadas con los inhibidores de LOX/LOXL deben reducir las características de la EMT y manifestar las características de la MET de un aumento en la tinción con caderina E y reducir o mantener despreciable la tinción con vimentina o fibronectina. La tinción con rodamina-faloidina de estas células debe desvelar un citoesqueleto de actina más compacto y regular.
- 10 **[0234]** Se utilizaron también ensayos de invasión/migración para evaluar los fenotipos de la EMT y la MET en las células, de tal manera que una invasividad y una capacidad migratoria crecientes están asociadas con la EMT. (Véase, por ejemplo, Bedogni y col., Cancer Res. 64: 2552-2560 (2004)). Se privó de suero a las células durante 24 h, a continuación se sembraron 10^4 - 10^6 células por triplicado en inserciones revestidas y no revestidas (por ejemplo, inserciones revestidas de Matrigel™ de BD Biosciences), y se incubaron en condiciones normóxicas o con privación de oxígeno durante 24 h (por ejemplo, la expresión de LOX/LOXL puede diferir en condiciones normóxicas/hipóxicas tal como se muestra en la **FIGURA 33**). Los tratamientos con inhibidores y controles de LOX/LOXL se continúan a lo largo del experimento.

20 **[0235]** Las células que mantienen un estado de EMT deben ser invasivas y migratorias, y capaces de invadir las inserciones revestidas con Matrigel™, o migrar a través de otras inserciones con la superficie modificada, más fácilmente en comparación con las células de EMT. Se llevó a cabo un análisis similar utilizando un ensayo de rascado o cicatrización de herida, en el que se hace un rascado utilizando una punta de pipeta en un césped confluyente de células. El rascado se vigila durante 24-96 h utilizando un microscopio. Las células en el estado de EMT que son más invasivas y migratorias deben rellenar el rascado más rápidamente que las células menos
25 invasivas o migratorias.

[0236] Aquellos inhibidores de LOX/LOXL que reducen la EMT y promueven la MET se seleccionan como candidatos para desarrollo adicional.

30 **[0237]** Tal como se representa gráficamente en las **FIGURAS 26A y B**, se llevó a cabo un cribado de los mAb que inhiben la invasión y la migración celular. Los sobrenadantes Pep2 finales cribados se purificaron y se concentraron (MO63 a MO82, 50 ng y 200 ng de cada). Se sometieron las células MDA MB 231 a privación de suero durante 24 horas y se sembraron a 20.000 células/pocillo en medio exento de suero. Las células se trataron con conjuntos de 50 ng y 200 ng de sueros de anticuerpo por triplicado y se incubaron durante 48 horas. Las células invasivas se
35 tiñeron con calceína AM y se midió la fluorescencia en un lector fluorescente de 96 pocillo (485 nm de excitación, 520 de emisión).

Ejemplo 3: Ensayo de inhibidores de LOX/LOXL que reducen la EMT/promueven la MET con células transfectadas con LOX/LOXL

40 **[0238]** Las células MDCK, MCF-7, o SW620 no expresan niveles significativos de LOX/LOXL y no están en el estado de EMT. Se transfectaron las células con plásmidos que expresan LOX/LOXL para inducir la EMT en las células (véase por ejemplo, la **FIGURA 6**). Las células transfectadas se incubaron durante 18 h en condiciones normóxicas (oxígeno al 21%), hipóxicas (oxígeno al 2%) o anóxicas (oxígeno al 0,02%). Se determinó la expresión de los niveles de LOX/LOXL mediante la RT-PCR y el análisis de inmunotransferencia.
45

[0239] Las células transfectadas se trataron con los inhibidores de LOX/LOXL y los controles, se determinó el estado de MET/EMT tal como se describe en el Ejemplo 2. Se determinó la expresión de los niveles de LOX/LOXL de las células tratadas mediante la RT-PCR y el análisis de inmunotransferencia.
50

[0240] Los inhibidores de LOX/LOXL eficaces deben de evitar el estado de EMT, o inducir la MET, de las células transfectadas (**FIGURA 7**). Las células transfectadas tratadas con oligonucleótidos de sentido directo de LOX/LOXL deben estar en un estado de EMT tal y como deberían estar las células transfectadas sin tratamiento alguno, o el tratamiento con controles tales como un anticuerpo control irrelevante. Se pueden analizar también las células
55 utilizando los ensayos de invasión y/o migración tal como se describe en el Ejemplo 2.

[0241] Aquellos inhibidores de LOX/LOXL que reducen la EMT y promueven la MET se seleccionan como candidatos para desarrollo adicional.

Ejemplo 4: Ensayo de inhibidores de LOX/LOXL que reducen la EMT/promueven la MET con células tratadas con medio acondicionado (MC)

Preparación de MC a partir de células CHO:

- 5 [0242] Se sembraron células CHO-Loxl2 en un matraz T175 con un volumen de 25 ml de medio (MEM + FBS al 10%, completo). 48 horas después, el medio se sustituyó con 20 ml de medio SFMII (las células fueron un 90-95% confluentes en este punto). Se recogió el medio 72 horas después y se filtró en un filtro de polietileno de 0,22 µm. el medio filtrado se concentró 20-25 veces utilizando un concentrador Amicon (con un corte de 15 kD). Se prepararon
10 nueve de los diez matraces de 20 ml de medio para disponer de 8 ml de medio acondicionado para los experimentos.

Ensayo de células con MC:

- 15 [0243] Se sembraron células MCF-7 a 50.000 células por pocillo en un porta de 8 cámaras 1 día antes del tratamiento con MC. Se sembraron las células con medio completo (MEM + FBS al 10%, 1X L-glutamina). Se añadieron 500 µl de medio acondicionado reciente procedente de células Cho-Loxl2 a las cámaras que contenían las células MCF-7. Se incubaron las células con el MC durante 48 horas. El medio acondicionado procedente de células MCF/ naturales se utilizó como un control negativo. Después de 48 horas de incubación con MC, las células
20 se tiñeron con rodamina faloidina (**FIGURA 8**).

Ejemplo 5: Ensayos de bloqueo del mAb dirigido contra LOXL2 con células tratadas con medio acondicionado (MC)

- 25 [0244] Células MDA-MB-231 (**FIGURAS 9,10, 12**) o Hs578t (**FIGURA 11**) se sembraron en un matraz T75 a un 80% de confluencia y se cultivaron en DMEM, FBS al 10% y 1X L-glutamina. Estas células se hicieron crecer durante 72 horas para adquirir el MC utilizado para los experimentos. Después de 72 horas, el MC se centrifugó brevemente para eliminar las células muertas y los desechos y se colocó sobre células MCF-7 (**FIGURAS 10, 11**) o SW620 (**FIGURA 12**) que se habían sembrado anteriormente a 50.000 células por pocillo en un porta de 8 cámaras.
30 Se observaron normalmente cambios en el fenotipo de tipo EMT tras 48 horas de incubación con el medio acondicionado. El MC de MCF-7 o SW620 se usó como un control negativo. Se llevaron a cabo dos experimentos por separado para demostrar la capacidad de bloqueo de los MAb dirigidos contra lox12 para inhibir los cambios fenotípicos que se producen con la transición epitelial-mesenquimal (EMT).

35 **Experimento 1: "Preincubación".**

- [0245] Se preincubó un ml de MC (centrifugado para eliminar los desechos celulares) procedente de células MDA-MB-231 o Hs578t con 2 µg o 4 µg (concentración final) de anticuerpo dirigido contra lox12 durante 1 hora y 30 minutos antes de la adición a células MCF7 o SW620. Se usó anticuerpo dirigido contra actina como control negativo
40 del mAb (**FIGURA 10E**). A continuación se añadió el medio acondicionado a las células MCF-7 o SW620 y se incubó a 37° C y CO2 al 5% durante 48 horas. El citoesqueleto de actina de las células MCF7 o SW620 se tiñó con rodamina faloidina para analizar el bloqueo de los cambios fenotípicos de la EMT (**FIGURA 9**).

Experimento 2. "Sin preincubar"

- 45 [0246] Se sembraron células MDA-MB-231 o Hs578t en un matraz T25 a un 80% de confluencia y se cultivaron en DMEM, FBS al 10% y 1X L-glutamina. Se añadieron mAb dirigidos contra Lox12 (concentración final de 4 µg) a cada matraz respectivamente y los matraces se incubaron con el medio durante 72 horas. Se usó anticuerpo dirigido contra actina como control negativo del mAb (**FIGURA 10E**). El medio acondicionado se centrifugó para eliminar
50 cualquier desecho celular y a continuación se añadió a las células MCF7 o SW620 y se incubó a 37° C y CO2 al 5% durante 48 horas. El citoesqueleto de actina de las células MCF7 o SW620 se tiñó con rodamina faloidina para analizar el bloqueo de los cambios fenotípicos de la EMT (**FIGURAS 11, 12**).

55 **Ejemplo 6: Ensayos de bloqueo del mAb dirigido contra LOXL2 con células tratadas con MC procedente de células transfectadas**

Generación de la línea celular estable hLOXL2 MCD

- [0247] Se transfectó un pSecTag2hygro-hLOXL2 MCD (Dominio Catalítico Mínimo, aminoácidos TAPDLVLNAE...

hasta el final de las etiquetas +Myc+His del marco de lectura) en células Hek293 y se seleccionaron los clones individuales bajo selección de Higromicina B. Se calibró la expresión mediante transferencia Western con un anticuerpo dirigido contra His (véase la **FIGURA 22**).

5 **Generación de medio acondicionado para estudios de EMT en células SW620**

[0248] Se plaqueó la línea celular estable nº 7 de hLOXL2 MCD Hek293 en un matraz T175 utilizando células 12E6 o 6E6, ambas en 30 ml de cDMEM (DMEM + L-glutamina + FBS al 10%, sin penicilina/estreptomicina). Se hicieron crecer las células durante 72 horas y a continuación se cosechó el medio acondicionado para uso en el experimento SW620/EMT descrito a continuación. Como control, se plaquearon células Hek293 a las mismas densidades y se trataron de la misma forma.

Medio acondicionado procedente de Lox12-MCD estable e inducción de EMT:

[0249] Se sembraron células SW620 a 50.000 células por pocillo en un porta de 8 cámaras con pocillo que contenían DMEM, FBS al 10%, y 1X L-glutamina. El medio acondicionado procedente de células que expresaban Lox12-MCD humana se cosechó para uso en el ensayo SW620 / EMT tal como se ha descrito anteriormente. En cada cámara, se añadieron 500 µl de medio acondicionado a los respectivos pocillos. Se utilizó el medio acondicionado procedente de células 293 como control negativo. De forma típica se observaron cambios en el fenotipo de tipo EMT después de 72-96 horas. (**FIGURA 13**).

[0250] El MC procedente de clones estables que expresan los dominios Lox12.SRCR humanos 1-2 y 3-4 no inducen cambios de fenotipo de tipo EMT después de 72-96 horas.

25 **Ejemplo 7: Ensayo de inhibidores de LOX/LOXL con agentes quimioterapéuticos**

[0251] Se usaron los inhibidores de LOX/LOXL identificados en los Ejemplos 2, 3, o 4 que reducen la EMT/promueven la MET para tratar las líneas celulares BT-549, Hs5788t, MBA-MD231, o NCI-H226, o alternativamente, líneas celulares tales como MCF-7 o SW620 que se han transfectado para expresar LOX/LOXL o tratadas con MC procedente de células que expresan LOX/LOXL.

[0252] Se añadieron a las células agentes quimioterapéuticos tales como, agentes alquilantes (por ejemplo, cisplatino, carboplatino), antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, gemcitabina), antraciclinas (por ejemplo, doxorubicina); inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, etopósido), inhibidores mitóticos (por ejemplo, paclitaxel), inhibidores de EGFR (por ejemplo, erlotinib o gefitinib), u otros agentes, tales como, doclitaxel, antraciclina, 5-fluorouracilo, a las células de forma simultánea con, o después del, tratamiento con el inhibidor de LOX/LOXL.

[0253] Las células tratadas con inhibidores de LOX/LOXL y un agente quimioterapéutico se compararon con las células tratadas con un agente quimioterapéutico solo utilizando los ensayos de viabilidad celular y de apoptosis. Se midió la viabilidad celular utilizando CellTiter-Glo™ (Promega) y se midió la apoptosis utilizando Apo-ONE™ (Promega), se describen los protocolos en el manual del fabricante.

[0254] Se representó gráficamente una curva de dosis respuesta para cada conjunto de condiciones experimentales (intervalo de dosis quimioterapéuticas, la dosis del inhibidor de LOX/LOXL, el número de dosis, el tiempo de tratamiento) utilizando muestras por triplicado. Se usaron también para el análisis ensayos de invasión y migración, para determinar si se observaba alguna sinergia entre el inhibidor de LOX/LOXL y el agente quimioterapéutico en la reducción de la invasión y la migración celular.

[0255] Los inhibidores de LOX/LOXL que actúan de forma sinérgica con un agente quimioterapéutico deberían disminuir la viabilidad celular, aumentar el número de células apoptóticas, y/o disminuir la capacidad de invasión o migratoria en comparación con las células tratadas solo con el agente quimioterapéutico.

[0256] Aquellos inhibidores de LOX/LOXL que actúan de forma sinérgica con un agente quimioterapéutico se seleccionan como candidatos para desarrollo adicional.

Ejemplo 8: Ensayos de sensibilidad del fármaco con la inhibición de LOX/LOXL

[0257] Se sembraron placas de 96 pocillos con 7.500 células por pocillo y 24 horas después, el medio se sustituyó

con medio que contenía diversas concentraciones de Cisplatino (Calbiochem, Gibbstown, NJ), Erlotinib (LC Laboratories, Woburn, MA), Paclitaxel (MP Biomedicals, Solon, OH), Metotrexato (Calbiochem, Gibbstown, NJ), β -aminopropionitrilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o 250 ng/pocillo de anticuerpo. Tras 5 días de exposición continua, se enjuagaron los cultivos y se determinó el número de células vivas utilizando CellTiter Glo™ (Promega, San Luis Obispo, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada concentración del fármaco tenía 3 muestras por línea celular (**FIGURAS 36, 37, 38**).

[0258] Para los estudios de sensibilidad del fármaco al ARNip, se transfectaron las células transitoriamente con LOX, LOXL 20 μ M o con oligonucleótidos de Stealth Select™ ARNi no dirigidos utilizando el reactivo de transfección Dharmafect de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific, Lafayette, CO) 24 horas antes de la exposición al fármaco. Se verificaron los niveles silenciados tras la exposición al fármaco con la PCR cuantitativa. Se generaron líneas celulares de shARN estables utilizando el MISSION© shRNA Lentiviral System (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se verificó el silenciamiento de LOX o LOXL2 con la PCR cuantitativa (**FIGURA 35**).

15 Ejemplo 9: anticuerpos dirigidos contra LOX y LOXL2

[0259] Se generaron anticuerpos que reconocían las proteínas LOX y LOXL2 inmunizando ratones con los péptidos relacionados en la Tabla 1. Se utilizaron la SEQ ID 1 y 8 para generar los anticuerpos. Los anticuerpos generados se cribaron para determinar si los anticuerpos reconocían específicamente la forma no activa no escindida de LOX, la forma activa madura o las formas no escindida y escindida.

[0260] Los péptidos de la SEQ ID 2-6 están basados en la enzima LOX o LOXL2 madura. Se utilizó un péptido seleccionado de la Tabla 1 para inmunizar ratones. Se inyectaron ratones BALB/c con 160 mg del péptido purificado. Para la inyección inicial, el péptido se mezcló con adyuvante completo de Freund (1:1) y se inyectó por vía subcutánea. Las inyecciones posteriores son por vía intraperitoneal en ausencia del adyuvante.

[0261] Se determinó el anticuerpo en suero dirigido contra LOX o LOXL2 mediante un ensayo inmunoanálisis de adsorción (ELISA) en el que la proteína LOX o LOXL2 de longitud completa o activa se une a placas de poliestireno. Después de al menos 2 inmunizaciones durante un periodo de al menos 2 meses, se extrajo el bazo de un ratón con un elevado título de anticuerpos dirigidos contra LOX o LOXL2 y se fusionó con células de la línea células P₃ U₁ de plasmacitoma de ratón. Los clones resultantes se cribaron para su capacidad de unirse a LOX o LOXL2, o ambos, utilizando las formas tanto de longitud completa como la activa, en ensayos ELISA.

[0262] Se determinó la especificidad del anticuerpo dirigido contra LOX o LOXL2, individualmente o por reactividad cruzada, mediante ELISA. Se aisló un anticuerpo reactivo que producía hibridoma con LOX o LOXL2 y se subclonó. Este hibridoma se hizo crecer en medio de cultivo de tejido así como en ascites para servir como una fuente de anticuerpo dirigido contra LOX o LOXL2.

[0263] Para generar anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra LOX o LOXL2, tal como se describe en el documento EP 0239400 (Winter y col.), se alteró el anticuerpo monoclonal de ratón anteriormente descrito mediante la sustitución de sus regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en un anticuerpo monoclonal humano o fragmento de anticuerpo monoclonal. La CDR procedente de los dominios de la región variable de la Ig de cadena pesada y ligera humana se sustituyen con CDR alternativas procedentes de dominios de la región variable de murino. Estas regiones variables con la Ig alterada se pueden combinar posteriormente con regiones constantes de la Ig humana para crear anticuerpo, que son totalmente humanos en la composición excepto para las CDR de murino sustituidas. Dichos anticuerpos sustituidos con la CDR podría preverse que estimulan una respuesta inmune en seres humanos con menos probabilidad en comparación con los anticuerpos quiméricos debido a que los anticuerpos sustituidos con la CDR contienen considerablemente menos anticuerpos no humanos. El procedimiento para humanizar anticuerpos monoclonales mediante el "injerto" de la CDR se ha denominado "reformatar". (Riechmann y col., Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeyen y col., Science 239: 1534-1536 (1988)).

[0264] El trasplante de las CDR de los anticuerpos dirigidos contra LOX o LOXL2 de murino (tales como las CDR procedentes de los anticuerpos monoclonales de murino, tal como se describe en Burbelo y col. Coll. Relat. Res. 6: 153-162 (1986)) se consigue mediante ingeniería genética mientras que las secuencias del ADN de la CDR se determinan mediante clonación de los segmentos génicos de la región variable (V) de la cadena pesada y ligera de murino y a continuación se transfieren a las regiones V humanas correspondientes mediante mutagénesis dirigida al emplazamiento. En la etapa final del procedimiento, los segmentos génicos de la región constante humana del isotipo deseado (usualmente gamma I para CH y kappa para CL) se añaden a los genes de la cadena pesada y ligera humanizados y se expresan simultáneamente en células de mamíferos para producir anticuerpos

humanizados solubles.

[0265] La transferencia de estas CDR a un anticuerpo humano confiere a este anticuerpo propiedades de unión al antígeno del anticuerpo original de murino. Estas seis CDR en el anticuerpo de murino están montadas estructuralmente en una región "marco" de la región V. El motivo de que haya tenido éxito el injerto de la CDR es que las regiones marco entre los anticuerpos de ratón y ser humano puede tener estructuras 3-D muy similares con puntos similares de unión para las CDR, de tal manera que se pueden intercambiar las CDR. Se pueden preparar dichos homólogos de anticuerpos humanizados, tal como se ha ilustrado en Jones y col., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., Nature 332: 323-327 (1988); Queen y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 10029 (1989); y Orlandi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833 (1989).

[0266] No obstante, se piensa que algunos aminoácidos en las regiones marco interactúan con las CDR e influyen la afinidad de unión del antígeno global. La transferencia directa de las CDR procedentes de un anticuerpo de murino para producir un anticuerpo humanizado sin ninguna modificación de los marcos de la región V humana dan como resultado a menudo una pérdida parcial o completa de la afinidad de unión. De esta manera puede desearse alterar restos en las regiones marco del anticuerpo aceptor con el fin de obtener la actividad de la unión.

[0267] Queen y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989) y el documento WO 90/07861 (Protein Design Labs Inc.) han descrito la preparación de un anticuerpo humanizado que contiene restos modificados en las regiones marco del anticuerpo aceptor combinando las CDR de un mAb de murino (dirigido contra Tac) con el marco de la inmunoglobulina humana y las regiones constantes. Han demostrado una solución al problema de la pérdida de afinidad de unión que a menudo es el resultado de la transferencia de la CDR sin ninguna modificación de los restos marco de la región V humana; su solución implica dos etapas clave. En primer lugar, las regiones marco V humanas se escogen mediante análisis informático para la homología de la proteína óptima con el marco de la región V del anticuerpo de murino original, en este caso, el MAb dirigido contra Tac. En la segunda etapa, la estructura terciaria de la región V de murino se modela mediante ordenador con el fin de visualizar el resto de los restos de aminoácidos, que es probable que interactúen con las CDR de murino y estos restos de aminoácidos de murino se superponen a continuación sobre el marco humano homólogo. Su solución de emplear marcos humanos homólogos con presuntos restos de contacto de murino da como resultado anticuerpos humanizados con similares afinidades de unión con el anticuerpo de murino original con respecto a los anticuerpos específicos del receptor de la interleucina 2 (Queen y col., 1989 [más arriba]) y también de anticuerpos específicos del virus del herpes simple (VSH) (Co. y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 2869-2873, (1991)).

[0268] Se proporcionan detalles adicionales de este procedimiento de humanización en los documentos U.S. 5.225.539 de Winter y col., U.S. 4.816.397 de Boss y col y U.S. 4.816.567 y U.S. 6.331.415 de Cabilly y col., todos los cuales son conocidos por los expertos en la técnica y se incorporan de forma específica por referencia a fines de describir la preparación ilustrada.

[0269] Los anticuerpos que reconocen LOX y LOXL2 se generan inmunizando ratones tal como se ha descrito anteriormente, con péptidos que tienen aminoácidos aleatorizados de los aminoácidos no conservados entre LOX y LOXL2, por ejemplo, entre la SEQ ID 4 y 5, y entre la SEQ ID 6 y 7. Los anticuerpos generados deben tener selectividad cruzada para LOX y LOXL2.

[0270] Aquellos anticuerpos dirigidos contra LOX/LOXL2 que son específicos para LOX o LOXL2, o con reactividad cruzada para LOX y LOXL2, se seleccionan como candidatos para desarrollo adicional.

Tabla 1: Péptidos inmunógenos LOX/LOXL2

| SEQ ID. | GEN | SECUENCIA | SELECTIVA |
|---------|--------|-------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 1 | LOX | SRVDGMVGDDPYNPYK | Sitio de la colagenasa IV |
| 2 | LOX | DTYERPRPGGRYRPG | Péptido maduro |
| 3 | LOXL2 | RRLRFSSQIHNNQSDFRPK NGR | Dominio de la enzima |
| 4 | LOX | EDTSCDYGYHRRFA | Dominio de la enzima, selectividad cruzada con la SEQ ID. 5 |
| 5 | LOXL 2 | EDTECEGDIQKNYE | Dominio de la enzima, selectividad cruzada con la SEQ ID. 4 |
| 6 | LOX | DPYYIQASTYVQKMSMYNL RC | Dominio de la enzima, selectividad cruzada con la SEQ ID. 7 |
| 7 | LOXL2 | nAEMVQQTTYLED RPMFML QC | Dominio de la enzima, selectividad cruzada con la SEQ ID. 6 |
| 8 | LOX | GSQYGPGRRRDPGA | Propéptido |

5 Ejemplo 10. Generación de anticuerpos con reactividad cruzada respecto a miembros de LOX y LOXL

[0271] Se generaron anticuerpos con reactividad cruzada respecto a miembros de LOX y LOXL inmunizando ratones con péptidos derivados de la región del extremo C muy conservada de las proteínas LOX/LOXL, que abarcan también el dominio catalítico. Los anticuerpos generados contra esta región reconocen la forma activa de LOX/LOXL.

[0272] Los dominios desde los cuales los péptidos generan anticuerpos se pueden derivar a partir del dominio catalítico, el dominio de unión a cobre, el dominio del cofactor de la lisil-tirosilquinona, y el dominio del tipo receptor de citocina. En la Tabla 2 se relacionan las secuencias del dominio de unión al cobre y del dominio catalítico y se utilizan para inmunizar ratones tal como se describe en el Ejemplo 9. De forma similar, se determinó la especificidad del anticuerpo generado mediante ELISA frente a las formas de longitud completa y procesada de LOX, LOXL, LOXL2, LOXL3, y LOXL4.

[0273] Se utilizaron también péptidos con aminoácidos aleatorizados de aminoácidos no conservados entre LOX, LOXL, LOXL2, LOXL3, y LOXL4 para inmunizar ratones para generar anticuerpos que tienen reactividad cruzada con las diversas formas de la proteína LOX/LOXL, por ejemplo LOX y LOXL, o para los 5 miembros de la familia LOX. En el Ejemplo 9 se describe la inmunización de ratones y la generación de anticuerpos de ratón y humanos.

[0274] Los anticuerpos LOX/LOXL que tienen reactividad cruzada para LOX y diversos miembros de LOXL se seleccionan como candidatos para desarrollo adicional

Tabla 2: péptidos inmunógenos LOX/LOXL

| SEQ ID. | GEN | SECUENCIA | DOMINIO |
|---------|-------|-------------------|--------------------|
| 9 | LOX | WEWHSCHQHYH | Unión a Cu |
| 10 | LOXL | WEWHSCHQHYH | Unión a Cu |
| 11 | LOXL2 | WIWHDCHRHYH | Unión a Cu |
| 12 | LOXL3 | WWWHECHGHYH | Unión a Cu |
| 13 | LOXL4 | WWWHQCHRHYH | Unión a Cu |
| 14 | LOX | DIDCQWIDITDVKPGNY | Dominio catalítico |
| 15 | LOXL | DIDCQWIDITDVQPGNY | Dominio catalítico |
| 16 | LOXL2 | DIDCQWVDITDVPPGDY | Dominio catalítico |
| 17 | LOXL3 | DIDCQWIDITDVKPGNY | Dominio catalítico |
| 18 | LOXL4 | DIDCQWVDITDVGPGNY | Dominio catalítico |

30 Ejemplo 11: Generación de anticuerpos con reconocimiento de la LOX/LOXL activa que reducen la EMT/promueven la MET

[0275] Las células de la EMT secretan LOX/LOXL activa. Los anticuerpos generados en los Ejemplos 9 y 10 se

utilizaron en el tratamiento de las células de la EMT de los Ejemplos 2, 3 o 4. Se determinaron a continuación las características de la EMT o de la MET de las células tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los anticuerpos que reconocen la LOX/LOXL2 activa deberían reducir la EMT y promover la MET de las células.

- 5 **[0276]** Se seleccionaron aquellos anticuerpos dirigidos contra LOX/LOXL que reducen la EMT y promueven la MET de las células como candidatos para desarrollo adicional.

Ejemplo 12. Inhibición de la actividad de LOX/LOXL mediante anticuerpos

- 10 **[0277]** Los anticuerpos generados a partir de los **Ejemplos 9 o 10** se utilizaron en los ensayos de actividad de LOX/LOXL tal como se describe en Fogelgren y col., J. Biol. Chem. 280: 24690-24697 (2005). De forma breve, la mezcla de reacción del ensayo de actividad de LOX/LOXL consiste en borato de sodio 50 mM (pH 8,2), urea 1,2 M, Amplex red 40 μ M, 0,1 unidades/ml de peroxidasa de rábano picante, y sustrato de 1,5-diaminopentano 10 mM (cadaverina). De forma alternativa, se llevó a cabo el ensayo Amplex Red en un tampón fisiológico tal como un
15 tampón fosfato a pH 7,5. La proteína, LOX/LOXL, se añadió a la mezcla de reacción en presencia o ausencia de BAPN 500 μ M o anticuerpos procedentes de los **Ejemplos 9 o 10**, y se incubó. El producto fluorescente se excitó a 560 nm, y se leyó la emisión a 590 nm (por ejemplo, BMG Labtechnologies Inc. Polarstar Optima). LOX/LOXL en presencia de BAPN sirve como control negativo, mientras que la ausencia de BAPN sirve como control positivo. La medida de la actividad se basa en la cantidad de fluorescencia.

- 20 **[0278]** Se seleccionaron como candidatos aquellos anticuerpos dirigidos contra LOX/LOXL que inhibían la actividad de LOX/LOXL para desarrollo adicional.

Ejemplo 13: Inhibición de la unión de LOX/LOXL con otros componentes de la matriz celular o extracelular por los anticuerpos dirigidos contra LOX/LOXL

- [0279]** Se utilizaron los anticuerpos generados a partir de los Ejemplos 9 o 10 en los ensayos de unión a ECM. Se llevaron a cabo los ensayos de unión en fase sólida tal como se describe en Fogelgren y col., J. Biol. Chem. 280: 24690-24697 (2005). Los pocillos de microplacas EIA/RIA de elevada unión a proteína (Coming) se revistieron con tropoelastina, colágeno de Tipo I, fibronectina soluble en plasma (pFN), fibronectina celular insoluble (cFN), laminina, o BSA durante la noche a 4^o C. Los pocillos se bloquearon, se lavaron, y a continuación se incubaron durante la
30 noche con una versión etiquetada de LOX/LOXL (por ejemplo, GST-LOX/LOXL) con o sin los anticuerpos dirigidos contra LOX/LOXL. Los pocillos se lavaron de nuevo y se detectó la cantidad de unión a LOX/LOXL mediante un anticuerpo primario dirigido contra la etiqueta de LOX/LOXL (por ejemplo, anticuerpo dirigido contra GST), seguido
35 por un anticuerpo secundario etiquetado con peroxidasa. A continuación se cuantificó la actividad de la peroxidasa con un kit fluorogénico de sustrato de peroxidasa (Pierce). Se llevaron a cabo las muestras por triplicado y se calcularon las constantes de disociación con software estadístico (por ejemplo, Prism3 de Graphad, Inc.).

- [0280]** Se llevaron a cabo también ensayos de unión en los que se utilizó LOX/LOXL para revestir los pocillos de las microplacas. Se añadieron los anticuerpos de los **Ejemplos 9 o 10** a los pocillos, antes de, o de forma simultánea con la tropoelastina, el colágeno de Tipo I, pFN, cFN, o BSA. Se midió la unión tal como se ha descrito anteriormente, en la que se detectaron las proteínas ECM con sus respectivos anticuerpos, o un anticuerpo contra la etiqueta, si se utilizó una forma etiquetada de la proteína ECM, para detectar la cantidad de la ECM unida.

- 45 **[0281]** La unión de LOX/LOXL con otras proteínas, tales como receptores celulares (por ejemplo, captación del receptor de la integrina beta I); BTK (agammaglobulinemia por tirosina cinasa de Bruton), u otras integrinas, también se llevó a cabo utilizando el ensayo anteriormente mencionado en el que se utilizaron proteínas ECM en vez de receptores celulares (por ejemplo, captación del receptor de la integrina beta I), BTK (agammaglobulinemia por
50 tirosina cinasa de Bruton), o se utilizaron otras integrinas.

- [0282]** Aquellos anticuerpos dirigidos contra LOX/LOXL que inhiben la unión de LOX/LOXL a las proteínas ECM, receptores, e integrinas se seleccionaron como candidatos para desarrollo adicional.

Ejemplo 14: Inhibición de la actividad de LOX

- 55 **[0283]** La actividad específica de LOX fue evidente sobre la superficie celular de las células NIH3T3. Se cuantificó la actividad con un procedimiento de ensayo fluorescente acoplado a la peroxidasa de rábano picante basado en la oxidación de Amplex Ultra red con un sustrato de 1,5-diaminopentano. La actividad de LOX se inhibió con el inhibidor irreversible de moléculas pequeñas, BAPN, con un anticuerpo monoclonal sensibilizado contra un péptido

LOX, y con un oligonucleótido de ARNip dirigido contra el ARNm de LOX. (FIGURA 15).

[0284] Se transfectaron células NIH 3T3 con ARNip de LOX 100 nM (Invitrogen Stealth, HSS106117, AUAACAGCCAGGACUCAAUCCCUGU) o control no dirigido. Se mezclaron 25 µl de Dharmafect® nº 3 (Dharmacon) con 1 ml de OPTIMEM I® (Invitrogen) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 50 µl de ARNip 20 µM, se mezclaron y la mezcla de la transfección se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación se añadió 1 ml de la mezcla de transfección a una suspensión de células tripsinizadas en medio de crecimiento que contenía 1×10^6 células, y la mezcla resultante se plaqueó en una placa de cultivo de 10 cm². Seis días después de la transfección, las células se tripsinizaron y se volvieron a plaquear en un formato de placa de 96 pocillos a 50.000 células/pocillo. Siete días después de la transfección, las células se lavaron 2x con PBS y se incubaron con 100 µl de la siguiente mezcla de reacción: Amplex Ultra Red® 100 µM (Invitrogen), diaminopentano 20 mM (Fluka), y peroxidasa de rábano picante 4 µg/ml (Sigma) en PBS. Se añadieron mAb dirigido contra BAPN y LOX a concentraciones finales de 1 mM y 15 µg/ml, respectivamente, inmediatamente antes de la adición de diaminopentano y HRP. La placa se leyó en un lector de placas Molecular Devices M5 a 37° C. El lector de placa se configuró en modo cinético para leer la fluorescencia (ex = 544 nm, em = 590 nm) durante aproximadamente 2,5 horas.

Ejemplo 15: Inhibición de la actividad de LOXL2

[0285] Todas las placas se obtuvieron de Corning. El anticuerpo secundario y el sustrato Pico eran de Pierce. El reactivo Amplex red era de Invitrogen. La peroxidasa de rábano picante (HRP), 1,5-diaminopentano, el antiespumante eran de Sigma. Todos los reactivos ProteOn eran de Bio-Rad. La LOXL2 era de R&D systems. Los anticuerpos utilizados en este estudio se produjeron en solución de anticuerpo o mediante ascites de Aragen Biosciences. El resto de reactivos fueron de la mayor calidad posible.

Ensayo mediante ELISA

[0286] Se determinó la unión del anticuerpo a LOXL2 utilizando un ELISA basado en luminiscencia. Se revistieron placas Corning blancas con 0,1 µg/ml de LOXL2 o el antígeno de interés en tampón borato 50 mM (pH 8,0) durante la noche a 4° C. Se lavaron las placas utilizando un lavador de placas Bio Tek y se bloquearon con leche desnatada al 5% en PBST (Tween-20 al 0,05%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBST (Tween-20 al 0,05%) y a continuación se usaron inmediatamente o se almacenaron a 4° C en un desecador para un uso futuro. El anticuerpo que se va a ensayar se diluyó en serie en PBST (Tween-20 al 0,01%) y se añadieron 100 µl de cada dilución por pocillo. Se incubaron las placas con un artículo de ensayo durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se lavaron con PBST (Tween-20 al 0,05%). La detección del anticuerpo (anticuerpo dirigido contra IgG de ratón conjugado con HRP) se diluyó 16000 veces en leche desnatada al 5% en PBST (tween-20 al 0,05%) y se aplicaron 100 µl por pocillo. Se incubaron las placas durante 1 hora con anticuerpo de detección y a continuación se lavaron con PBST (PBST al 0,05%). Se detectó la señal utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal ELISA pico de Pierce siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la luminiscencia utilizando un lector de placas Molecular Devices M5 con un tiempo de integración de 500 ms capturando todas las longitudes de onda. Se corrigió el fondo de los datos y se ajustó la dependencia de la señal de luminiscencia con la concentración del anticuerpo utilizando la ecuación de la isoterma de Langmuir utilizando el programa GraFit. En ejemplos en los que la concentración del antígeno era similar a la constante de disociación, se utilizó la ecuación cuadrática de la unión estrecha. Se obtuvieron valores de disociación notificados a partir de los ajustes de estas ecuaciones.

$$[PI] = \frac{B_{m\acute{a}x} * [L]}{K_D * [L]}$$

Ecuación de enlace fuerte

$$[PI] = B_{m\acute{a}x} \frac{([E]_r + [S]_r + K_D) - \sqrt{([E]_r + [S]_r + K_D)^2 - 4[E]_r[S]_r}}{2[E]_r}$$

Unión mediante SPR (resonancia de plasmón superficial)

[0287] Se midieron las afinidades de unión usando un instrumento ProteOn de Bio-Rad termostatzado a 25° C. Se determinaron las afinidades de unión utilizando dos procedimientos, que utilizan el acoplamiento de la amina, uno en el que se inmovilizó el anticuerpo y se añadió el antígeno (LOXL2), y otro en el que se inmovilizó el antígeno (LOXL2) y se añadió el anticuerpo. El anticuerpo o el antígeno se inmovilizaron en un chip de GLC utilizado en la relación 1:1 de NHS a EDC provisto del kit de inmovilización ProteOn. El chip se activó en primer lugar con una mezcla de NHS/EDC y a continuación, el antígeno o el anticuerpo a 1 µg/ml en tampón acetato, pH 4,5 se hicieron fluir sobre la superficie activada para acoplarse. Esto normalmente dio como resultado un acoplamiento de aproximadamente 500 RU. A continuación, la superficie del chip activado se protegió con la adición de etanolamina 1 M. Los chips acoplados se almacenaron a 4° C y se regeneraron con hidróxido de sodio 50 mM.

[0288] Se determinaron las constantes de disociación sondeando el chip acoplado con una dilución en serie de un anticuerpo o antígeno en PBST (Tween-20 al 0,05%). Se adquirieron los datos de los seis canales disponibles en el ProteOn utilizando un canal no acoplado como referencia. Los datos recogidos se analizaron utilizando un software gestor ProteOn de Bio-Rad.

Ensayos de cribado

[0289] Se escogieron los anticuerpos candidatos basándose en ensayos puntuales de ELISA. Se llevó a cabo el ELISA en múltiples antígenos mediante soluciones de anticuerpos y los anticuerpos que mostraban una fuerte señal ELISA para el antígeno de interés se seleccionaron para la caracterización adicional en ensayos enzimáticos. LOXL2 produce peróxido de hidrógeno cuando el sustrato de 1,5-diaminopentano se desamina y se regenera el enzima.

[0290] Se evaluaron los anticuerpos para su capacidad de inhibir la actividad enzimática utilizando un ensayo bioquímico que acopla la producción de peróxido (liberado por la LOXL2) a HRP y midiendo la conversión de Amplex red a un producto fluorescente. Se añadió el sobrenadante del hibridoma del anticuerpo (10 µl) a 40 µl de una mezcla de enzimas (borato de sodio 50 mM pH 8,0, 5 unidades/ml de HRP, LOXL2 125 nM, 10 ppm de antiespumante) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en una placa negra de área total de 96 pocillos. La reacción enzimática se inició con la adición de 50 µl de solución sustrato (borato de sodio 62,5 mM, reactivo Amplex red 100 µM, 1,5-diaminopentano 20 mM, 10 ppm de antiespumante) y se leyó en un lector de placas M5 de Molecular Devices a 37° C. El lector de placas se configuró para leer la fluorescencia (ex=544 nm, em=590 nm) en modo cinético durante 1 hora. Se registraron los datos como la pendiente de la respuesta a la fluorescencia frente al tiempo. Estas pendientes se compararon con una del control en la que se añadió el medio del hibridoma a la mezcla de enzimas. Las pendientes menores que las del control se consideraron inhibidores.

Determinaciones de la CI50

[0291] Se llevaron a cabo curvas de dosis respuesta para los anticuerpos seleccionados frente a LOXL2 utilizando el ensayo enzimático acoplado descrito anteriormente. Se creó una dilución en serie del anticuerpo (Tween-20 al 0,01%) y se añadieron 10 µl de este a 40 µl de la mezcla de enzimas (borato de sodio 50 mM pH 8,0, 5 unidades/ml de HRP, LOXL2 125 nM, 10 ppm de antiespumante) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en una placa negra de área total de 96 pocillo. Se inició la reacción enzimática con la adición de 50 µl de solución sustrato (borato de sodio 62,5 mM, reactivo Amplex red 100 µM, 1,5-diaminopentano 20 mM, 10 ppm de antiespumante) y se leyó en un lector de placas M5 utilizando las condiciones descritas anteriormente. Se representaron gráficamente las pendientes de la respuesta a la fluorescencia en función del tiempo frente a la concentración del anticuerpo y se ajustaron los datos a un ajuste de cuatro parámetros utilizando GraFit. El punto intermedio de esta representación gráfica es la CI50 aparente y es la concentración a la cual el cincuenta por ciento de la respuesta total (por ejemplo, **FIGURA 20**).

Modo de inhibición

[0292] Se llevó a cabo el modo de inhibición de anticuerpos contra LOXL2 utilizando el siguiente modelo descrito. En estos experimentos, se vigiló la dependencia de la velocidad en estado estacionario sobre la concentración de 1,5-diaminopentano en concentraciones crecientes de anticuerpos. El objetivo fue evaluar tanto la K_m del sustrato, k_{cat} o ambos cambios en la presencia del anticuerpo. Los datos recogidos se analizaron globalmente con Grafit utilizando el modelo que se muestra en la siguiente figura. El parámetro α describe el efecto del compuesto sobre la afinidad del sustrato. Un valor de α igual a uno describe una situación en la que el compuesto se une igualmente

bien a la enzima libre y al complejo enzima-sustrato (inhibición de tipo no competitivo). Los valores menores de uno describen una interacción en la que el compuesto se une al complejo enzima-sustrato (inhibición de tipo no competitivo). Los valores mayores de uno corresponden a la unión del compuesto a la enzima libre mejor que al complejo enzima sustrato (inhibición de tipo competitivo). Los valores de β describen el efecto del modulador sobre la velocidad de la enzima. Los inhibidores tienen valores menores de uno (para un inhibidor completo $\beta=0$) y los activadores tienen valores mayores que uno. K_A es la constante de disociación del compuesto, K_S es la constante de Michaelis para el sustrato y k es la velocidad catalítica de la enzima. Se determinaron las velocidades en estado estacionario a partir de la pendiente de la respuesta de la fluorescencia en función del tiempo, tal como se ha descrito anteriormente. Los datos se representaron gráficamente como la dependencia de la velocidad en estado estacionario sobre la concentración del sustrato (1,5-diaminopentano) a diversas concentraciones fijas de anticuerpo y se analizaron con GraFit (por ejemplo, **FIGURA 21A**, y utilizando un competidor directo, tal como se muestra en la **FIGURA 21B**)

Ejemplo 16: detección de LOX/LOXL mediante análisis de inmunotransferencia e inmunohistoquímica (IHC)

[0293] Se llevó a cabo el análisis de inmunotransferencia (transferencia western) mediante el lisado de células en tampón de lisis (por ejemplo, NaH_2PO_4 10 mM, Tris-HCl 10 mM, Urea 8 M, Tween-20 al 0,05%, pH 8,0; o EDTA, NP40, Tris, NaCl, PMSF y, "Cóctel inhibidor de la proteasa mini completo" (Roche, nº 11836153001); o "tampón de muestra SDS de Laemmli, 4X" (Boston BioProducts, nº BP-110R). El lisado (normalmente 15 – 25 μg de proteína total) se cargó en geles de Tris-Glicina al 4-12% (Invitrogen Carlsbad, CA) o geles de Bis Tris al 4-12% NuPAGE Noves (Invitrogen). Las proteínas fraccionadas por tamaño se transfirieron a una membrana de PVDF (Invitrogen Carlsbad, CA) o membranas de Nitrocelulosa (Invitrogen).

[0294] Se bloquearon las inmunotransferencias durante la noche a 4° C en BSA al 2%, leche enriquecida al 5% en PBS. Tras la incubación con anticuerpo primario dirigido contra LOX/LOXL (monoclonal o policlonal), las transferencias se incubaron con anticuerpos secundarios para permitir la detección, tal como un anticuerpo dirigido contra IgG de conejo conjugado con HRP" (GE Healthcare o Jackson Immunoresearch Lab), anticuerpo dirigido contra IgG de ratón conjugado con HRP" (GE Healthcare), o anticuerpo dirigido contra IgG de cabra conjugado con HRP" (Jackson Immunoresearch Lab), o anticuerpo de cabra conjugado con IRDye680 dirigido contra IgG de ratón, anticuerpo de burro conjugado con IRDye680 dirigido contra IgG de conejo (Rockland Inc.), siguiendo las condiciones recomendadas por los fabricantes. Se desarrollaron y detectaron señales quimioluminiscentes utilizando SuperSignal West Femto Max o Pico Max Sensitivity Substrate (Pierce) o utilizando alternativamente anticuerpo ELC dirigido contra IgG de ratón conjugado con HRP (Amersham) utilizando detección Chemiglow West (Alpha Innotech). De detectaron directamente anticuerpos secundarios marcados fluorescentemente.

[0295] Además de las inmunotransferencias preparadas a partir de tejidos, las inmunotransferencias precargadas comercialmente disponible contenían proteínas fraccionadas por tamaño aisladas de una gama de tejidos normales y tejidos tumorales (por ejemplo, de ProSci Incorporated, CA) se utilizaron para el análisis de la distribución de pesos moleculares de LOX/LOXL en tejidos normales y tejidos tumorales.

[0296] Se detectó la expresión de la proteína LOX/LOXL y la localización celular en tejidos normales y tejidos tumorales utilizando secciones de tejido y secciones de tejidos dispuestas en micromatrices de tejidos (disponibles, por ejemplo de Cybrdi, Pro Sci, y otras fuentes). Las muestras de tejidos se bloquearon para la unión no específica utilizando el BACKGROUND sniper (Biocare Medical) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo la recuperación del antígeno en una variedad de tampones, condiciones de pH, y temperaturas para asegurar una detección robusta en las secciones de tejido. Se evaluaron los anticuerpos (monoclonales o policlonales, generados utilizando ratones o conejos) dirigidos contra LOX/LOXL para la IHC utilizando líneas celulares tumorales. Los anticuerpos adecuados se incubaron con secciones de tejidos (normalmente, a una concentración de 1 – 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, diluidos en tampón de dilución (Biocare Medical (Concord, CA) o DAKO (Carpintería, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

[0297] Se llevó a cabo la detección utilizando el kit polimérico Rabbit-Probe HRP (MACH2 o MACH3 de Biocare Medical o EnVision de DAKO) o el kit polimérico Mouse-Probe HRP (MACH2 o MACH3 de Biocare Medical o EnVision de DAKO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De forma alternativa, se llevó a cabo la detección utilizando anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante dirigido contra IgG de ratón, conejo, o cabra (GE Healthcare o Jackson Immunoresearch Lab), o el kit Vectastain Elite ABC (anticuerpo dirigido contra IgG de ratón, conejo, o cabra, Vector laboratories) o un kit EnVision (anticuerpo dirigido contra ratón y conejo, DAKO), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 17. Detección de 2 formas de LOXL2

[0298] Se escindió LOXL2 y se detectó en virtud de su cambio en el peso molecular mediante transferencia Western (**FIGURA 16, 17**). Las dos formas se separaron mediante cromatografía (**FIGURA 18**), y se ensayó la actividad de ambas formas (**FIGURA 19**).

Ejemplo 18: Internalización y captación de LOX/LOXL2

[0299] Se cultivaron células Hs578t en DMEM que contenía FBS al 10% y 1x glutamina. Se sembraron las células en un porta de vidrio de 8 cámaras (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ) y se dejaron adherir durante la noche. Para obtener confluencia baja, las células se sembraron a 30-40.000 células por porta. Se utilizó la confluencia baja para la detección de Lox en el citosol 24 horas después. Para obtener confluencia alta, las células se sembraron a 100.000 células por porta. Se usó la confluencia alta para la detección de Lox asociada con la matriz y el colágeno aproximadamente 48-72 horas después.

[0300] El día siguiente, se añadió a las cámaras 1 µg/ml (concentración final en medio de crecimiento regular) de anticuerpo monoclonal M64 dirigido contra Lox o anticuerpo monoclonal (mAb) M20 dirigido contra Lox12. Para la captación continua, los mAb se incubaron con células en diferentes puntos temporales: por ejemplo, 3 horas, 8 horas, 24 horas (durante la noche). Después de una cantidad adecuada de captación continua, el medio se retiró y las células se enjuagaron con 1X PBS. Las células se fijaron en PFA al 4% (paraformaldehído) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras la fijación, las células se lavaron con 1X PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos y a continuación se detuvieron rápidamente en cloruro de amonio 50 mM a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las células se lavaron de nuevo con 1X PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos.

[0301] Las células se permeabilizaron añadiendo tampón de saponina (Saponina al 5%/BSA al 1% en PBS) a temperatura ambiente durante 20 minutos. El Ab de detección secundario (Anticuerpo de burro Alexa Fluor 488 dirigido contra IgG de ratón, Invitrogen, Carlsbad, Ca.) se añadió a temperatura ambiente en tampón de saponina y las células se incubaron durante 30-45 minutos. A continuación se lavaron las células 3X en tampón de saponina. Se montaron los portas con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, Ca).

[0302] Para detectar la detección del colágeno, se incubó un anticuerpo dirigido contra colágeno (1:50, Anticuerpo policlonal de conejo Calbiochem de tipo I dirigido contra colágeno, Gibbstown, NJ) una hora antes de fijar las células con PFA al 4%. El Ab secundario para el colágeno fue Anticuerpo Cy3 de burro dirigido contra IgG de conejo (ImmunoJacksonLabs, West Grove, Pa).

Silenciamiento del ARNip de Lox y Lox12 en células Hs578t:

[0303] Se cultivaron células Hs578t en DMEM que contenía FBS al 10% y 1x glutamina en placas de cultivo de tejido de 10 cm. Se hicieron crecer las células hasta que tuvieron aproximadamente un 75% de confluencia. La reacción/mezcla de transfección se configuró el día que las células alcanzaron un 75% de confluencia. Se prepararon dos mezclas. En un tubo cónico de 15 ml, se mezclaron 60 µl de ARNip 20 µM con 1 ml del óptimo (la concentración final del ARNip era de 100 nM). En otro tubo cónico de 15 ml, se mezclaron 30 µl de reactivo de transfección Dharmafect™ 3 (Thermo Scientific, Chicago, Illinois) con 1 ml de OptiMEM™. Se incubaron los dos tubos a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de 5 minutos, los contenidos de ambos tubos se mezclaron en uno. La mezcla se pipeteó cuidadosamente arriba y abajo, y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente.

[0304] Se tripsinizaron células Hs578t y se volvieron a suspender en 10 ml de medio completo y se añadieron a una placa de cultivo de tejido de 10 cm. Para cada condición de ARNip, se añadieron 2 ml de la mezcla de transfección combinada a la placa de 10 cm. Las placas se agitaron suavemente y se colocaron en la estufa incubadora a 37° C y CO2 al 5% durante la noche. No fue necesario cambiar el medio y se mantuvo en las células durante muchos días. Para los estudios inmunofluorescentes (**FIGURAS 23, 24, 35**), la transfección procedió durante al menos 5 días para asegurar un silenciamiento suficiente y una disminución de los niveles de proteínas.

Resumen

[0305] Los resultados demuestran que a una baja confluencia celular, LOX y LOXL2 no siguen secretados en la matriz extracelular sino que en su lugar se pueden volver capturar por las células tumorales (a medida que el anticuerpo se internaliza). La especificidad de estos modelos de tinción (**FIGURAS 23, 24, 25**) estaba respaldada en

controles emparejados con silenciamiento del ARNip. A una elevada confluencia celular, LOX y LOXL2 se detectaron ahora fácilmente en el exterior de las células en la matriz extracelular, con aparentemente poca recaptación. Los modelos de tinción estaban respaldados por controles emparejados con silenciamiento del ARNip. Se obtuvieron resultados similares de internalización y captación de mAb dirigidos contra Lox y contra Lox12 y su localización simultánea con colágeno para el tratamiento con mAb dirigido contra Lox12 de células en lugar del silenciamiento del ARNip.

Ejemplo 19: Evolución temporal de la internalización y la captación de LOX/LOXL2

10 **[0306]** La evolución temporal se inició en las células que eran ya confluentes (día 0). La línea celular usada era la línea celular Hs578t de tumor de mama, que expresa LOX y LOXL2.

Protocolo IHC (células en portas con cámara; según En Vision+ System-HRP de DAKO):

15 **[0307]** Todas las etapas se llevaron a cabo a RT (temperatura ambiente), la concentración de anticuerpo primario era de 5 µg/ml para el anticuerpo dirigido contra LOX y de 15 µg/ml para el anticuerpo dirigido contra LOXL2. Las células se lavaron con PBS (x 3). A continuación se llevó a cabo un bloqueo de peroxidasa (5 min) antes de lavar de nuevo con PBS (x 3). A continuación las células se incubaron con anticuerpo primario diluido en Tris-HIC 0,05 M, pH 7,6 / BSA al 1% (30 min). Se utilizaron los anticuerpos monoclonales M64 y M20, dirigidos contra LOX y LOXL2, respectivamente (véase por ejemplo la **FIGURA 26**). A continuación las células se lavaron con PBS (x 3) antes de fijarse con PFA al 4% (10 min). A continuación las células se lavaron con PBS (x 3) añadiendo antes el polímero marcado con peroxidasa (30 min). A continuación las células se lavaron con PBS (x 3). El Sustrato-Cromógeno (20 µl de DAB por 1 ml de Tampón sustrato) se añadió a continuación durante 5-10 min. A continuación, las células se lavaron con agua destilada antes de la contratinción con hematoxilina (opcional a veces), deshidratada y se montaron permanentemente con Entellan.

Protocolo de tinción Picro-Sirius Red (Sirius Red F3B):

30 **[0308]** Se usó la tinción Sirius red para la histoquímica del colágeno. Las células se fijaron con PFA al 4% (10 min), sin embargo, la fijación no es crítica. A continuación las células se tiñeron con Picro-Sirius red (Sirius Red al 0,1% en ácido pícrico saturado (Electron Microscopy sciences, nº de catálogo 26357-02) durante 1 hora a RT. A continuación se lavaron en 2 cambios de agua acidificada (5 ml de ácido acético y 1 l de agua destilada) antes de deshidratarse gradualmente en series de etanol, y montándose.

35 **Resultados**

[0309] Tal como se muestra en la FIGURA 27, en el Día 0, LOX y colágeno I ya se habían secretado y asociado con la matriz, pero LOXL2 se localizó en el citosol y no se había secretado ni asociado aun con la matriz. En el Día 5, se secretaron más LOX y colágeno I, y LOXL2 se había secretado/asociado con la matriz. En el Día 9, LOX, LOXL2, colágeno I y Sirius red mostraron modelos de tinción similares, que indican que LOX, LOXL2 y colágeno I se localizaban simultáneamente en las mismas regiones. En el día 11, se detectó un cambio en el modelo de tinción de LOX, indicando que menos LOX se estaba secretando y/o asociando con la matriz. LOXL2, colágeno I y la tinción Sirius Red, sin embargo, siguieron siendo aún similares entre sí y no se detectó ningún cambio real en los modelos de tinción. Los modelos de tinción de todas las proteínas en el Día 13 y el Día 15 fueron similares a los del Día 11. Basándose en estos resultados, hubo algunas diferencias en la sincronización de la secreción de LOX y LOXL2, respectivamente. La secreción de LOX y LOXL2 parece estar regulada y relacionada con la confluencia celular. La sincronización de la secreción puede regular la disponibilidad de la LOX y LOXL2 activa extracelular, que a la vez, puede iniciar la reticulación del colágeno.

50 **[0310]** Este ejemplo, combinado con el resto de Ejemplos dados a conocer en el presente documento, demuestra que la secreción de LOX y LOXL2 está muy regulada. A baja densidad celular, los datos dados a conocer en el presente documento indican que la LOX y la LOXL2 secretadas vuelven a ser captadas rápidamente por las células (a medida que se detectan los anticuerpos específicos de LOX y LOXL2 en el interior de la célula, sugiriendo que están eficazmente internalizados). A una elevada densidad celular, LOX y LOXL2 ya no se vuelven a captar pero se encuentran asociadas con la matriz de colágeno (extracelular) tal como se ha determinado por la localización de los anticuerpos específicos de LOX y LOXL2. El análisis IHC de células tumorales y de células de fibrosis hepática indica que se puede producir una regulación similar de LOX y LOXL2, con diferentes distribuciones de LOX/LOXL intracelular y extracelular en las zonas de la enfermedad.

Ejemplo 20. Expresión de LOX y LOXL2 en el tejido

[0311] La cámara de exposición y las soluciones usadas son de BioCareMedical (Concord, Ca) a no ser que se indique otra cosa. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a temperatura ambiente a no ser que se indique otra cosa.

[0312] La cámara de exposición se rellenó con 500 ml de agua destilada (diH₂O). Un recipiente de portas se rellenó con 200 ml de solución de recuperación de antígeno de Exposición Universal y otro recipiente de portas se rellenó con 200 ml de Enjuague Caliente; los portas de la micromatriz de tejido (TMA) (Cybrdi, Frederick, Maryland) se colocaron en el recipiente con la solución de exposición y a continuación se colocaron en la cámara de exposición. Se configuraron los ajustes a 80° C durante 30 minutos para los TMA de mama. Una vez que la temperatura alcanzó los 90° C, los portas se retiraron de la solución de recuperación del antígeno de exposición y se colocaron en el recipiente con enjuague caliente. La temperatura en el recipiente de enjuague caliente se abatió lentamente intercambiando 1/3 del enjuague caliente con 1/3 de diH₂O cada dos minutos hasta que la temperatura en el interior del recipiente estaba a la temperatura ambiente. A continuación los portas se enjuagaron una vez con diH₂O en PBS con Tween-20 al 0,1%.

[0313] Los portas se trataron con Peroxidasa-1 durante 5 minutos y a continuación se enjuagaron una vez en PBS durante 2 minutos. A continuación se bloqueó el fondo de los portas con SNIPER durante 5 a 10 minutos y a continuación se enjuagaron una vez en PBS durante 2 minutos. El anticuerpo primario (Ab) se diluyó en el Diluyente Universal Da Vinci Green. Se utilizaron 5 µg/ml de anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra Lox12 y 3 µg/ml de anticuerpo M64 dirigido contra Lox. Los portas se incubaron con los anticuerpos primarios durante 2 horas y a continuación se enjuagaron 3 veces en PBS-Tween-20, 2 minutos cada enjuague. Se usó el kit polimérico Mach3 para la detección del antígeno añadiendo sonda de ratón o de conejo durante 20 minutos. A continuación, los portas se enjuagaron una vez con PBS-Tween-20 y esto fue seguido por la adición de polímero de ratón o de conejo durante 20 minutos. A continuación los portas se enjuagaron 5 veces en PBS-Tween-20, 2 minutos para cada lavado. Se añadió cromógeno DAB a los portas durante 7 minutos y se enjuagaron una vez en diH₂O. Se añadieron a los portas las motas de DAB durante un minuto, y se enjuagaron una vez en diH₂O. A continuación, los portas se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos a 1 minuto y a continuación se enjuagaron con agua durante 5 minutos y a continuación siguió una deshidratación con concentraciones graduales de alcohol. Los portas se montaron con medio de montaje entellan (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pa). La expresión del tejido es tal como se muestra en las **FIGURAS 28 y 29**.

Ejemplo 21: Expresión de LOX y LOXL2 en adenocarcinoma de pulmón

[0314] Se llevó a cabo el análisis mediante RT-PCR de LOX y LOXL2 en adenocarcinoma de pulmón. Se llevó a cabo el análisis en tumores primarios, pero algunos estaban asociados con metástasis o recurrencia. Los datos son la relación entre tumor y una pieza correspondiente de tejido "normal" adyacente que no es necesariamente completamente normal, los datos del transcrito individual para el tumor y el tejido normal se representan gráficamente en la **FIGURAS 31 y 32**. LOXL2 se expresó en exceso en aproximadamente 4-5 de 10 tumores y mostró tendencia a asociarse con tumores conocidos por estar asociados a la metástasis de nódulos linfáticos u otras recurrencias/metástasis (**TABLA 3**). En la **TABLA 4** se relacionan los cebadores y las sondas utilizadas.

Tabla 3: Patología del Adenocarcinoma de Pulmón

| | Muestra | Macho/ hembra | | | | | | |
|--------------------------|---------|------------------|--------------------------------------------------------|------------------------|-----|----|---|-------------------------------------|
| Adenocarcinoma de pulmón | 304T | M | metástasis nodular de tumor pulmonar poco diferenciada | pT1, NO, M1 | III | 21 | * | Alta LOXL2, LOXL1, LOX |
| | 304N | M | | | | 22 | | |
| | 298T | F | Moderadamente diferenciada | pT1, NO, MX | | 23 | | |
| | 298N | F | | | | 24 | | |
| | 386T | M | Mal diferenciada | pT2, 1B, NO, MO | III | 25 | | |
| | 386N | M | | | | 26 | | |
| | 417T | M | Mala; no invasiva, primaria | pT2, 1B, NO, MX | III | 27 | * | Alta LOXL2, LOX |
| | 417N | M | | | | 28 | | |
| | 423T | M | Mal diferenciada | <i>Tumor recurrido</i> | 3 | 29 | * | Alta LOXL2, LOX |
| | 423N | M | | | | 30 | | |
| | 457T | M | Mod. a mal diferenciada | pT4, IIIB, N1, MX | 2 | 31 | | Alta LOXL2, alta "adyacente normal" |
| | 457N | M | | | | 32 | | |
| | 620T | M | Bien diferenciada | pT2, NO, MX | I | 33 | | |
| | 620N | M | | | | 34 | | |
| | 794T | M | Moderadamente diferenciada | pT1, II, NO, MX | II | 35 | | |
| | 794N | M | | | | 36 | | |
| | 873T | M | Mal diferenciada | pT2, IIB, N1, MX | III | 37 | * | Alta LOXL2, |
| | 873N | M | | | | 38 | | |
| | 1294T | F | Moderadamente diferenciada | NO, MX | II | 39 | | |
| | 1294 | F | | | | 40 | | |

Tabla 4: Secuencias qRT-PCR

| Nombre corto | Seq de Ref | Secuencia | Sonda | Inactivador |
|-------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------|-------------|
| LOX LOX LOX | <u>NM_002317</u> <u>NM_002317</u> <u>NM_002317</u> | CTTGACTGGGGAAGGGTCTG AAAACGGGGCTCAAATCACG ATCCACCCCTTGGCATTGCTTGGT | FAM | BHQ-1 |
| LOXL1 LOXL1 LOXL1 | <u>NM_005576</u> <u>NM_005576</u> <u>NM_005576</u> | AGCAGACTTCCTCCCAACC CAGTAGGTCGTAGTGGCTGAAC CACGGCACACCTGGGAGTGGCAC | FAM | BHQ-1 |
| LOXL2 LOXL2 LOXL2 | <u>NM_002318</u> <u>NM_002318</u> <u>NM_002318</u> | GGGGTTTGTCCACAGAGCTG ACGTGTCACTGGAGAAGAGC TGGAGCAGCACCAAGAGCCAGTCT | FAM | BHQ-1 |
| LOXL3 LOXL3 LOXL3 | <u>NM_032603</u> <u>NM_032603</u> <u>NM_032603</u> | GTGTGCGACAAAGGCTGGAG CCGCGTTGACCCTCTTTTCG AAGCCCAGCATCCCGCAGACCAC | FAM | BHQ-1 |
| LOXL4 LOXL4 LOXL4 | <u>NM_032211</u> <u>NM_032211</u> <u>NM_032211</u> | CTTACCACACACATGGGTGTTTC TCAAGCACTCCGTAACGTGTGG CCTTGGAAGCACAGACCTCGGGCA | FAM | BHQ-1 |
| RPL19 RPL19 RPL19 | <u>NM_000981</u> <u>NM_000981</u> <u>NM_000981</u> | CCGGCTGCTCAGAAGATAC TTCAGGTACAGGCTGTGATACAT TGGCGATCGATCTTCTTAGATTACAG | FAM | BHQ-1 |
| LOX LOX LOX | <u>NM_010728</u> <u>NM_010728</u> <u>NM_010728</u> | CAAGAGGGAAGCAGAGCCTTC GCACCTTCTGAATGTAAGAGTCTC ACCAAGGAGCACGCACCACAACGA | FAM | BHQ-1 |
| LOXL1 LOXL1 LOXL1 | <u>NM_010729</u> <u>NM_010729</u> <u>NM_010729</u> | GGCCTTCGCCACCACCTATC GTAGTACACGTAGCCCTGTTCG CCAGCCATCCTCCTACCCGCAGCA | FAM | BHQ-1 |
| LOXL2 LOXL2 LOXL2 | <u>NM_033325</u> <u>NM_033325</u> <u>NM_033325</u> | GCTATGTAGAGGCCAAGTCCTG CAGTGACACCCAGCCATTG TCCTCCTACGGTCCAGGCGAAGGC | FAM | BHQ-1 |
| LOXL3 LOXL3 LOXL3 | <u>NM_013586</u> <u>NM_013586</u> <u>NM_013586</u> | GCAAGGAGAGAATAGACAGAGAAG AGCATGGTGTCTCATTCAATAAG ACATCCACCCATCCCATCCACCC | FAM | BHQ-1 |
| LOXL4 LOXL4 LOXL4 | <u>NM_053083</u> <u>NM_053083</u> <u>NM_053083</u> | CAAGACAGGTCCAGTAGAGTTAGG AGGTCTTATACCACCTGAGCAAG ACAGAGCACAGCCGCCTCACTGGA | FAM | BHQ-1 |
| RPL19 RPL19 RPL19 | <u>NM_009078</u> <u>NM_009078</u> <u>NM_009078</u> | AGAAGGTGACCTGGATGAGAA TGATACATATGGCGGTCAATCT CTTCTCAGGAGATACCGGGAATCCAAG | FAM | BHQ-1 |

Ejemplo 22: Modelo animal para nefropatía diabética/fibrosis renal

5

[0315] Ratones transgénicos que expresan en exceso el represor temprano inducible del AMPc presentan diabetes grave y presentan hipertrofia glomerular, engrosamiento de la membrana basal glomerular y lesiones escleróticas. Estos ratones se pueden utilizar como un modelo de la nefropatía diabética. Los compuestos descritos en el presente documento se pueden administrar a este sistema modelo y analizarse para determinar su capacidad de evitar, tratar, y/o mejorar la fibrosis renal.

10

[0316] Se sensibilizaron ratones transgénicos con los protocolos y directrices establecidas para experimentos animales. El tamaño del grupo de tratamiento, los regímenes, y los controles se establecieron basándose en las dosis y en los puntos temporales de administración anteriormente identificados para los inhibidores de LOX/LOXL. Se vigilaron los ratones y/o se sacrificaron en puntos temporales predeterminados a lo largo del marco temporal experimental para los análisis histológicos y bioquímicos.

15

[0317] Los análisis histológicos incluyen análisis microscópicos e inmunohistoquímicos de secciones del riñón. Se identificaron el área superficial glomerular y el número de glomérulos mediante la tinción bioquímica y los análisis microscópicos establecidos. Se determinó el engrosamiento de la membrana basal glomerular mediante los procedimientos establecidos para el microscopio de electrones de las secciones del riñón.

20

5 [0318] Se vigilaron también las variables del suero y orina para la determinación de la actividad/insuficiencia renal. Se determinaron los niveles de glucosa e insulina en sangre mediante las metodologías establecidas que incluyen ELISA y HPLC. Se vigilaron también las proteínas del suero tales como la creatinina y la albúmina mediante los ensayos establecidos. Se evaluaron las muestras de orina para los niveles de proteínas incluyendo la albúmina y la creatinina. Se utilizaron los ensayos establecidos para la detección de proteínas en la orina, incluyendo ELISA y HPLC.

10 [0319] Utilizando un sistema de modelo animal tal como el modelo de nefropatía diabética en ratón descrito anteriormente, se pueden ensayar los compuestos dados a conocer en el presente documento para la prevención, el tratamiento, y/o la mejora de las fibrosis renales.

Ejemplo 23: Modelo animal para la isquemia /infarto de miocardio, fibrosis y remodelación de la ECM

15 [0320] Se alojaron ratas Wistar macho y se manipularon según las directrices y protocolos actuales de manipulación animal. Se establecieron el tamaño del grupo de tratamiento, los regímenes, y los controles basándose en las dosis y en los puntos temporales de administración anteriormente identificados para los inhibidores de LOX/LOXL. Las ratas que se someten a lesión de isquemia/reperfusión se vigilaron y/o sacrificaron en puntos temporales predeterminados seguidos por rayos x, formación de imágenes microCT, examen de tejido microscópico, y análisis inmunohistoquímicos.

Protocolo de lesión de isquemia/reperfusión

25 [0321] Se sometieron a anestesia las ratas y se colocaron en ventilación. Los corazones se expusieron quirúrgicamente y se colocó un ocluser coronario minineumático (sistema de oclusión basado en catéter) alrededor de la arteria coronaria deseada. A continuación se cerró el tórax y el catéter-ocluser y la vía venosa se exteriorizaron entre las escápulas. Tras la cirugía, se dejó que los animales se recuperaran durante cinco días antes de iniciar el protocolo de isquemia/reperfusión.

30 Isquemia

[0322] Se implementó la isquemia con el catéter-ocluser con un programa que incluye al menos una oclusión de preacondicionamiento durante 20 segundos seguida por 5 minutos de recuperación, y al menos una oclusión durante 2 minutos, seguida por 5 minutos de recuperación. Posteriormente, el tiempo de oclusión puede variar hasta 35 30 minutos. La duración del protocolo isquémico puede variar, con una duración típica del protocolo de 4 semanas. Se implementó la isquemia una vez por semana, y se vigiló la función cardiaca mediante ecocardiografía durante la totalidad del protocolo. Se sometieron a eutanasia las ratas al término del protocolo, y los corazones se extirparon y se examinaron para determinar la microvasculatura, el tamaño y la función de la cámara, y la extensión de la fibrosis. Se administraron los inhibidores de LOX/LOXL en puntos temporales y dosificaciones predeterminados durante la 40 totalidad del protocolo de la isquemia. Se administraron dosificaciones crecientes y con un aumento de las frecuencias de administración en agrupamientos suficientes para establecer toxicidades y eficacias limitantes de la dosis. Los animales del control y los protocolos se mantuvieron a lo largo de todos los protocolos.

Análisis

45 [0323] Se determinó el tamaño del ventrículo a través del registro de las vistas del eje corto del ventrículo mediante ecocardiografía durante el protocolo. Se analizaron las áreas diastólica y sistólica, definidas como las áreas mínima y máxima de la cavidad del ventrículo durante la fase cardiaca, se determinó el flujo coronario y la microvasculatura de los corazones extirpados mediante una variedad de técnicas de formación de imágenes y tinción que incluían microCT y rayos x. Se determinó la fibrosis de las cámaras mediante seccionamiento del tejido 50 cardiaco y tinción del tricroma u otra tinción establecida para el tejido cardiaco. Se llevó a cabo también la microscopía de la sección transversal y el análisis histológico para la evaluación del volumen, tamaño del ventrículo, y el adelgazamiento de la pared del ventrículo.

55 [0324] Utilizando un sistema de modelo animal tal como el sistema de remodelación de la ECM cardiaca descrito anteriormente, los compuestos descritos en el presente documento se pueden ensayar para la prevención, el tratamiento, y/o la mejora de la fibrosis cardiaca y la remodelación de la ECM cardiaca.

Ejemplo 24. Modelo animal para la fibrosis pulmonar y la remodelación de la ECM

- [0325]** La fibrosis pulmonar inducida por bleomicina es un modelo normalizado para la evaluación de la fibrogénesis pulmonar que incluye IPF, neumonía intersticial, y SDRA. Ratas Wistar macho se alojaron y se manipularon según las directrices y protocolos de manipulación animal. Se establecieron el tamaño del grupo de 5 tratamiento, los regímenes y los controles basándose en las dosis y puntos temporales de administración anteriormente identificados para los inhibidores de LOX/LOXL. Se inyectaron las ratas intratraquealmente con bleomicina a las dosificaciones establecidas (normalmente 5 mg/kg). Los animales del control se mantuvieron a lo largo del periodo de tratamiento.
- 10 **[0326]** Tras la administración de la bleomicina, a continuación se administró a los grupos de ensayo el inhibidor de LOX/LOXL predeterminado y se vigilaron y/o sacrificaron en los puntos temporales predeterminados para la evaluación de las fibrosis pulmonares. Los periodos de ensayo pueden variar, siendo un periodo de ensayo a modo de ejemplo de 4 semanas. Tras el sacrificio, los pulmones de las ratas se examinaron para establecer la fibrosis y el contenido de colágeno. Las secciones de pulmón de rata se tiñeron y se examinaron mediante los procedimientos de tinción establecidos y el microscopio para la presencia y la extensión de la fibrosis. Adicionalmente, se determinó 15 el contenido de colágeno de los pulmones de las ratas mediante ensayos establecidos tales como el ensayo de la hidroxiprolina.
- 20 **[0327]** Utilizando un sistema de modelo animal tal como el modelo animal de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina descrito anteriormente, se pueden ensayar los compuestos descritos en el presente documento para la prevención, el tratamiento, y/o la mejora de la fibrosis pulmonar.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la proteína 2 de tipo lisil-oxidasa (LOXL2) para uso en un procedimiento para tratar la fibrosis;
- 5 en el que el inhibidor de la LOXL2 es un anticuerpo dirigido contra LOXL2 o su fragmento de unión a antígeno, un ARNip, un shARN o un polinucleótido de sentido contrario.
2. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fibrosis se selecciona entre
- 10 fibrosis cardiaca, formación de la cicatriz dérmica, queloides, fibrosis hepática, silicosis, asbestosis, fibrosis renal, nefropatía diabética, escleroderma, glomeruloesclerosis y enfermedad de Alzheimer.
3. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la fibrosis cardiaca está asociada con hipertensión, enfermedad cardiaca hipertensiva, infarto de miocardio, aterosclerosis o restenosis.
- 15 4. El inhibidor para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la fibrosis se produce como una complicación de hemocromatosis, enfermedad de Wilson, alcoholismo, esquistosomiasis, hepatitis vírica, obstrucción del conducto biliar, exposición a toxinas o un trastorno metabólico.
- 20 5. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la fibrosis es fibrosis pulmonar.
6. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la fibrosis pulmonar se selecciona entre fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial idiopática, síndrome de dificultad respiratoria aguda, alveolitis fibrosante criptogénica, neumonía intersticial fibrosante crónica, enfermedad pulmonar intersticial, y enfermedad
- 25 pulmonar parenquimal difusa.
7. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la fibrosis pulmonar es fibrosis pulmonar idiopática.
- 30 8. El inhibidor para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el inhibidor es un anticuerpo dirigido contra LOXL2 o su fragmento de unión a antígeno.
9. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 35 10. El inhibidor para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el inhibidor es un anticuerpo dirigido contra LOXL2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a una región de la LOXL2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre una cualquiera de las SEQ ID NOS: 3, 5, 7, 11 y 16.
- 40 11. El inhibidor para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en el que el inhibidor es un inhibidor no competitivo de LOXL2.
12. El inhibidor para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la LOXL2 es
- 45 una forma madura de LOXL2 resultante del procesamiento proteolítico.
13. El inhibidor para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el inhibidor se utiliza en combinación con un agente antineoplásico biológico.
- 50 14. El inhibidor para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el inhibidor se utiliza en combinación con un agente quimioterapéutico.
15. El inhibidor para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el inhibidor se utiliza en combinación con un agente antiangiogénico.
- 55 16. El inhibidor para uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el inhibidor se utiliza en combinación con un agente antifibrótico.

FIG. 1

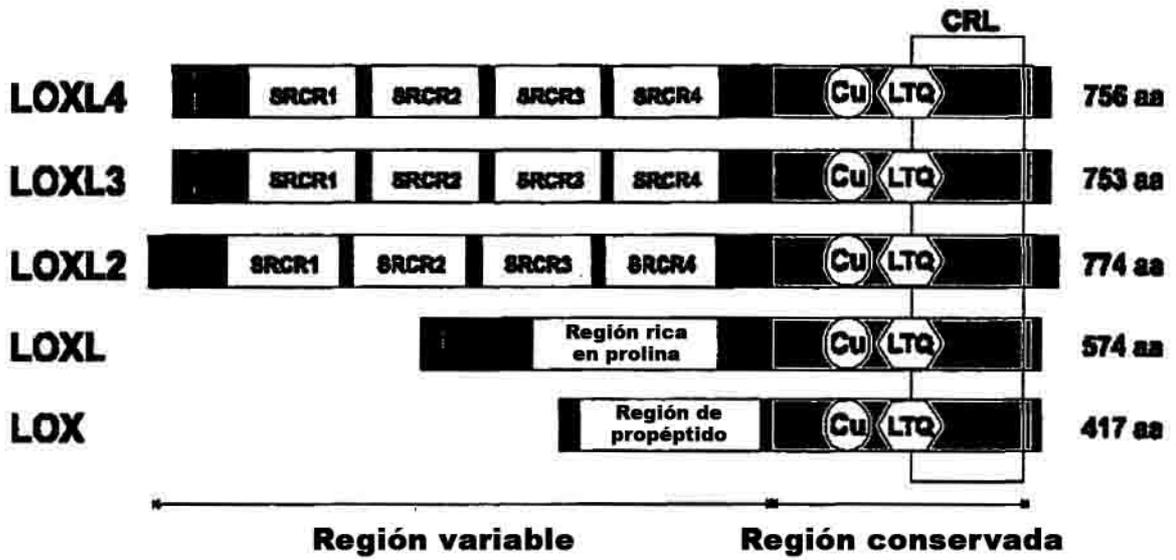
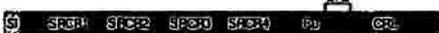


FIG. 2

**Familia del multigén LOX:
Organización genómica y proteínica**

| Gen | Cromosoma (ubicación y organización del gen) | Dominios de proteína | Secuencia de codificación de la proteína (longitud y tamaño) | Actividad catalítica (que se puede inhibir mediante β APN) | Referencia |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>LOX</i> | 7 exones 5q23:3-31,2 que se extienden en 15 Kb |  | proteoenzima de 417 aminoácidos y 50 kDa; proteína activa de 32 kDa | + | Hámalainen y col, 1991; Mriani y col, 1992; Hámalainen y col, 1993 |
| <i>LOXL</i> | 7 exones 15q22, que se extienden en 25 Kb |  | Polipéptido de 574 aminoácidos y 63 kDa | + | Kim y col., Szabo y col, 1997; Borci y col., 2001 |
| <i>LOXL2</i> | 11 exones 8p21,2-21,3 |  | Polipéptido de 774 aminoácidos y 87 kDa | + (no se puede inhibir mediante β APN) | Murano y col., 1991; Saito y col., 1997; Jourdan-Le Saux y col., 1999; Vadasz y col., 2005; |
| <i>LOXL3</i> | 14 exones 2p13,3 que se extienden en 21 Kb, variante de corte y empalme LOXL3sv1 (10 exones Δ exones 1, 2, 3, 4, 5) |  | Polipéptido de 753 aminoácidos y 80 kDa; 392 aminoácidos y 44 kDa | + | Jourdan-Le Saux y col., 2001; Maki y Kivirikki, 2001; Huang y col., 2001; Lee y Youngho, 2006 |
| <i>LOXL4</i> | 14 exones 10q24 |  | Polipéptido de 756 aminoácidos y 82 kDa | + | Asuncion y col., 2001; Kim y col., 2003; |

S. Payne y col., (2007). J. Cellular Biochemistry

FIG. 3

**Transición epitelial-mesenquimal (EMT):
papel en la invasión y metástasis**

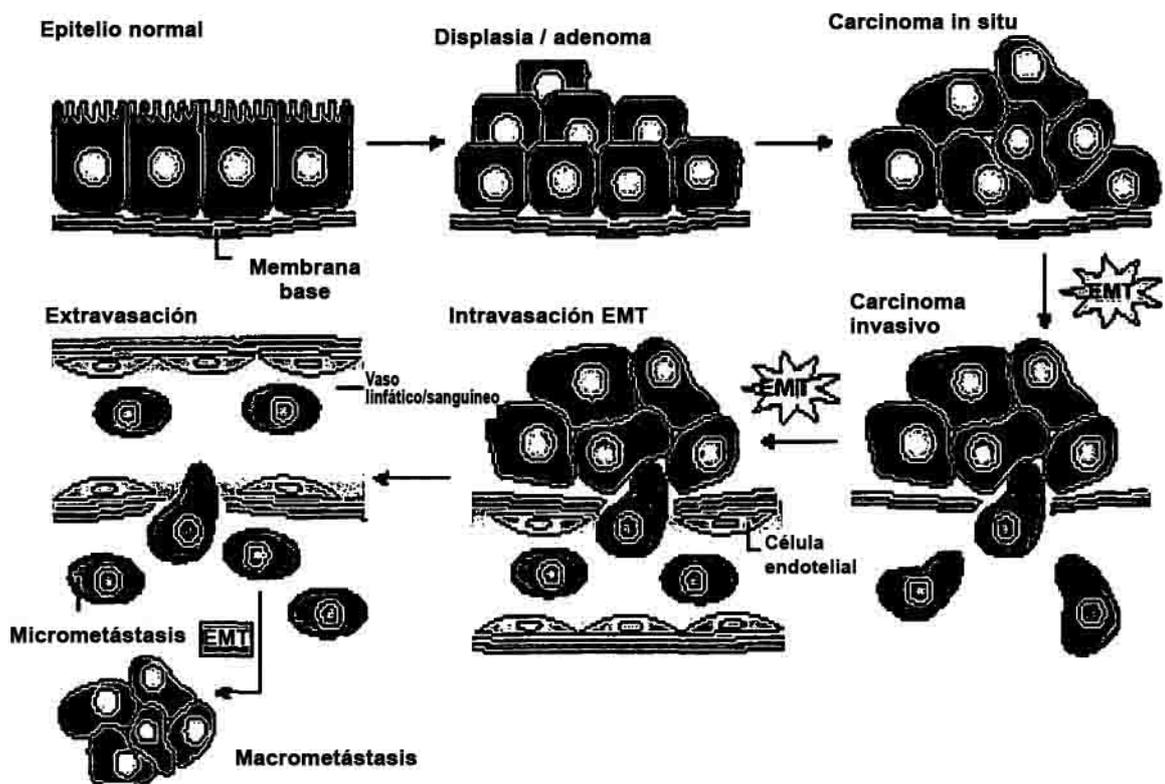


FIG. 4

Marcadores EMT y MET

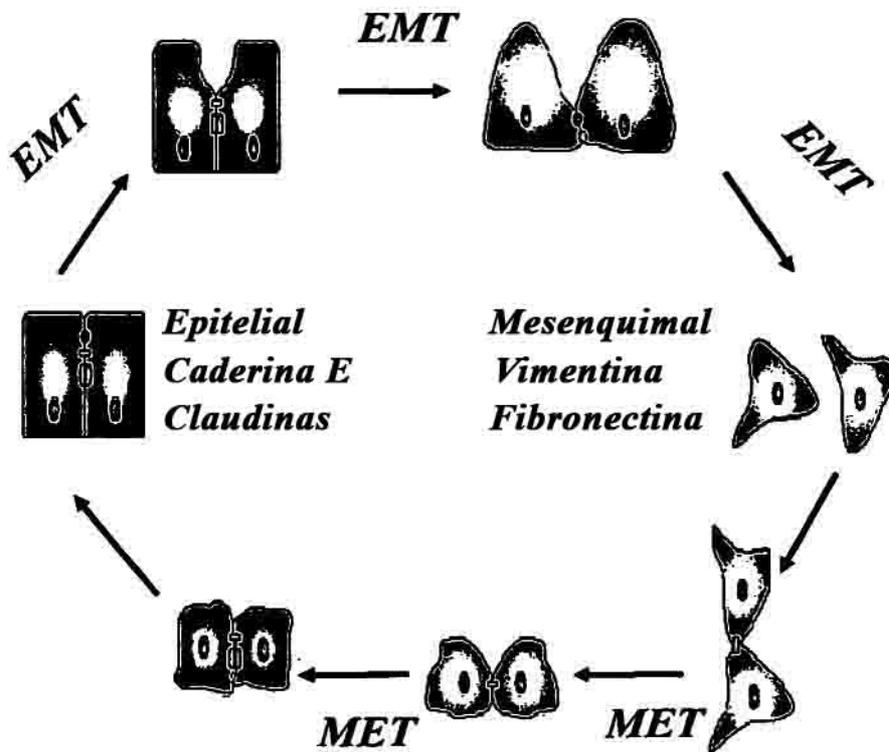


FIG. 5

LOX / LOXL y EMT : alteran el perfil de sensibilidad del fármaco en células tumorales

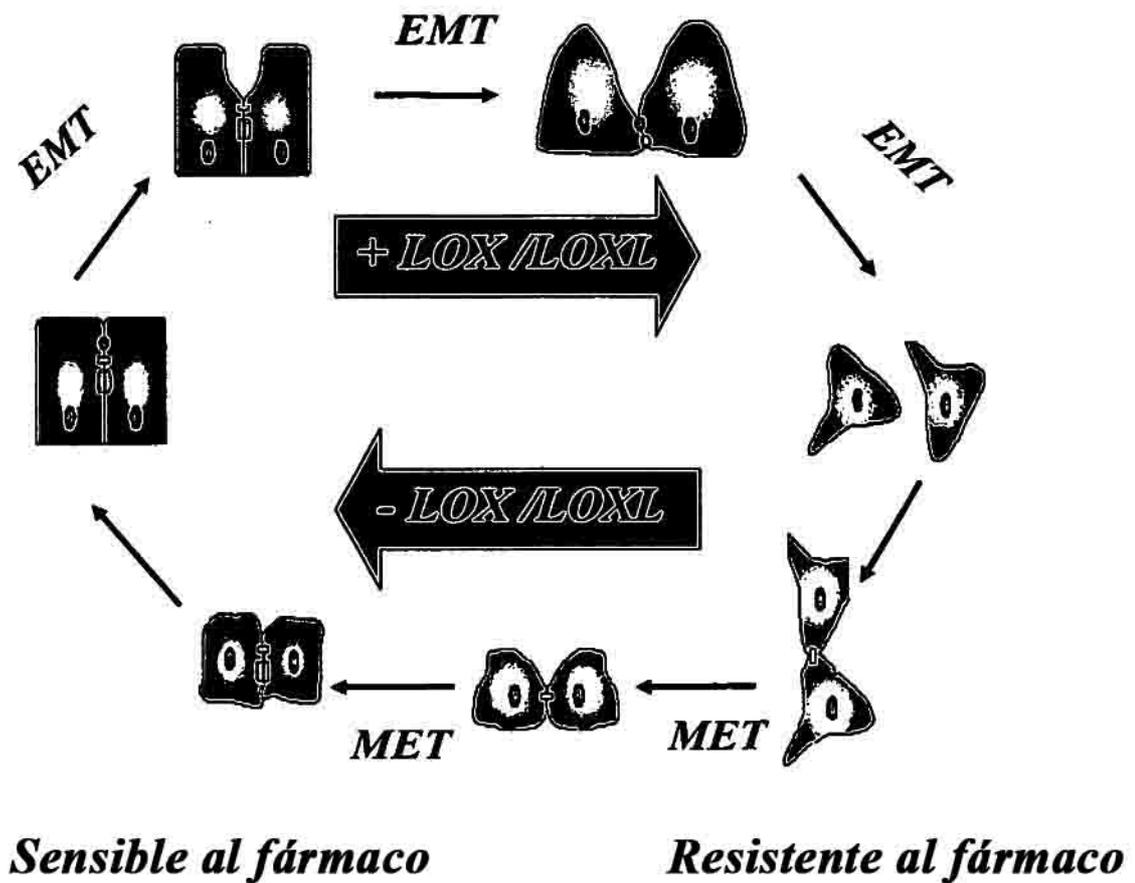


FIG. 6

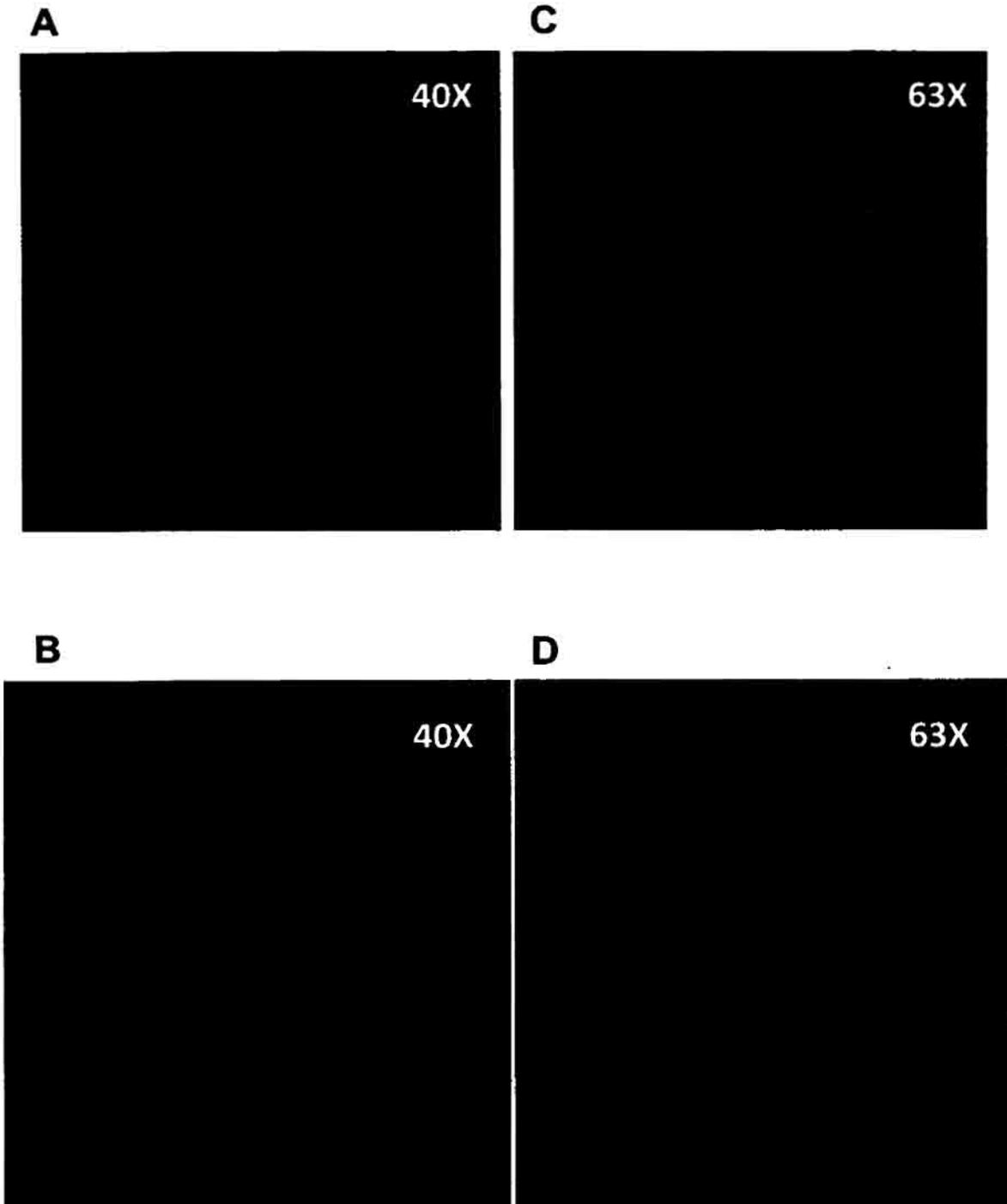


FIG. 7

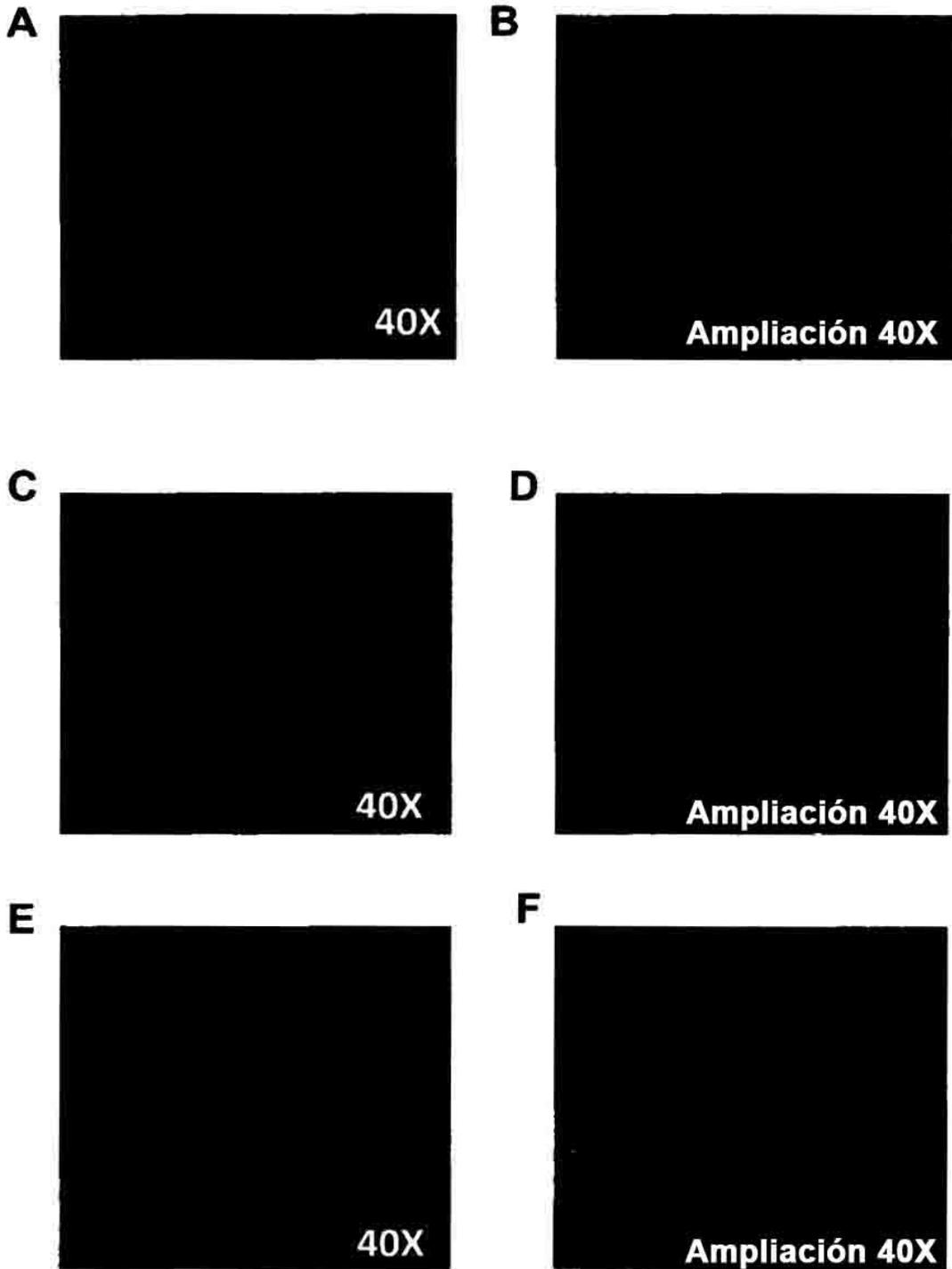


FIG. 8

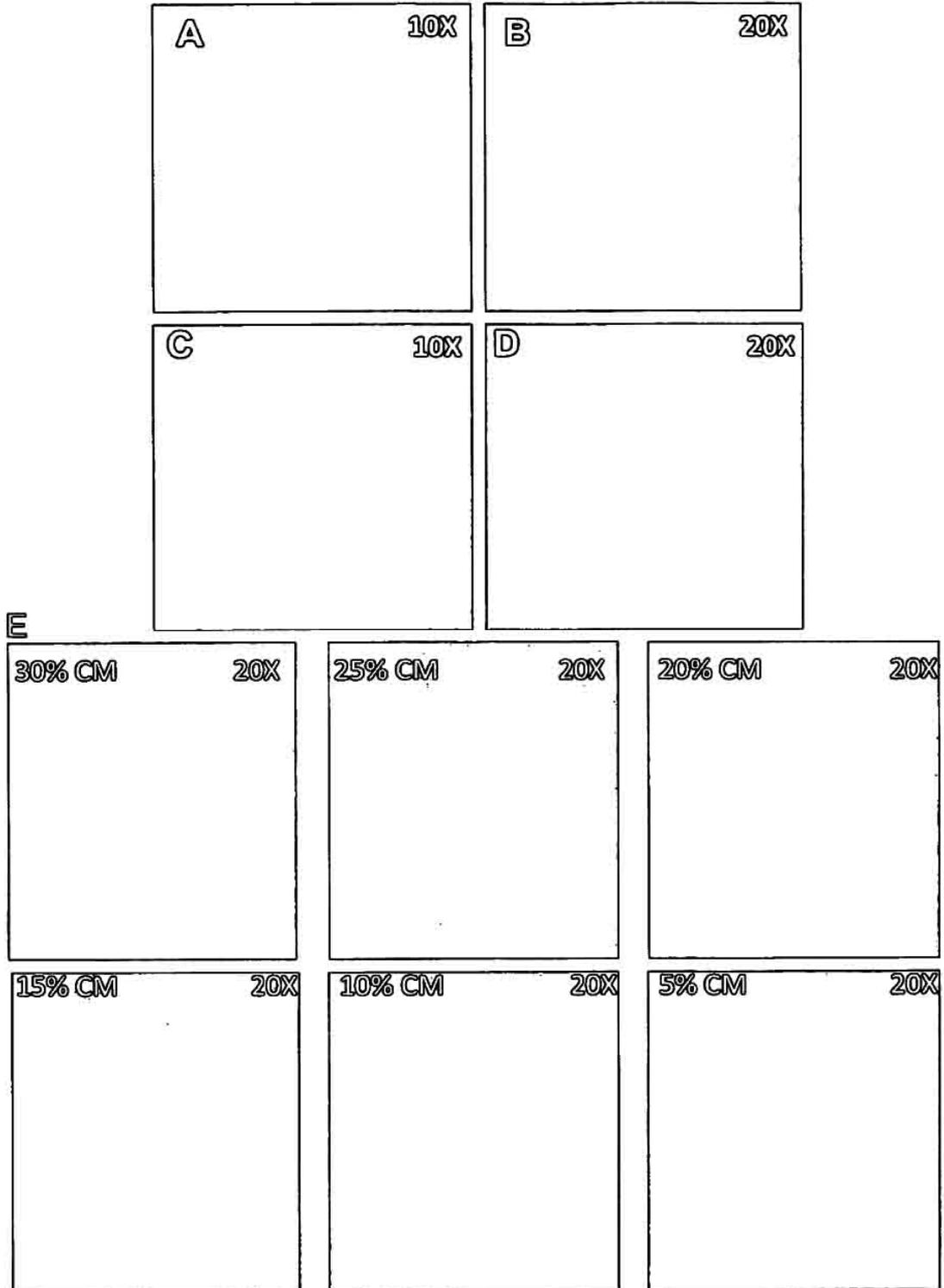


FIG. 9

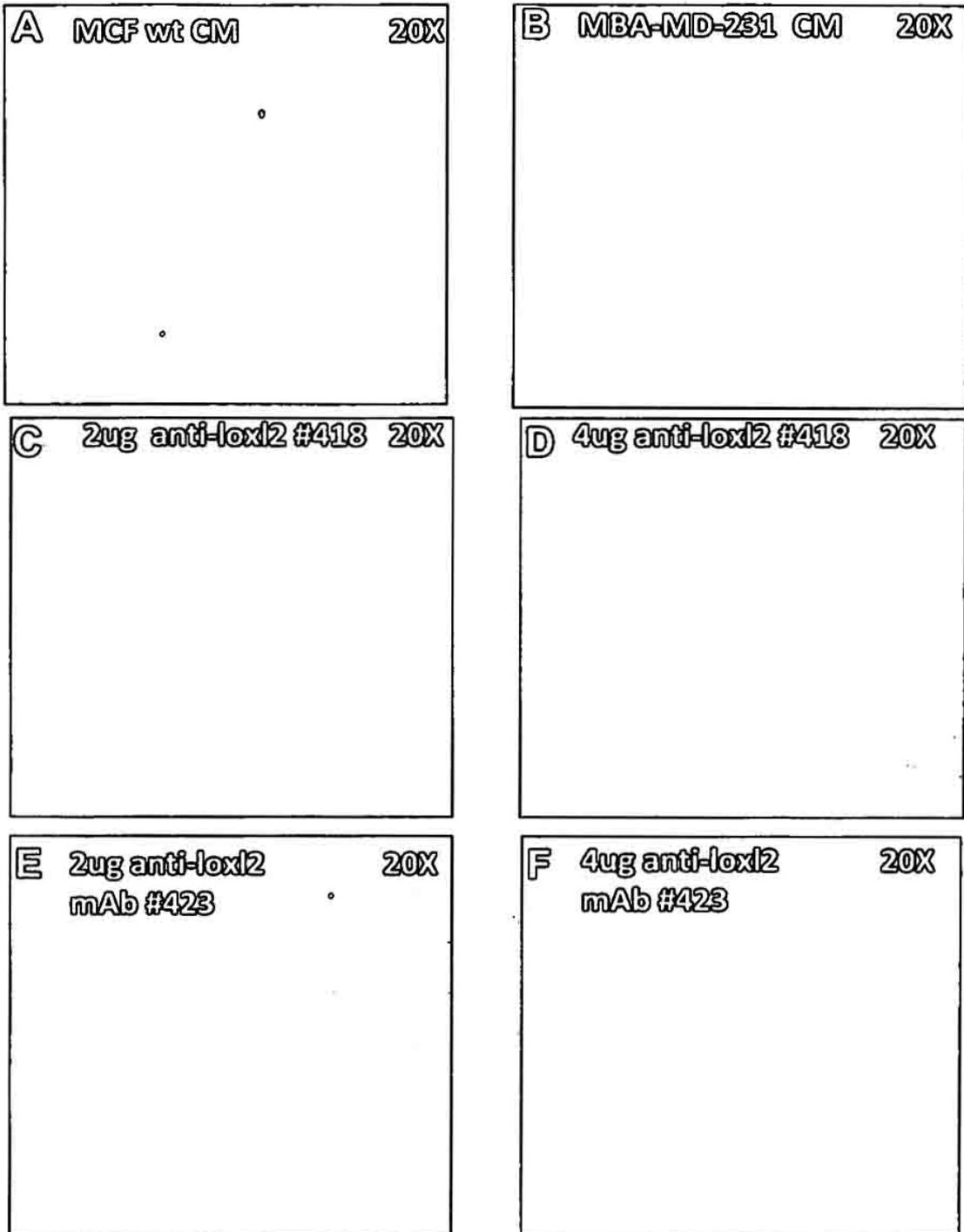


FIG. 10

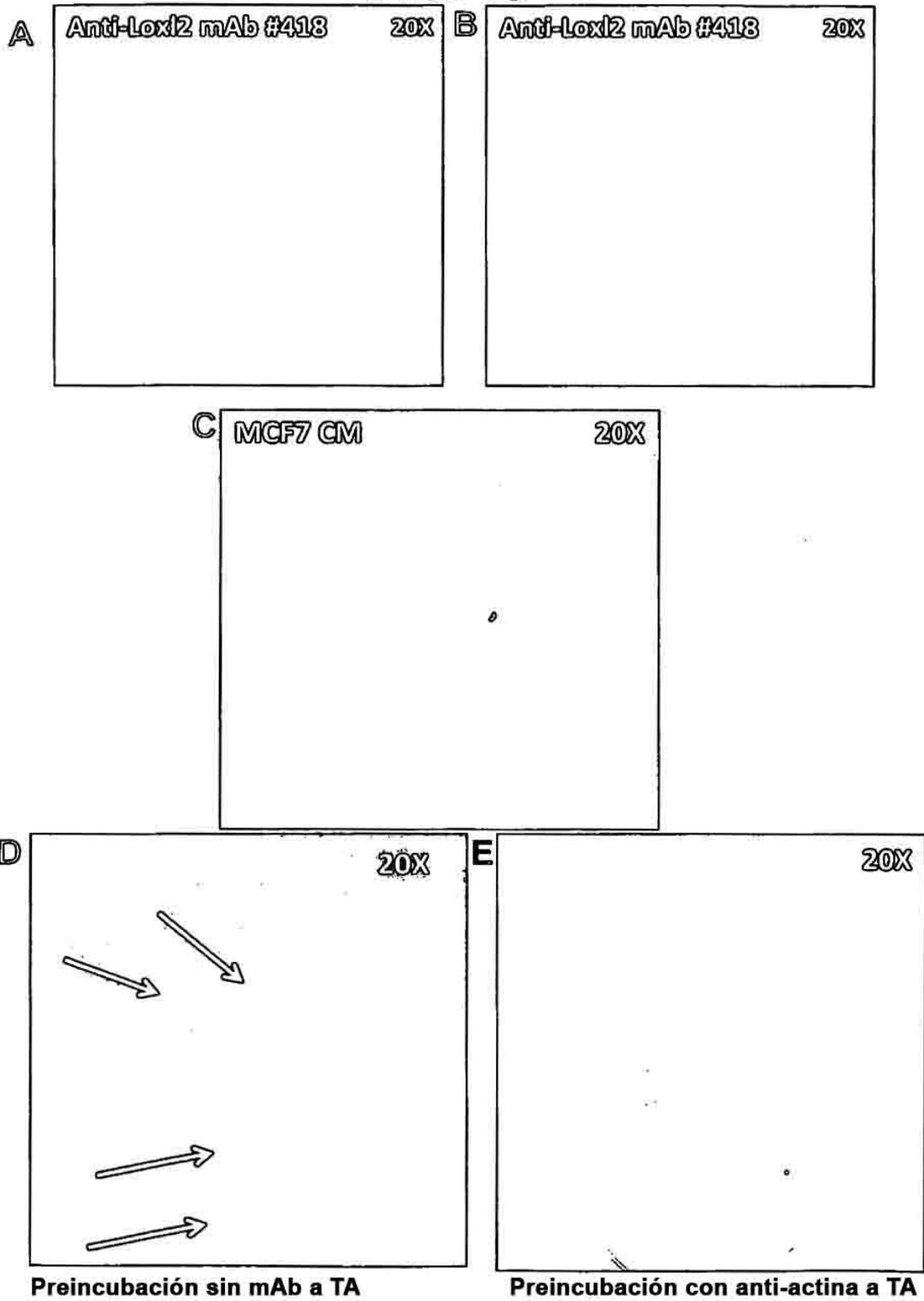


FIG. 11

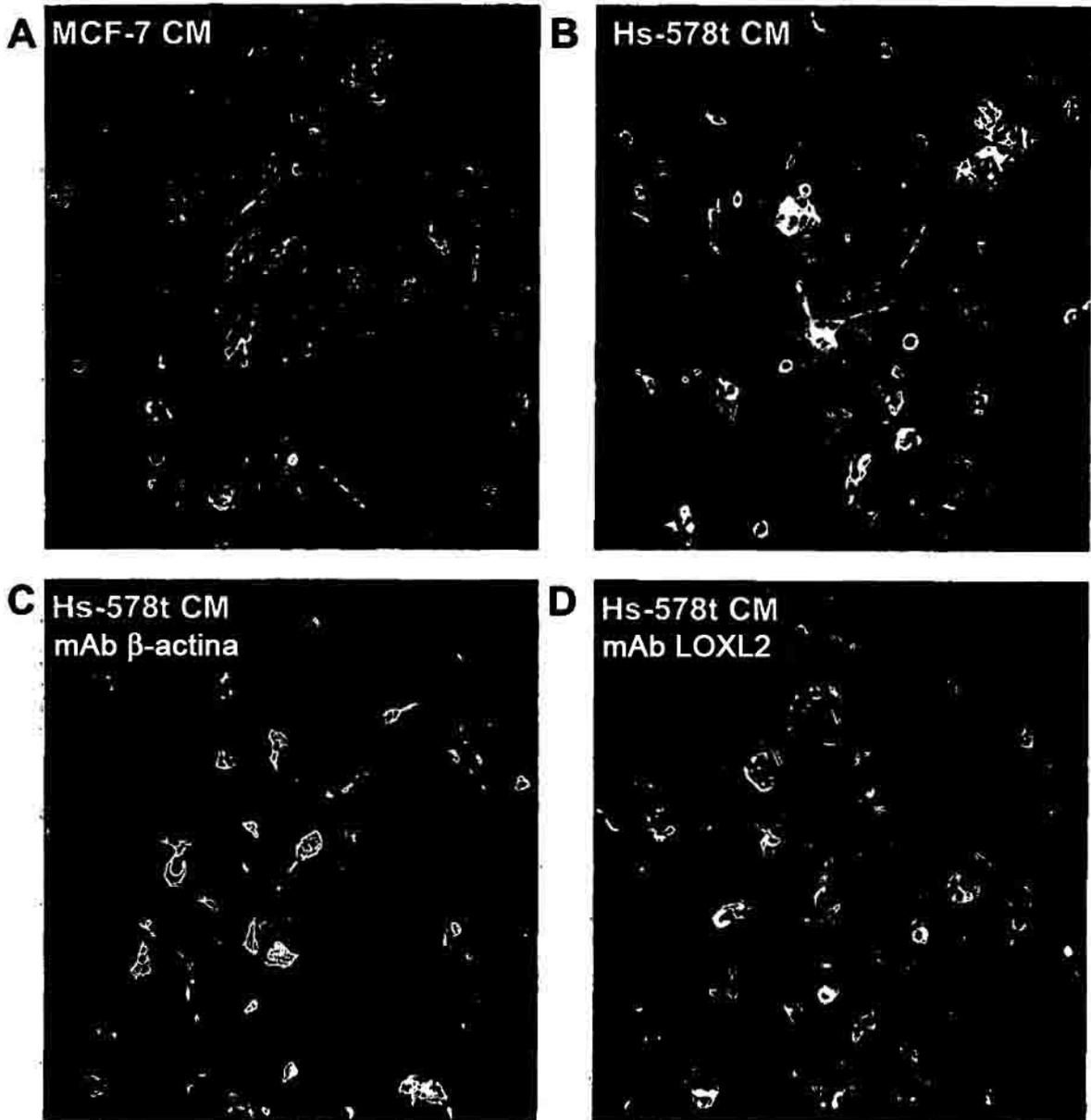


FIG. 12

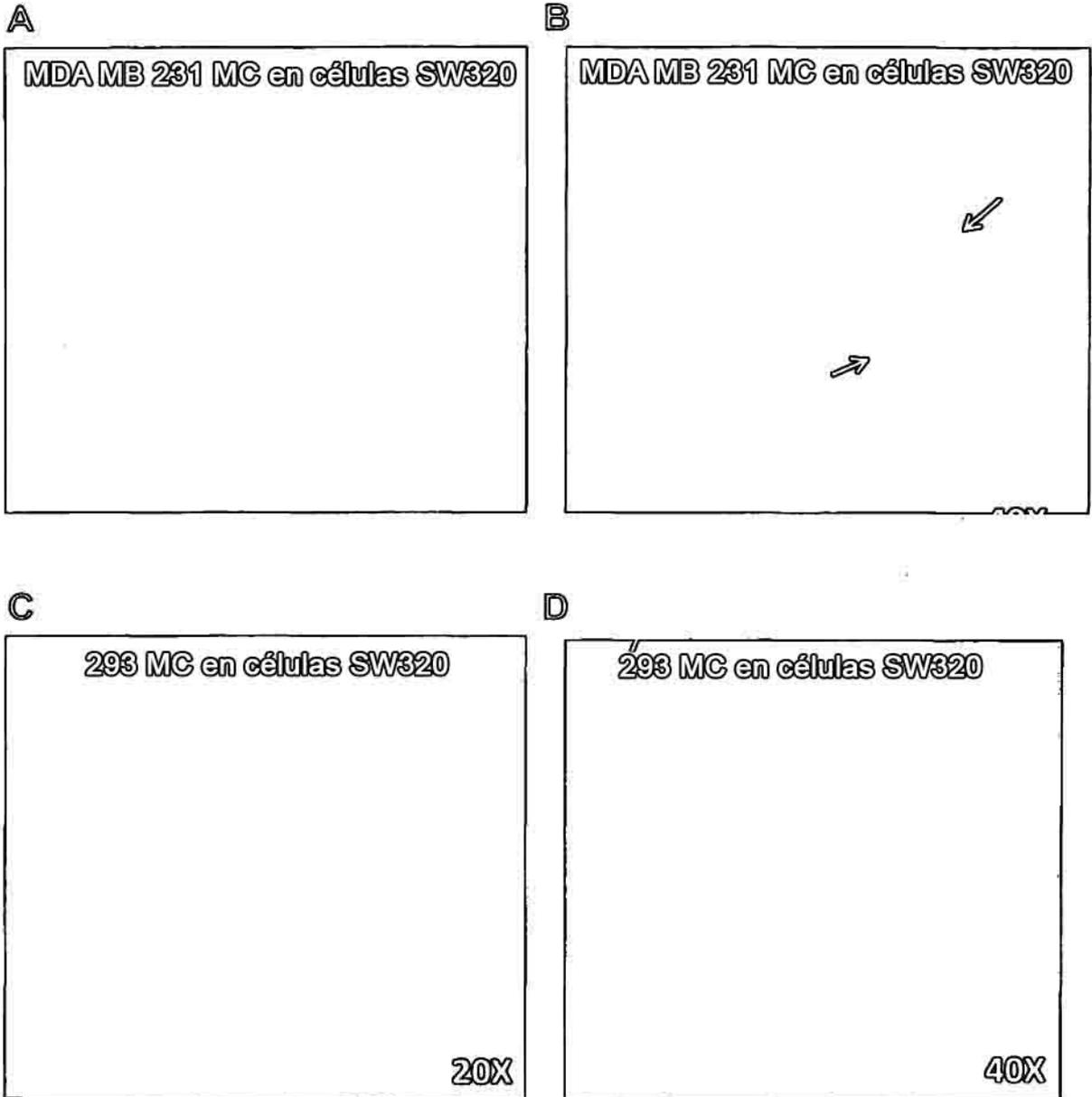


FIG. 13

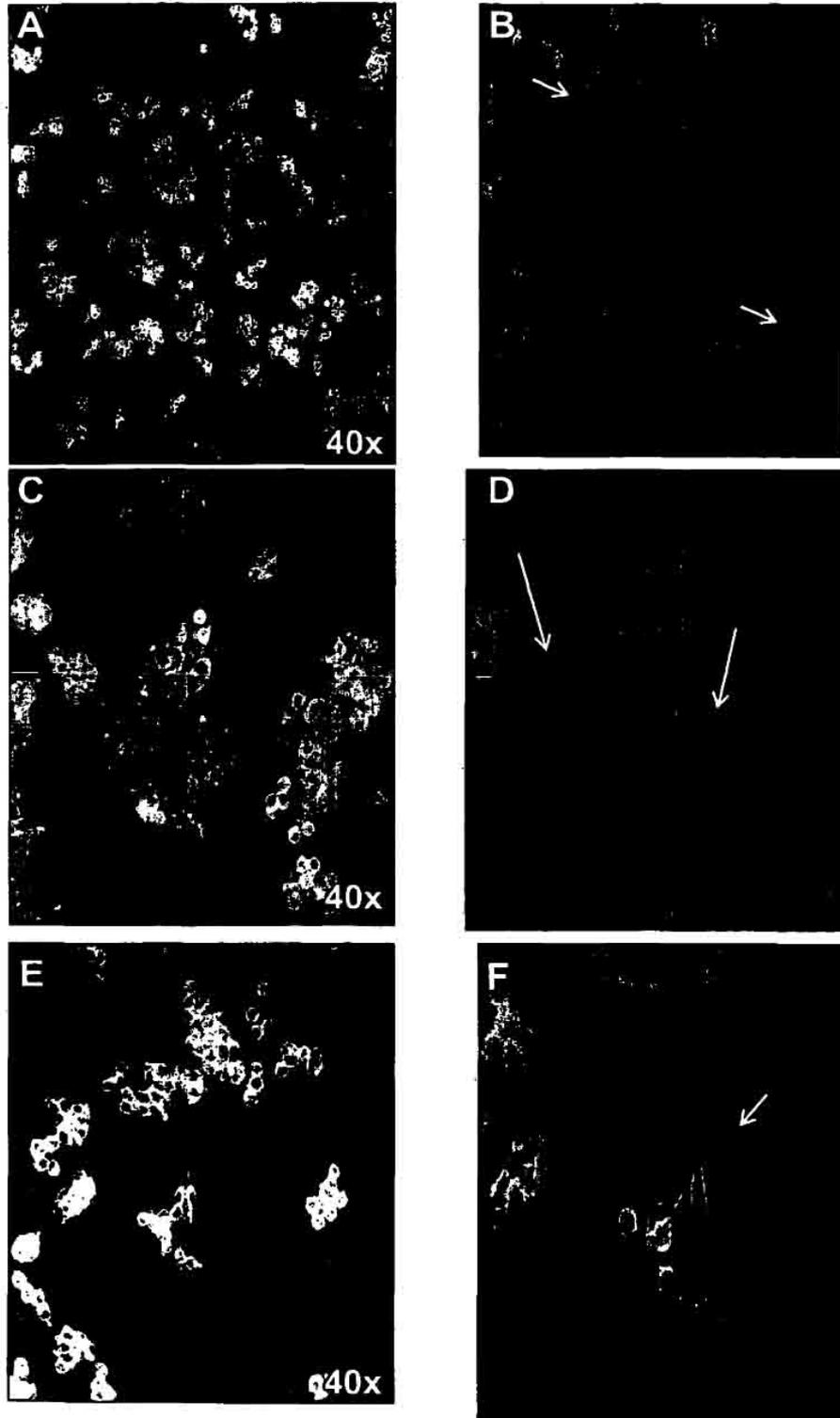


FIG. 14

A Distribución de LOX no escindido y escindido en tejidos normales y tumorales



*Intracelular
no escindido*



*Extracelular
escindido
(extracelular)*

B LOX / LOXL y EMT: bloqueo de la captación de enzima y papel en la EMT

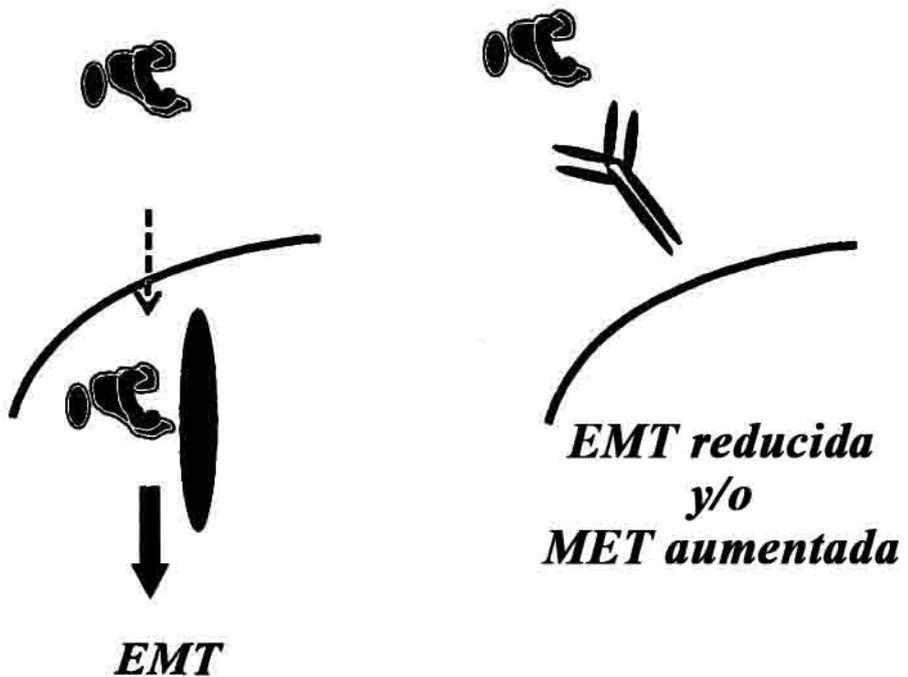


FIG. 15

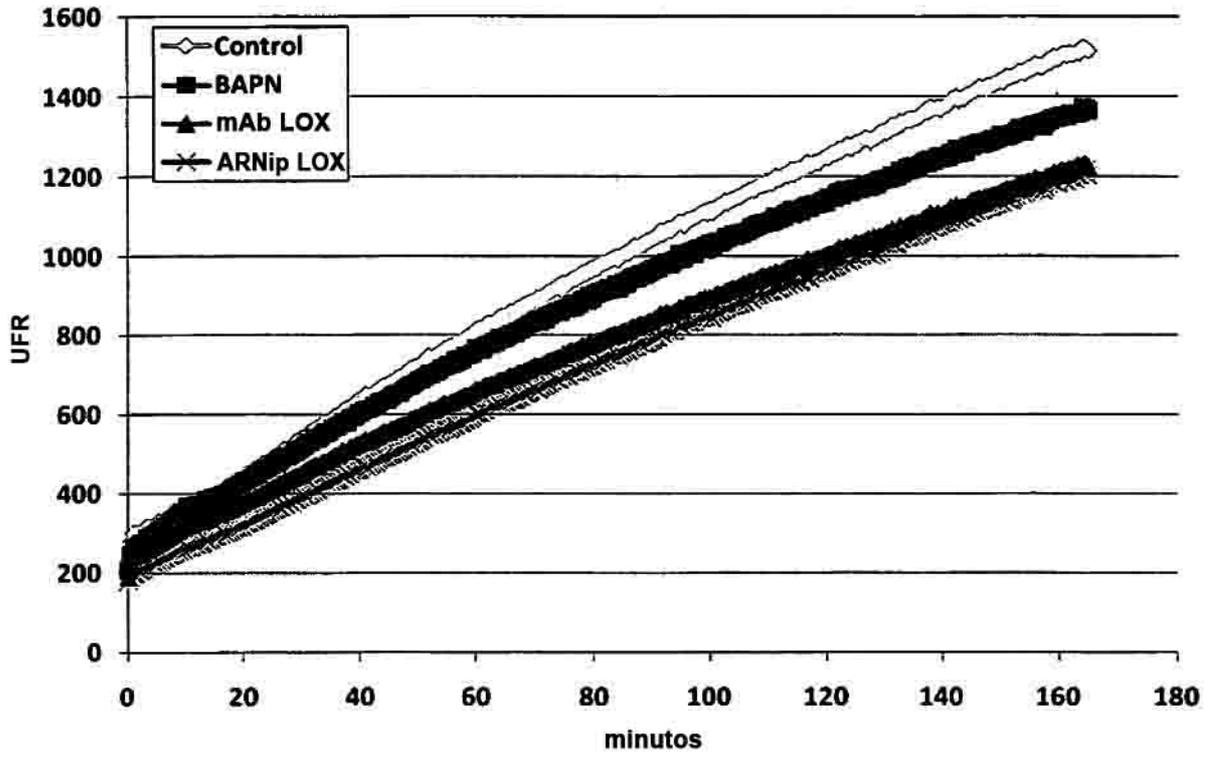


FIG. 16

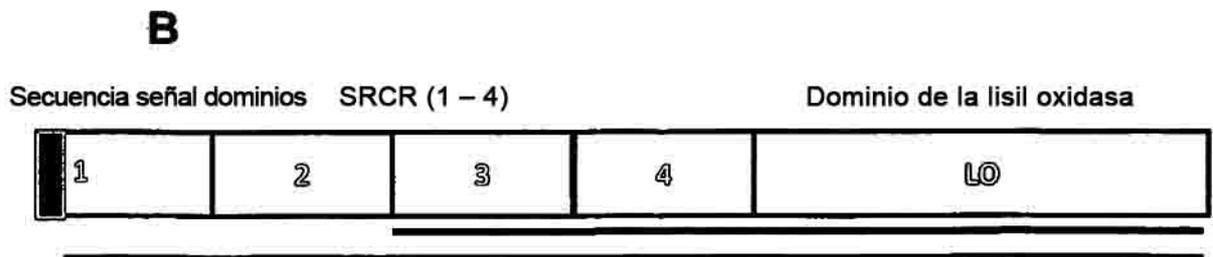
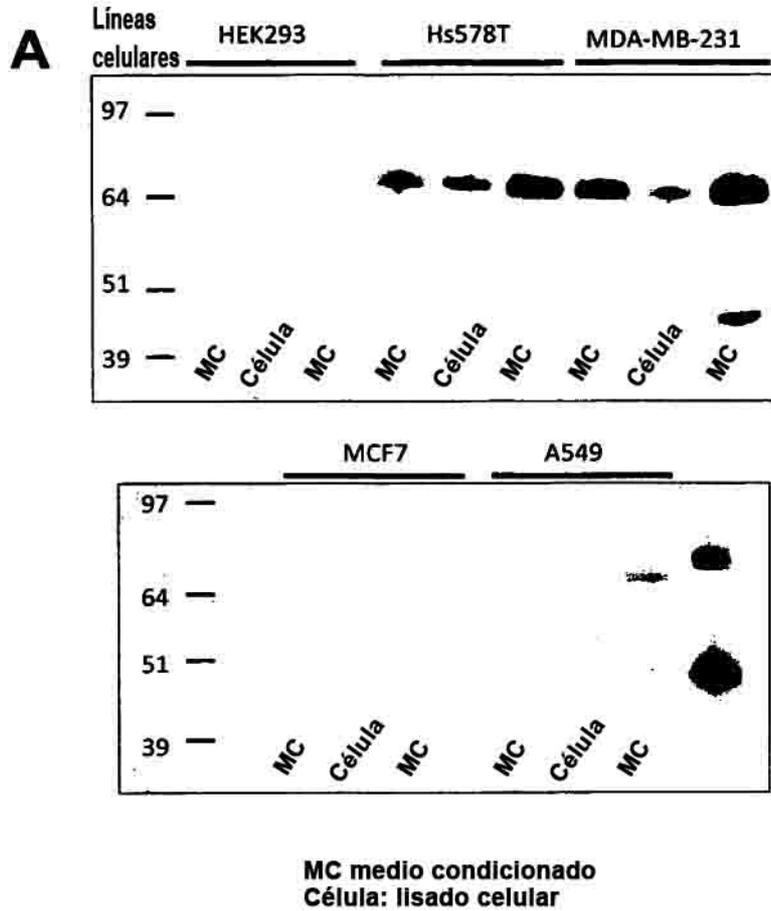
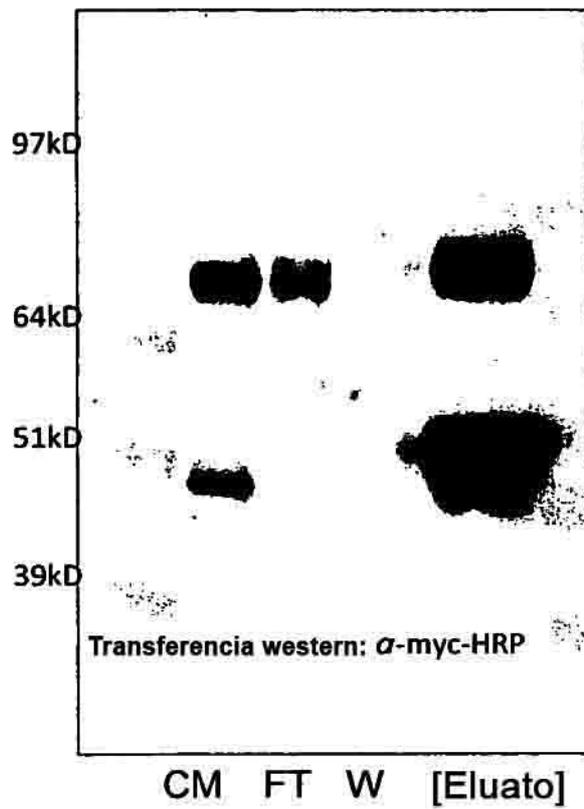
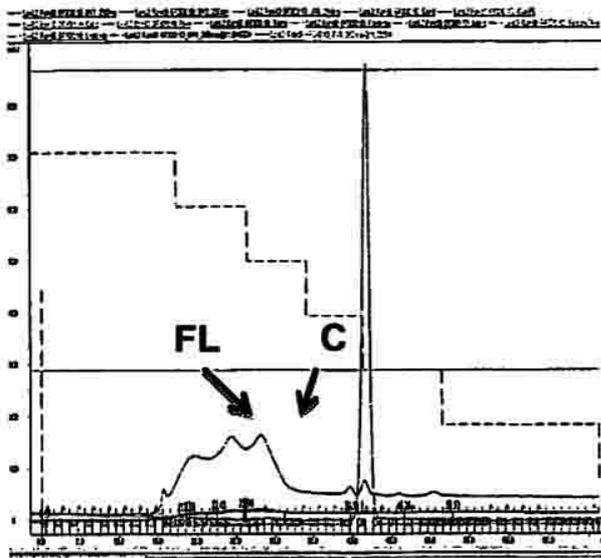


FIG. 17



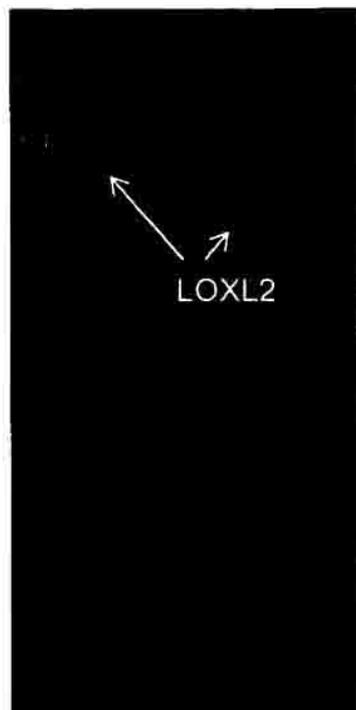
CM = medio condicionado
FT : Flujo pistón tras la purificación
L : Lavado
Eluato: LOXL2 eluida y purificada

FIG. 18



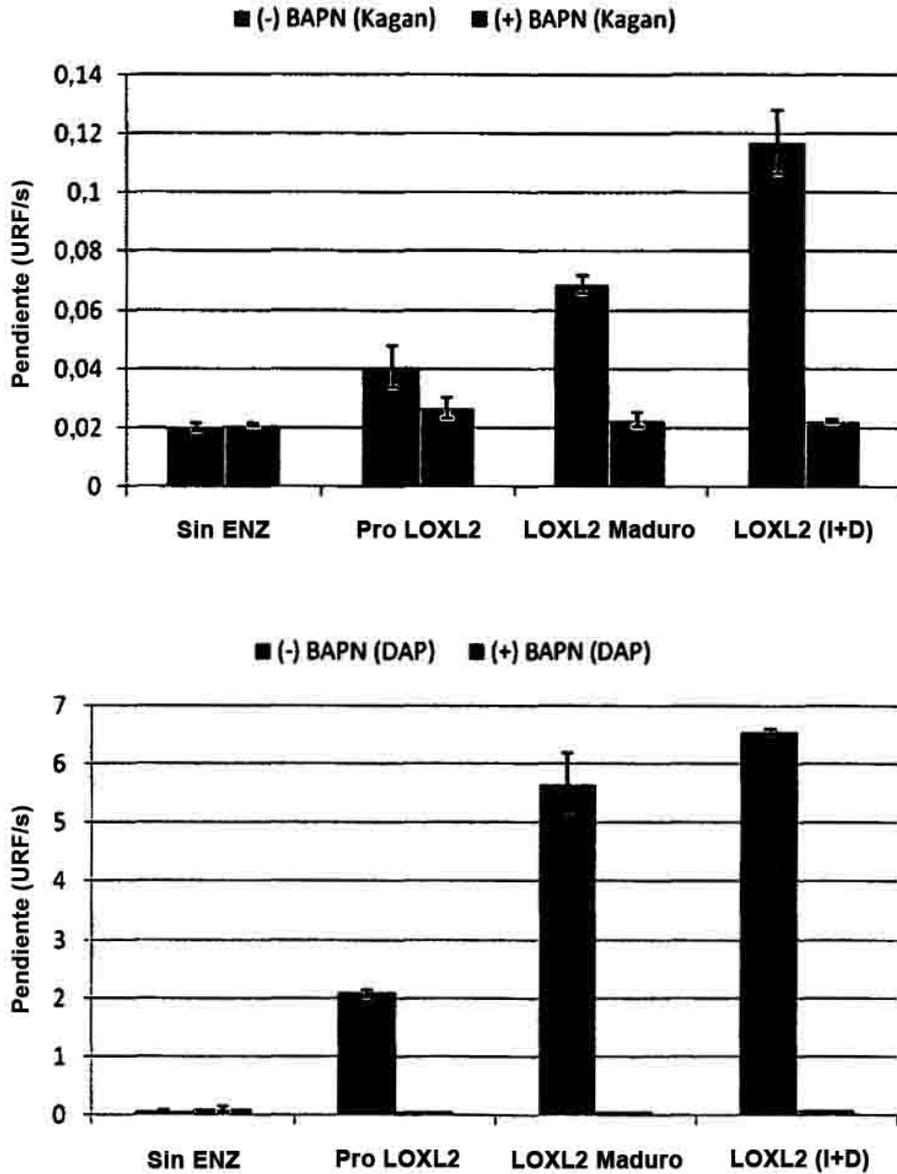
Superdex S-200
AKTA

FL C



Fraciones de columna
(purificación)

FIG. 19



**Pro LOXL2: LOXL2 de longitud completa (menos la secuencia señal)
 LOXL2 Maduro: LOXL2 escindido**

Sustratos:

Kagan = péptido GGGGEKGGGGG (imita el telopéptido del colágeno)

DAP = diaminopentano

FIG. 20

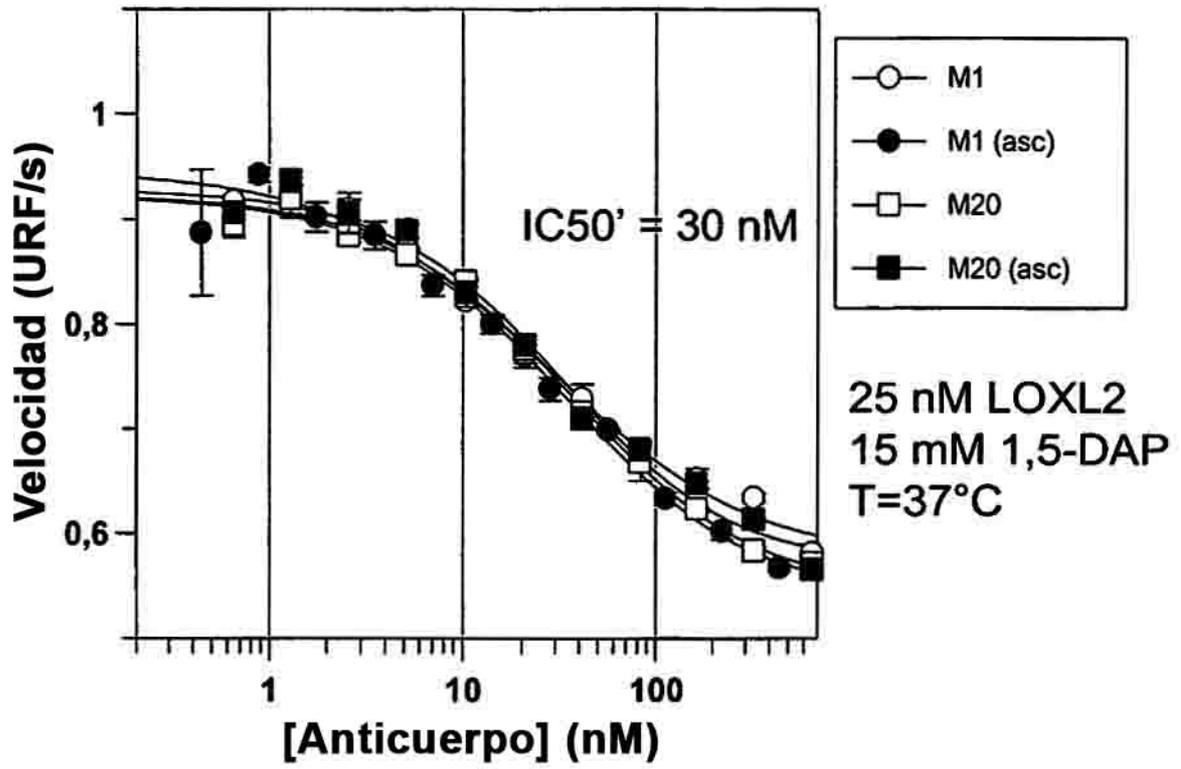
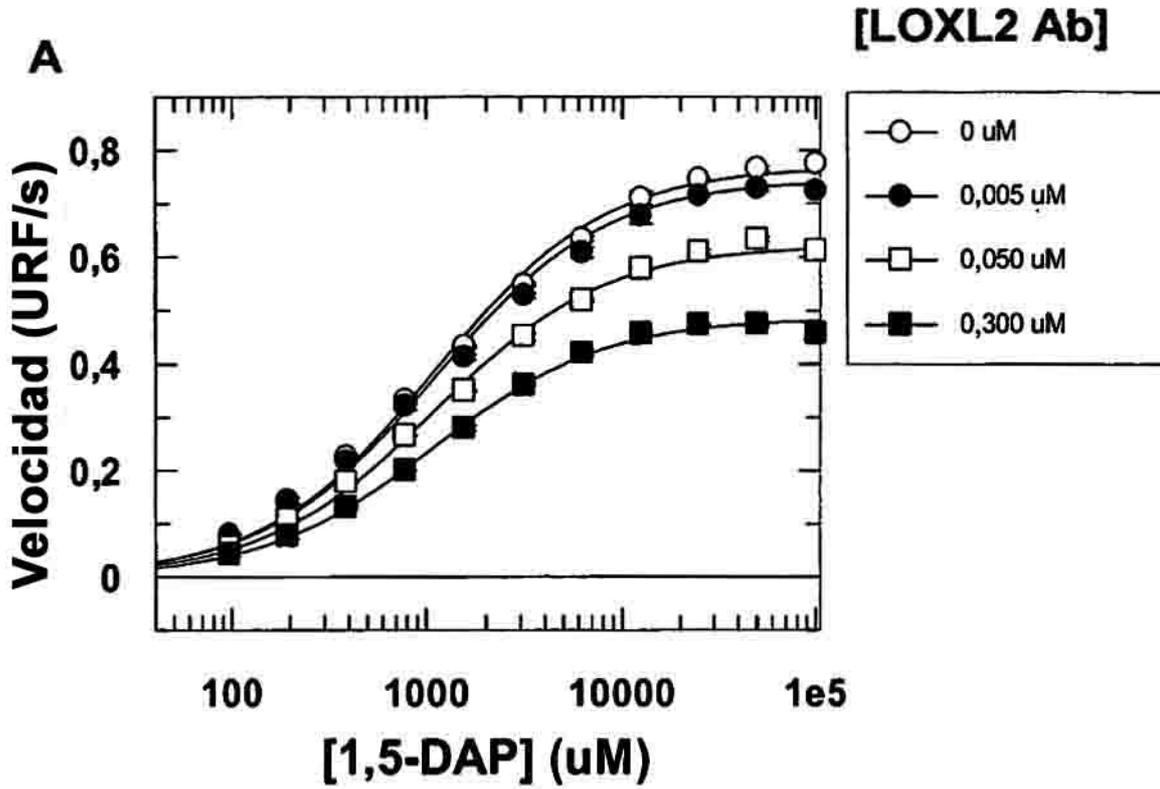


FIG. 21



$\alpha = 1,0$
 $K_i = 0,067$
 $\beta = 0,5$

Parámetros obtenidos del ajuste global

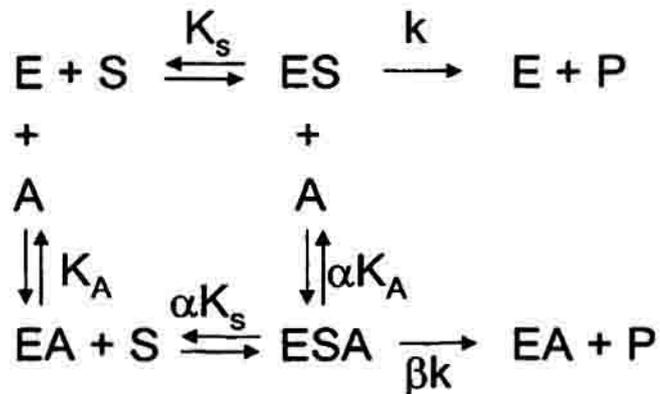
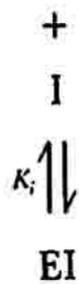
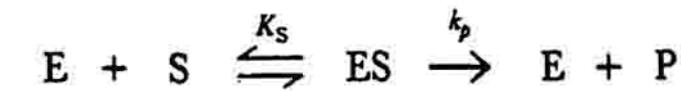
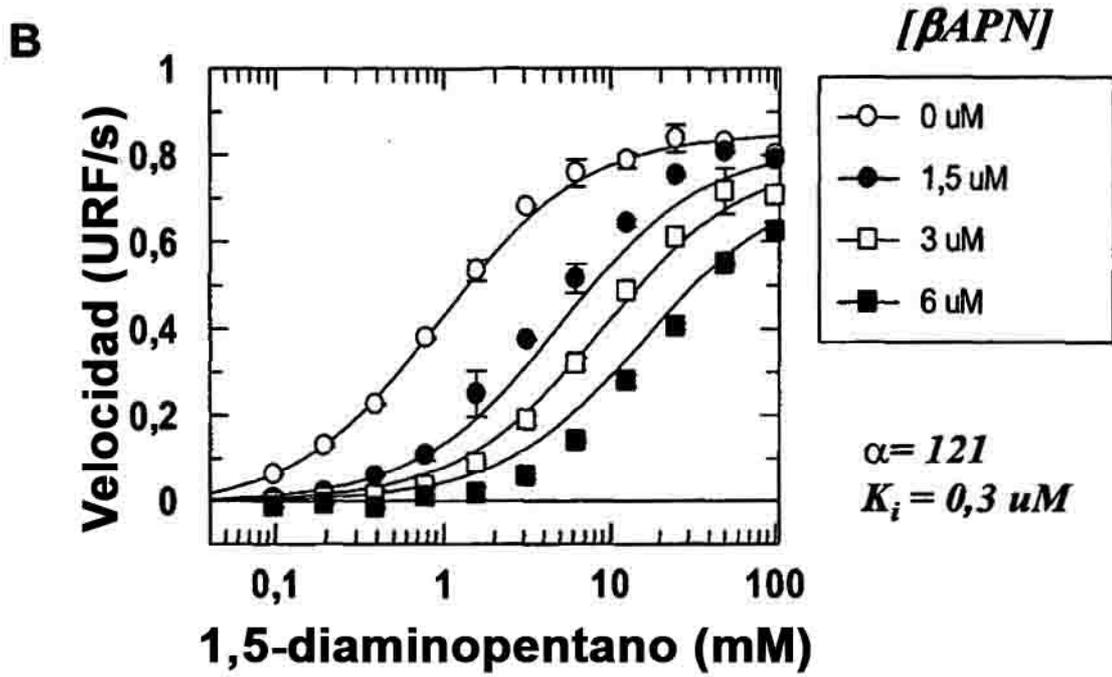


FIG. 21



β APN inhibe la actividad enzimática in vitro en su totalidad, pero no tiene efectos en ensayos realizados en células

FIG. 22

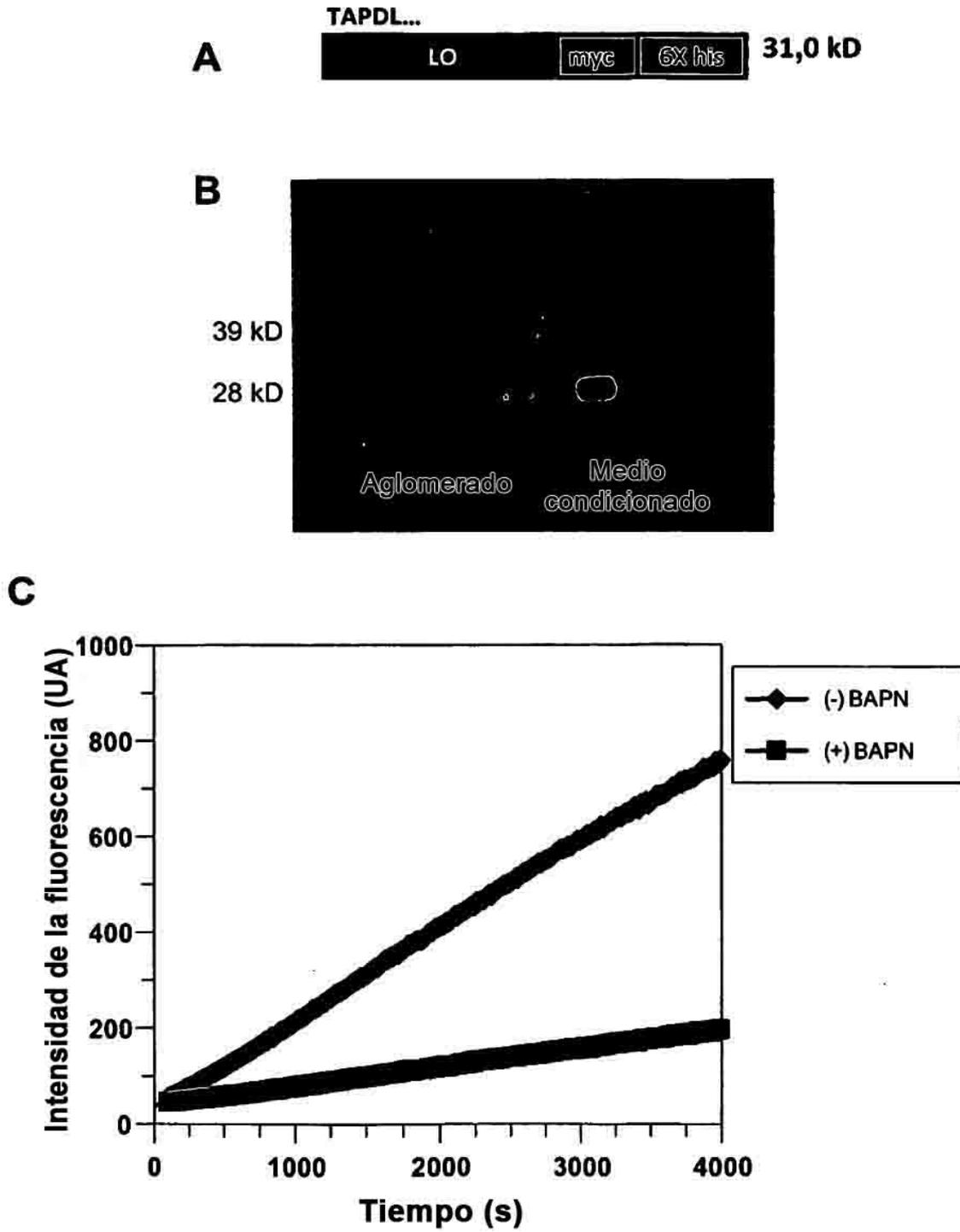


FIG. 23

Tinción Lox (Alexa488) y núcleo (dapi)

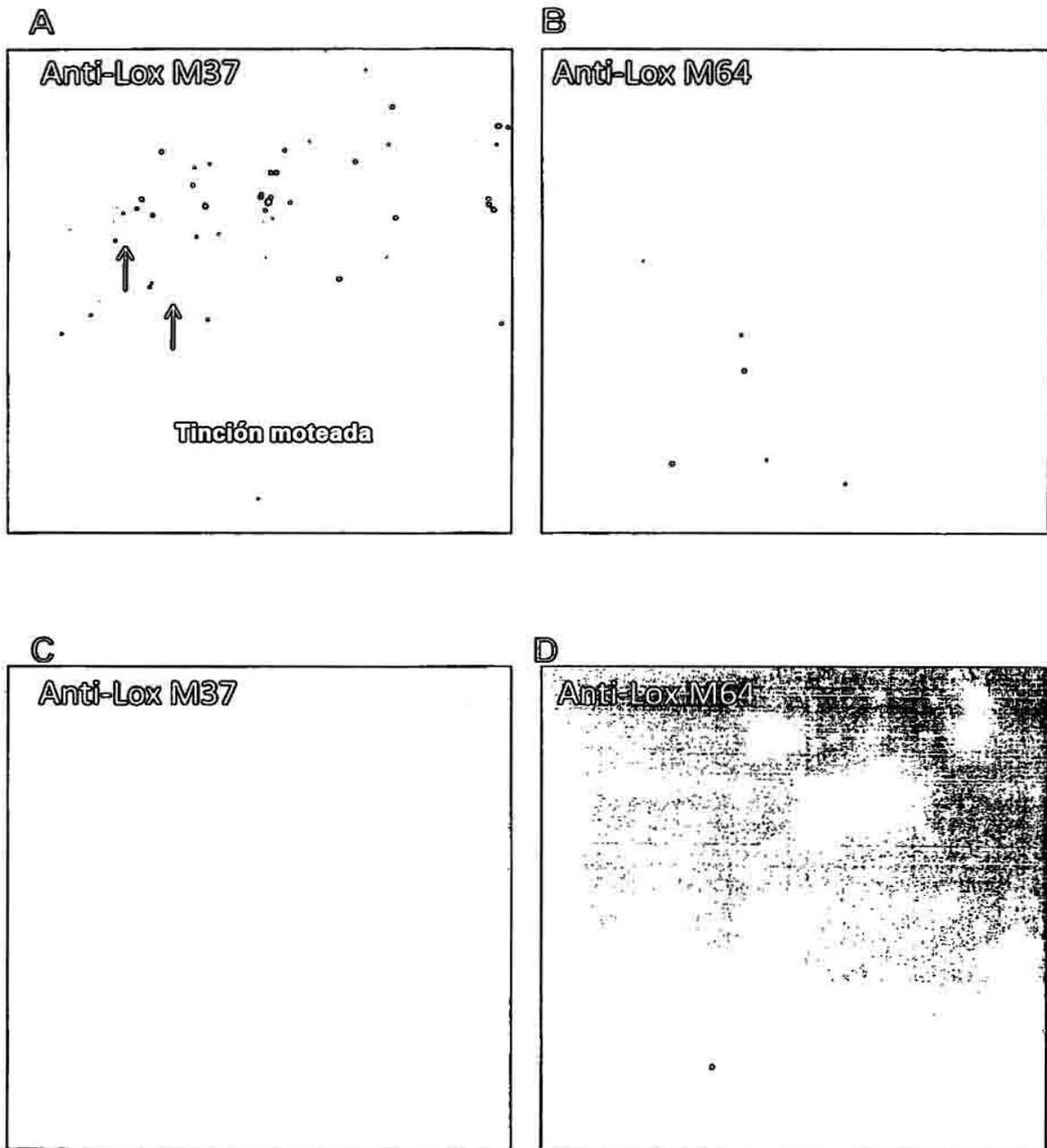
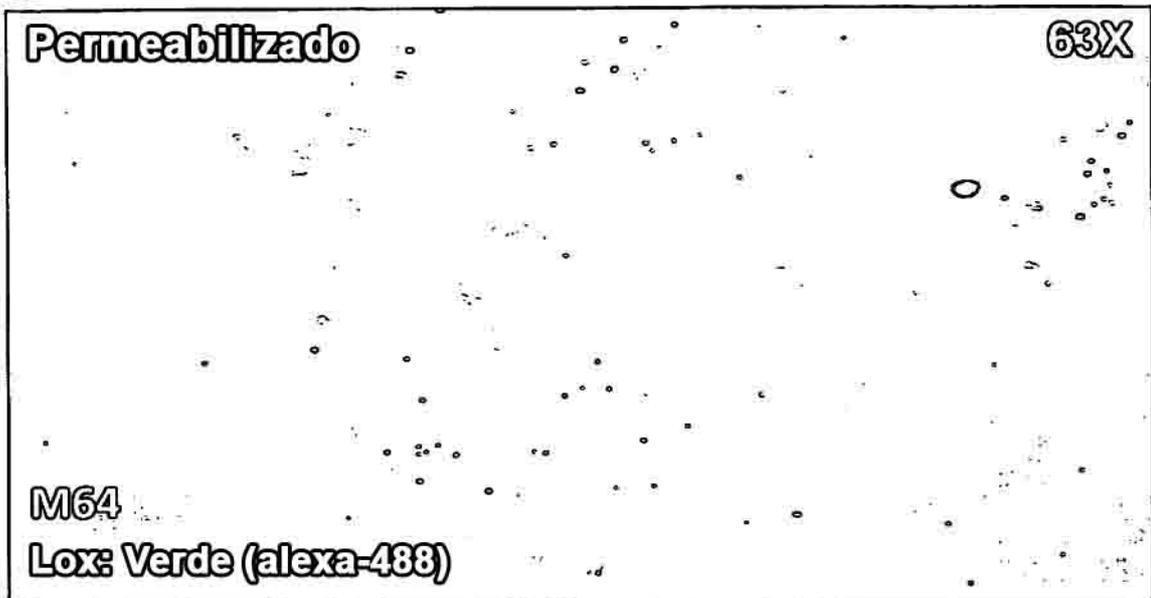


FIG. 24

A



B

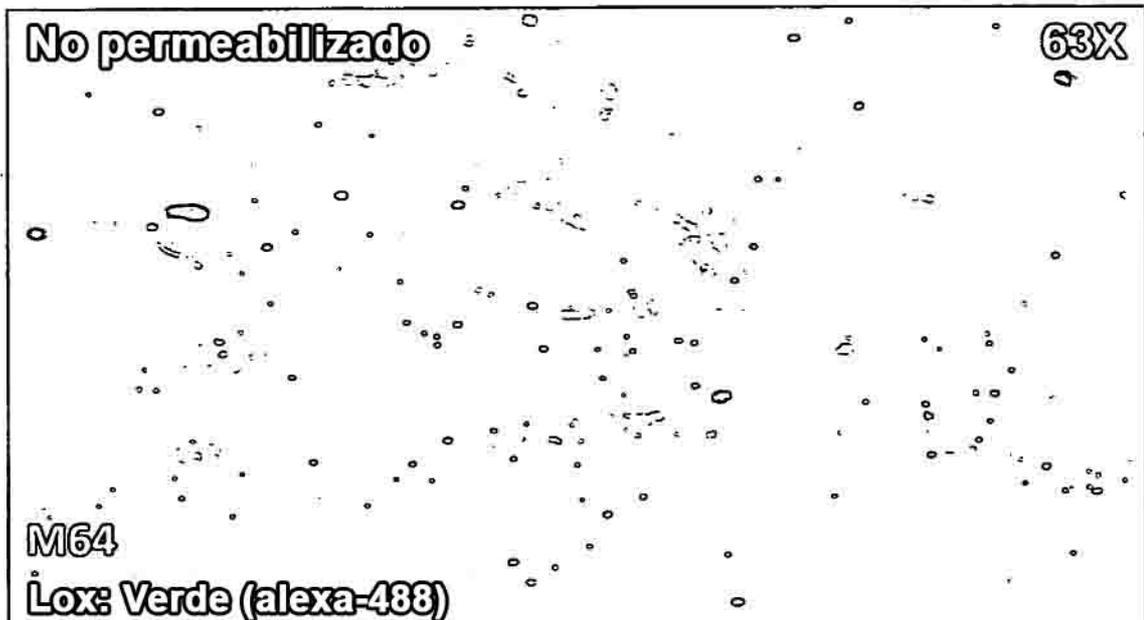


FIG. 25

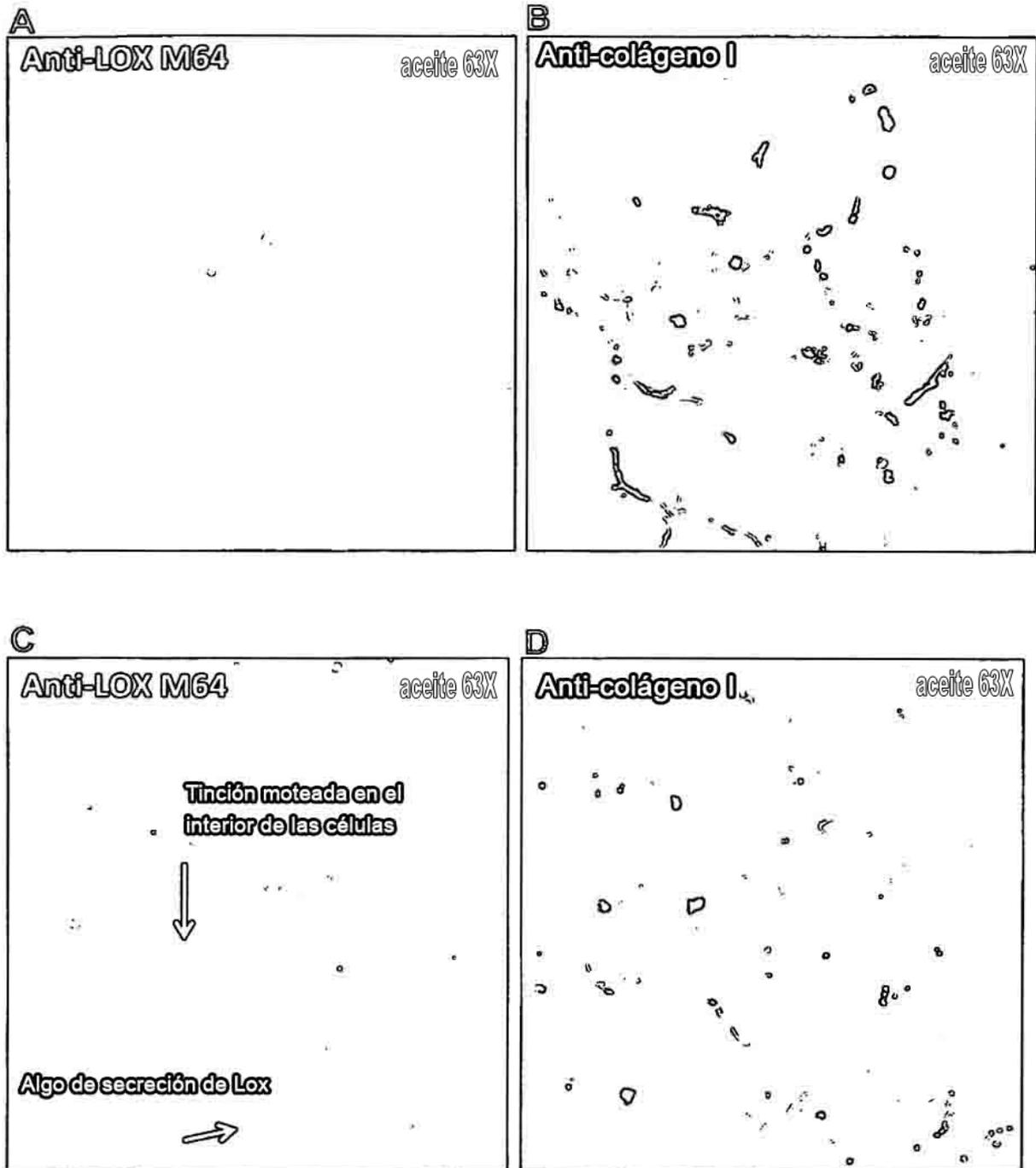
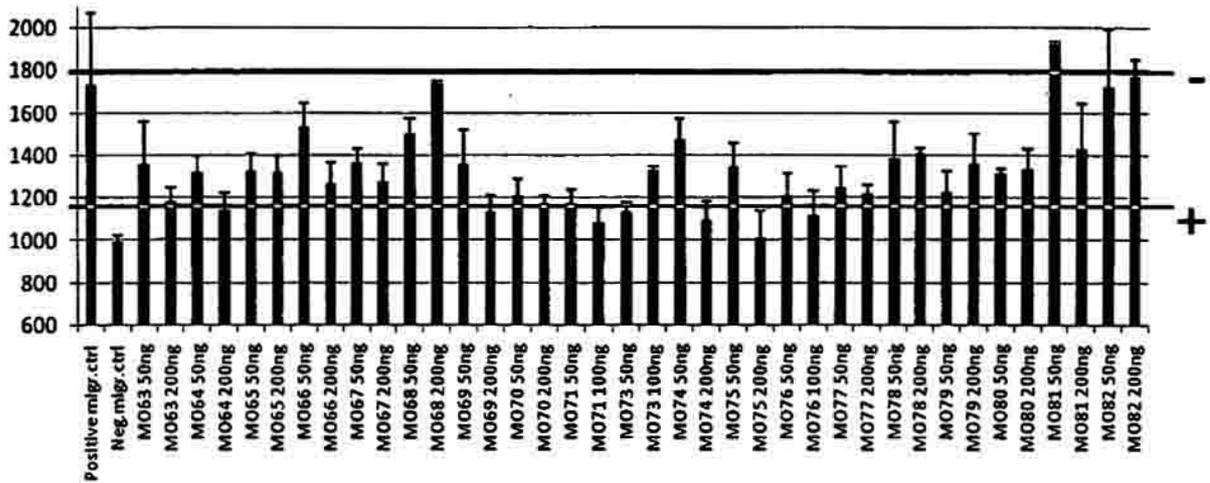


FIG. 26

A Colágeno I



B Colágeno IV

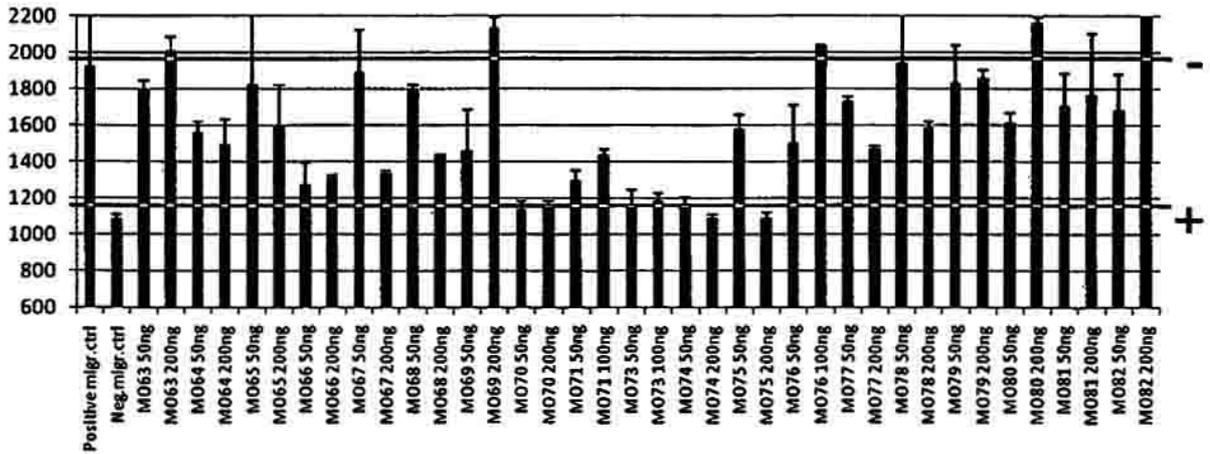


FIG. 26

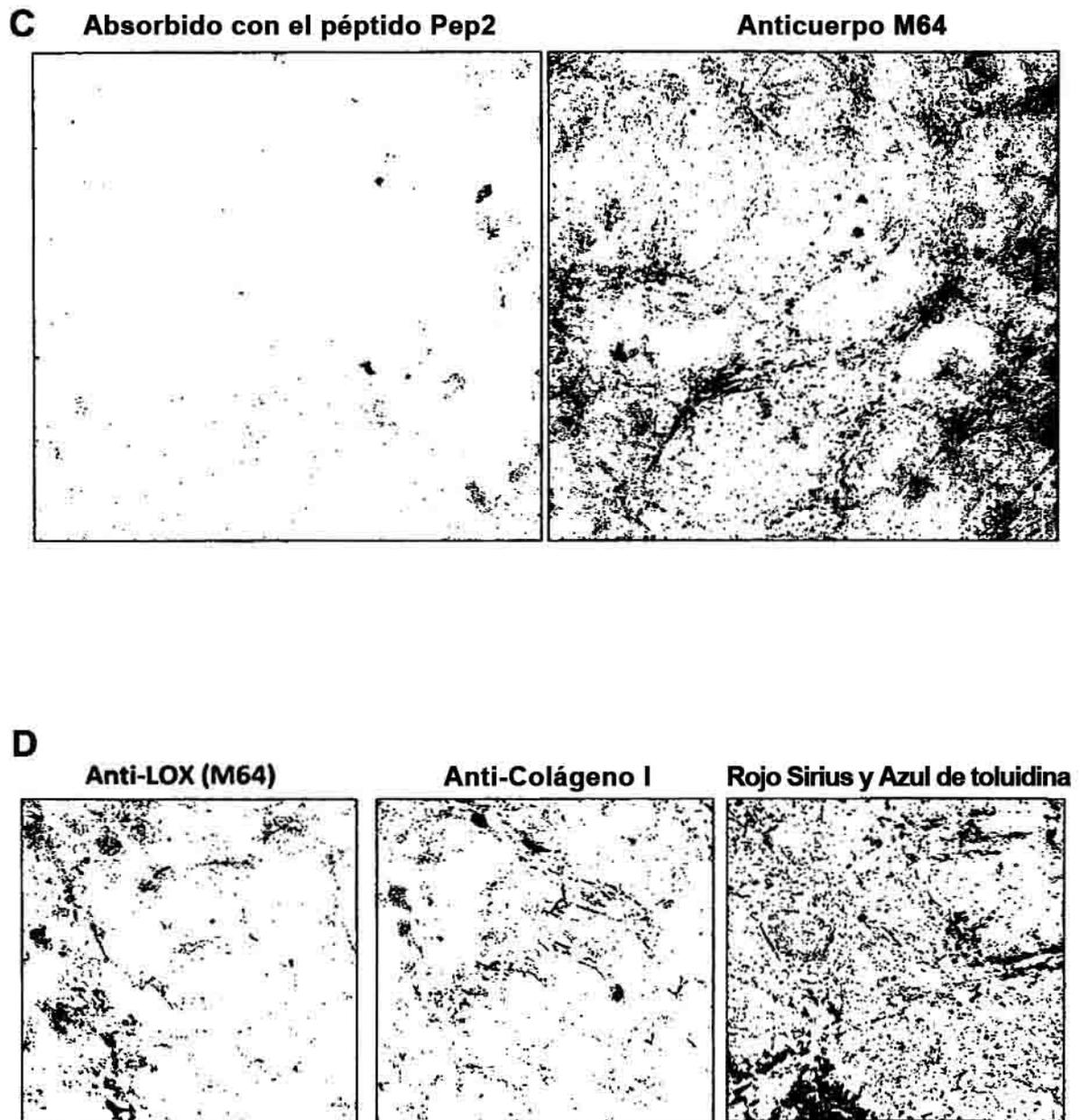


FIG. 27

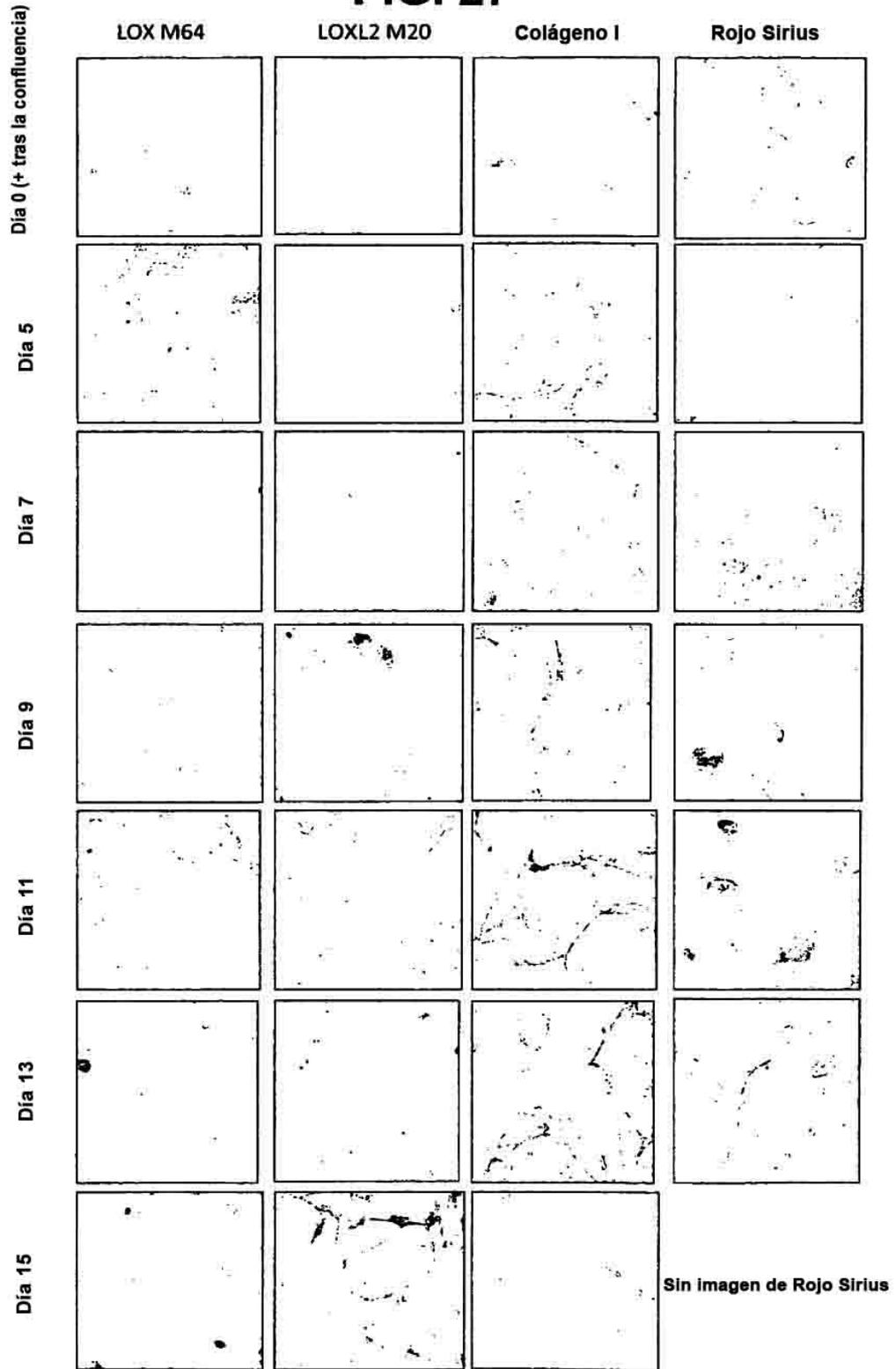


FIG. 28

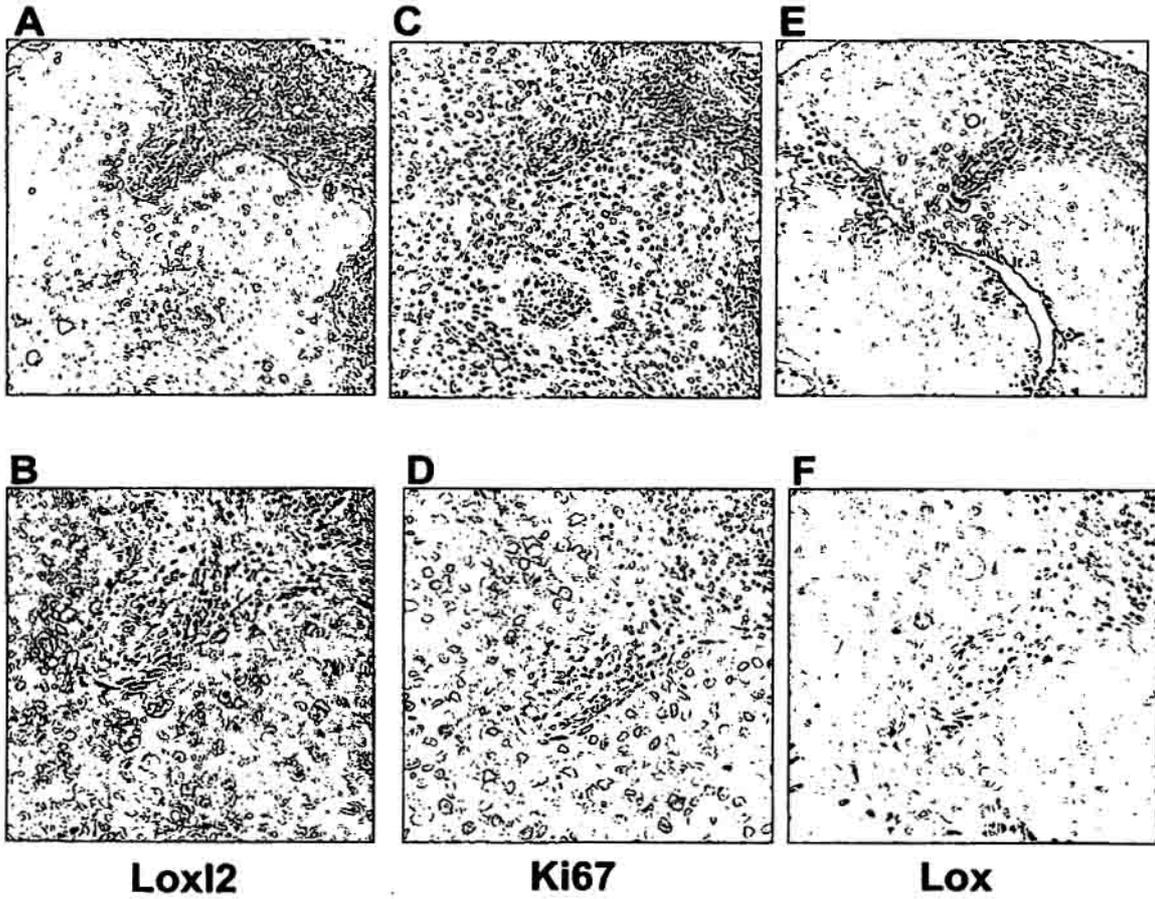


FIG. 29

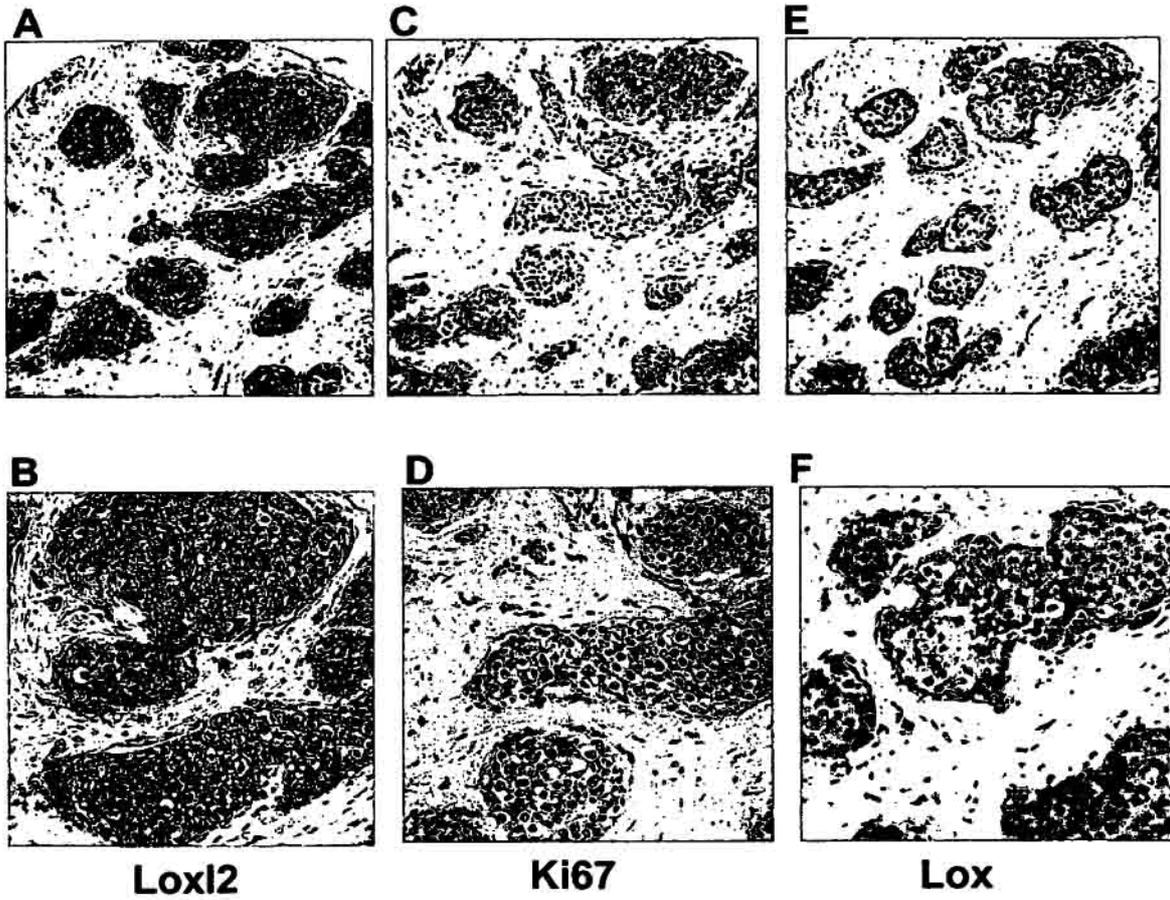


FIG. 30

Mesotelioma maligno (transcripto)

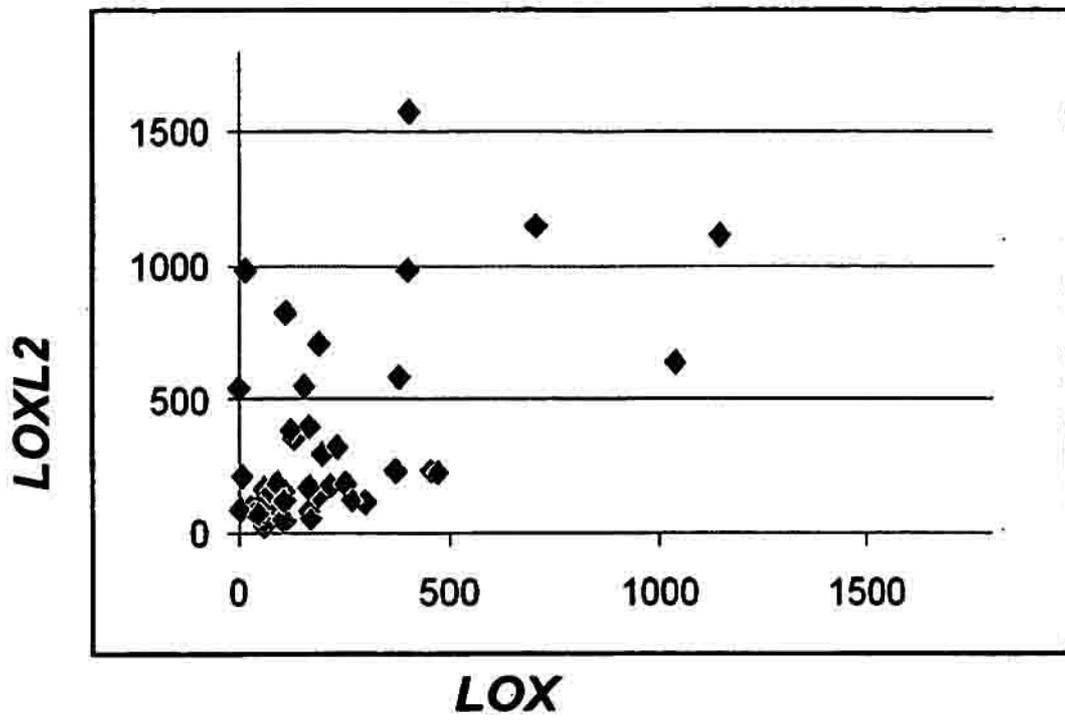


FIG. 31

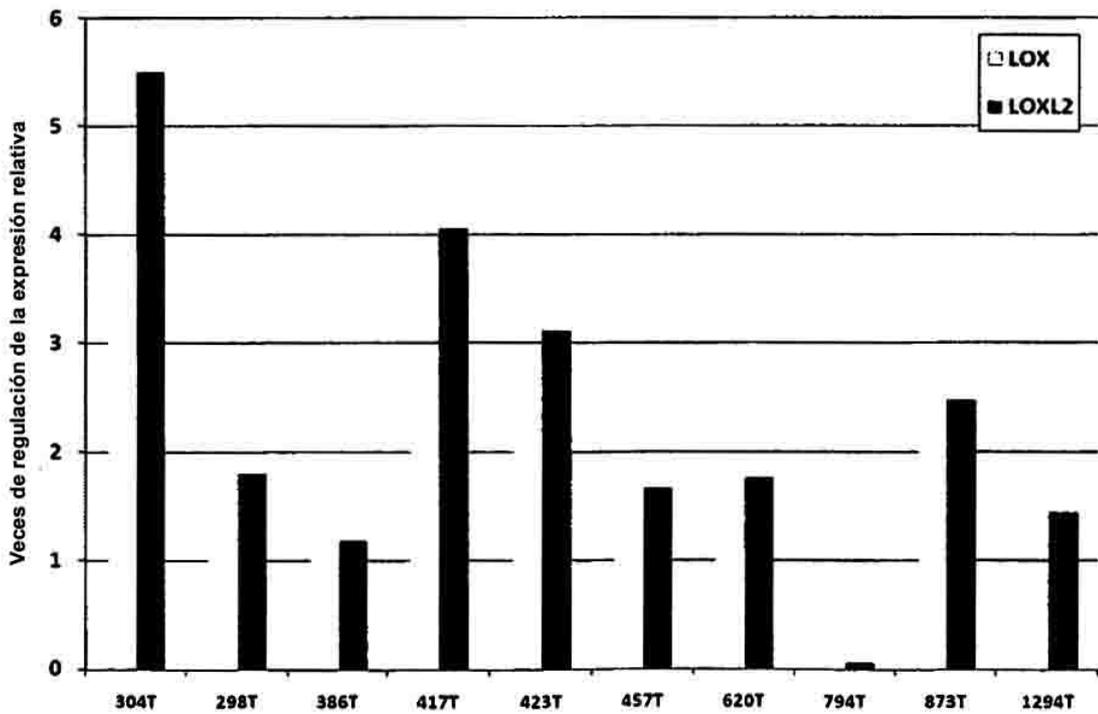
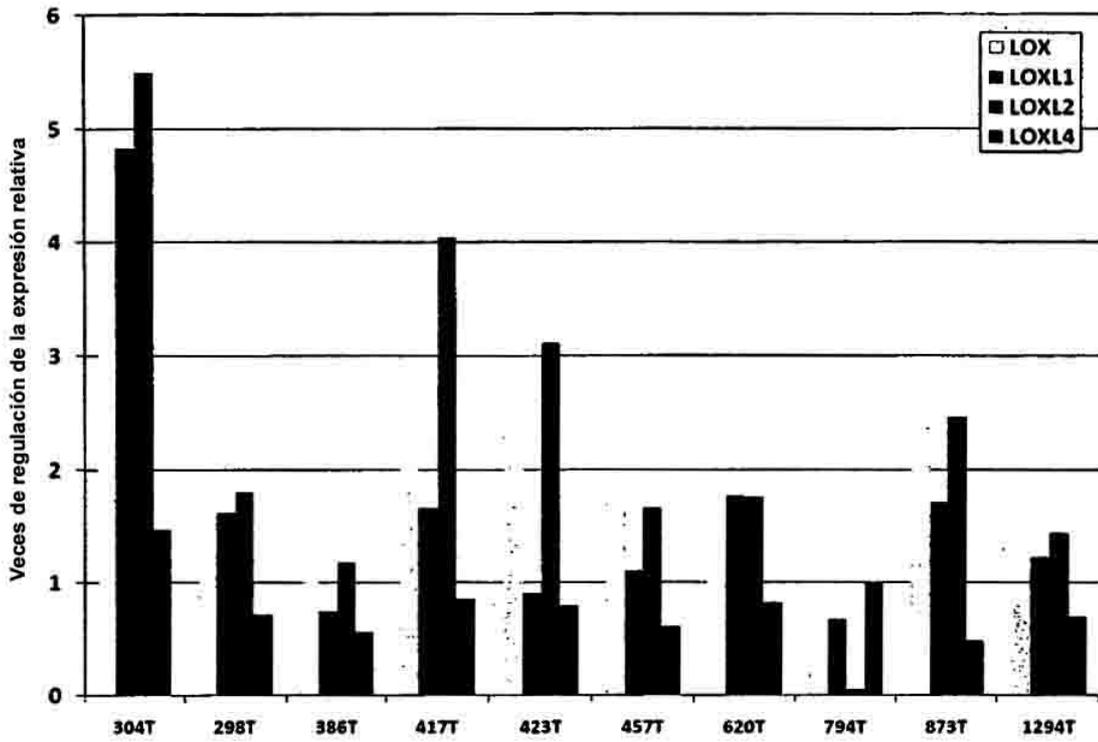


FIG. 32

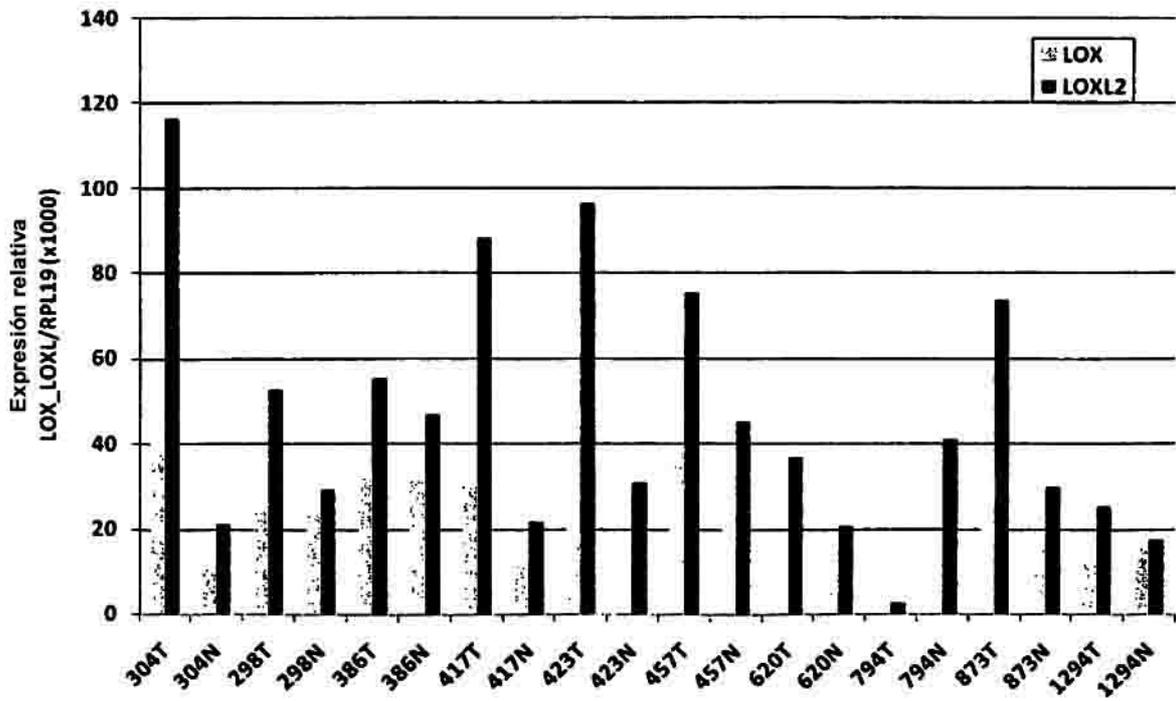
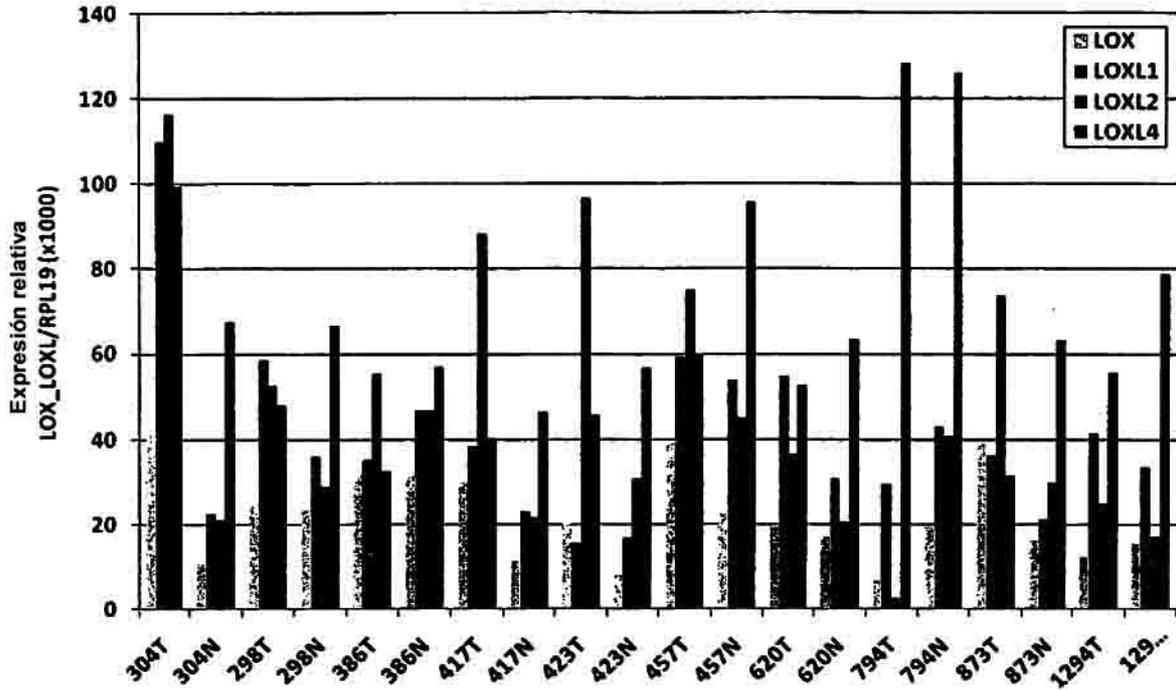


FIG. 33

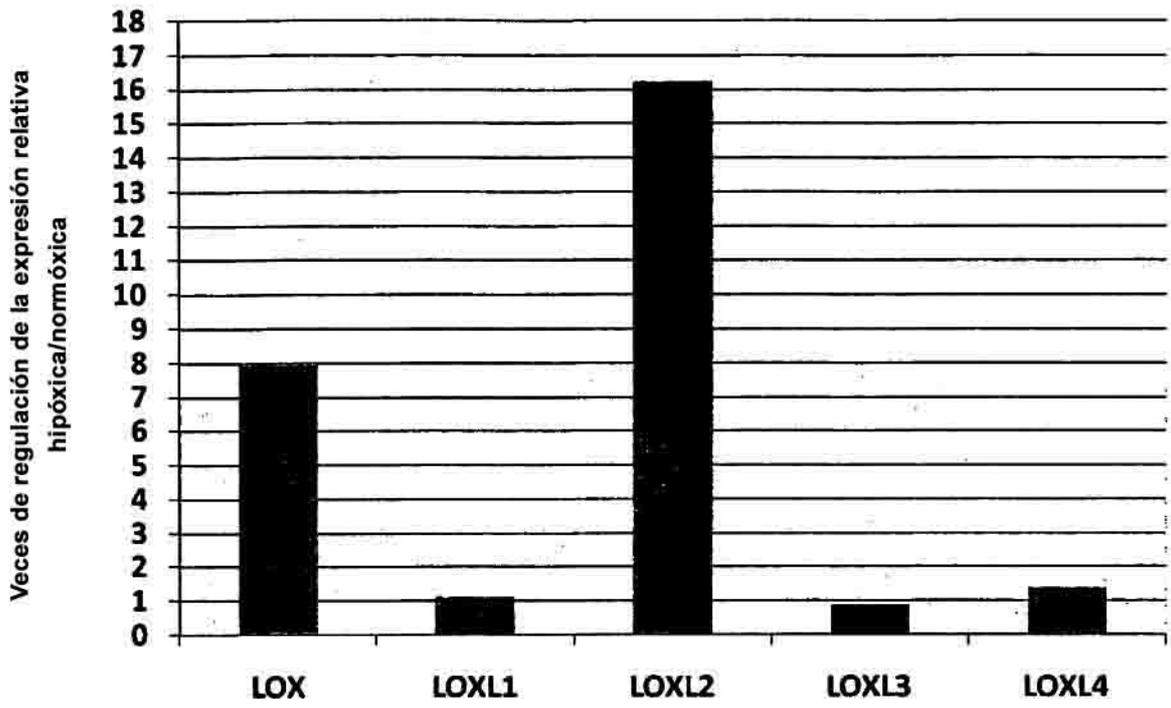


FIG. 34

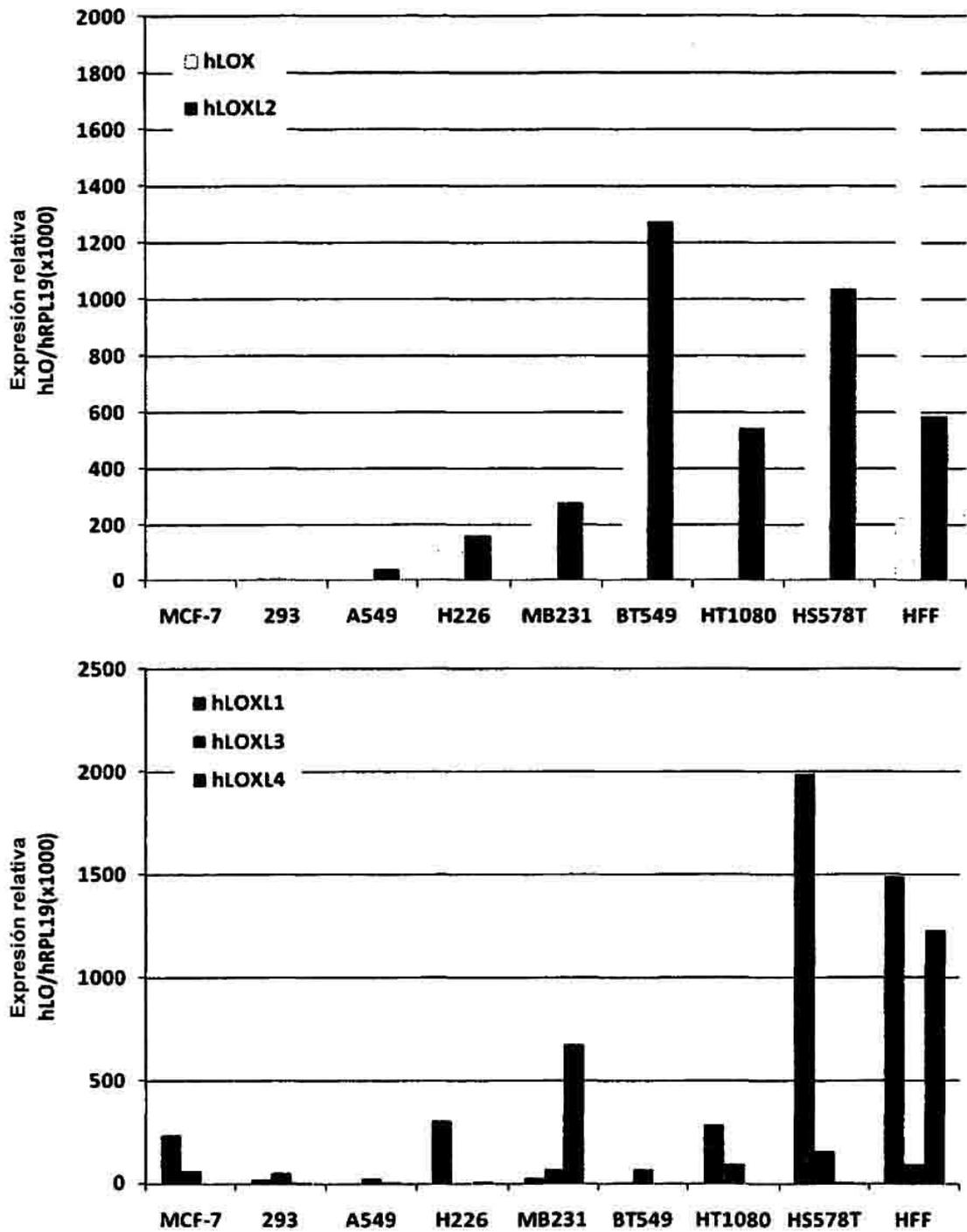


FIG. 35

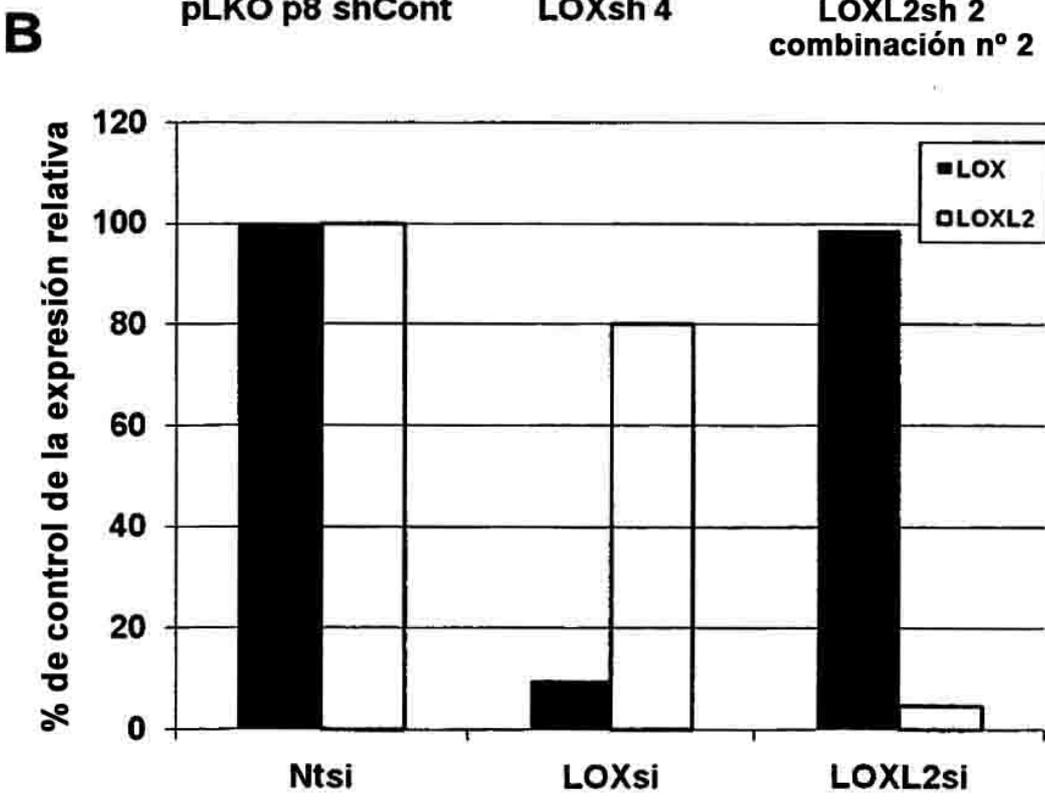
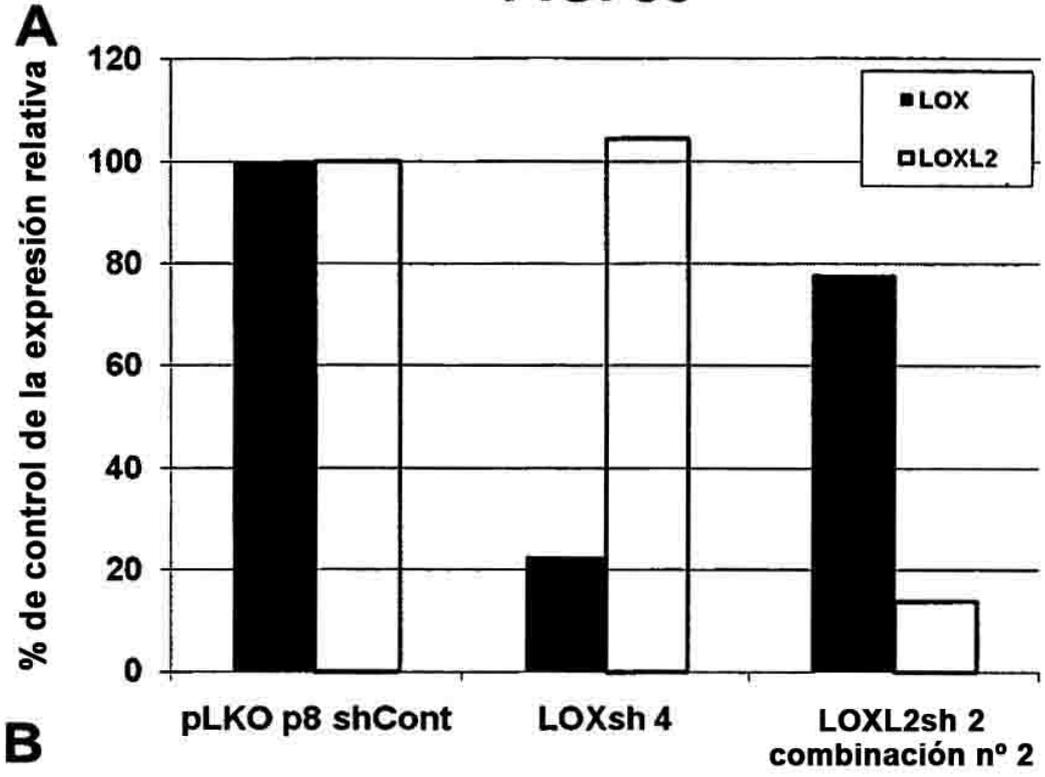
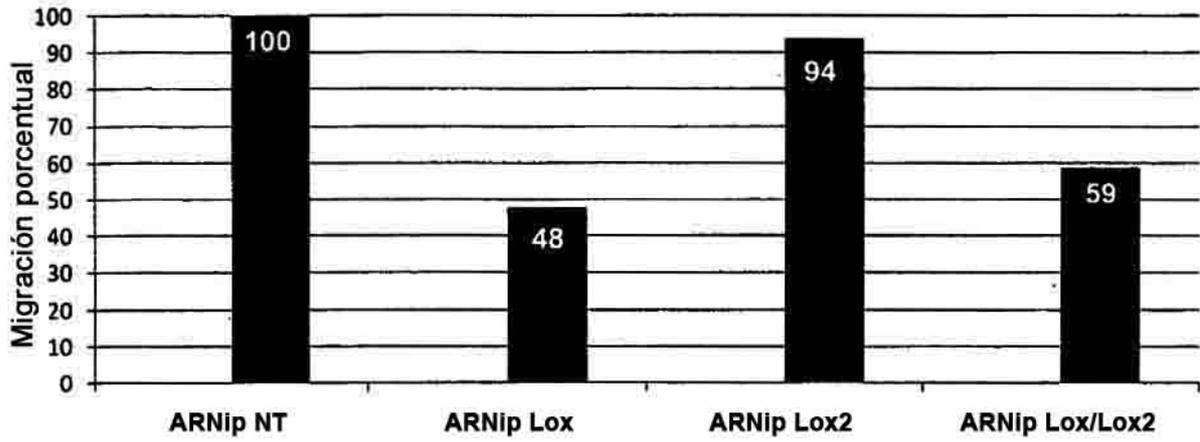


FIG. 35

C



D

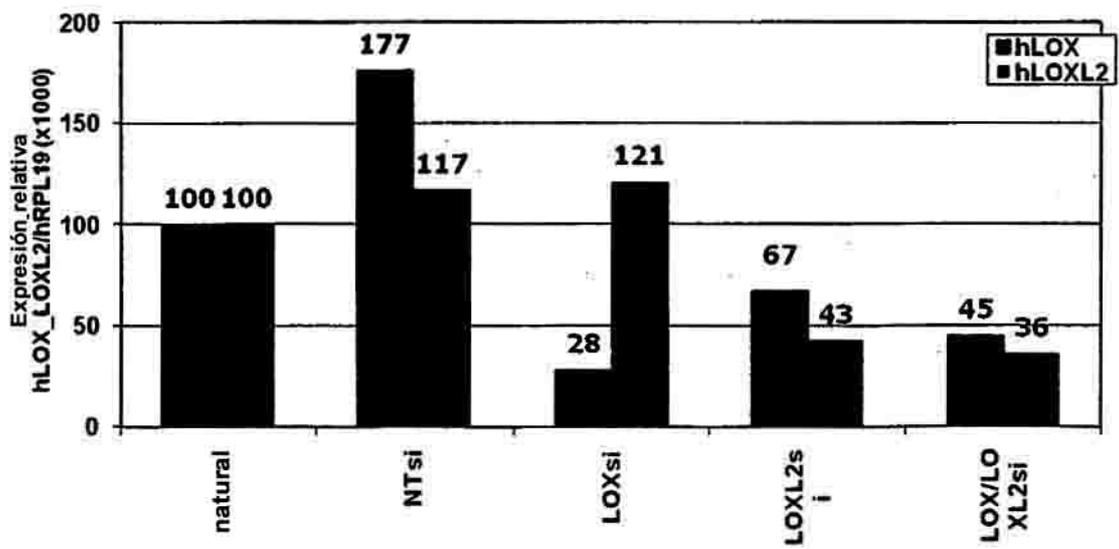
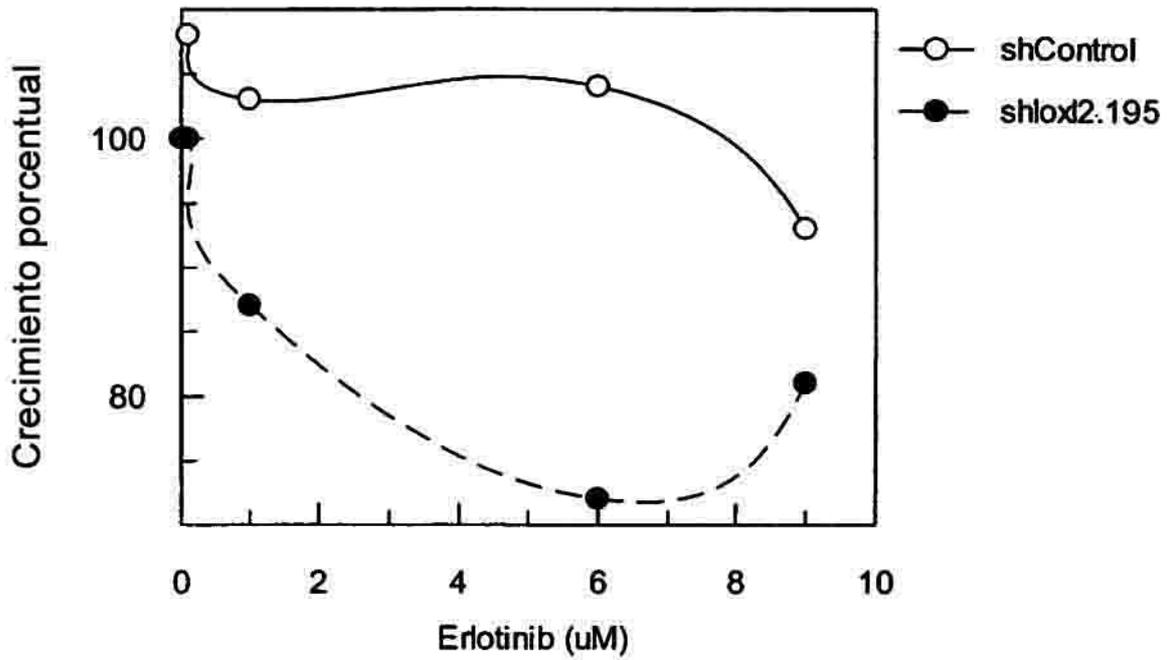


FIG. 36

Sensibilidad a Erlotinib



CI_{50s}

| | |
|-----------|--------|
| shControl | 7,0 uM |
| shlox12.2 | 1,0 uM |

FIG. 37

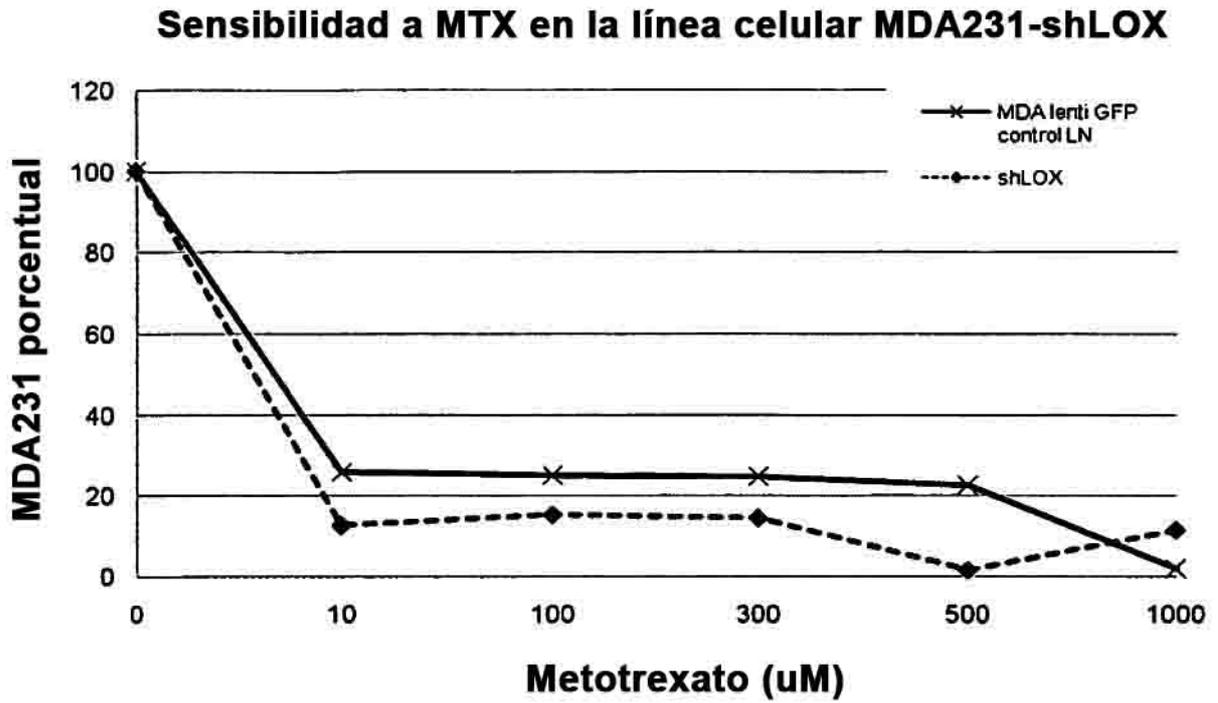


FIG. 38

A

Sensibilidad a DDP en las líneas celulares MDA231-shLOX y LOXL2

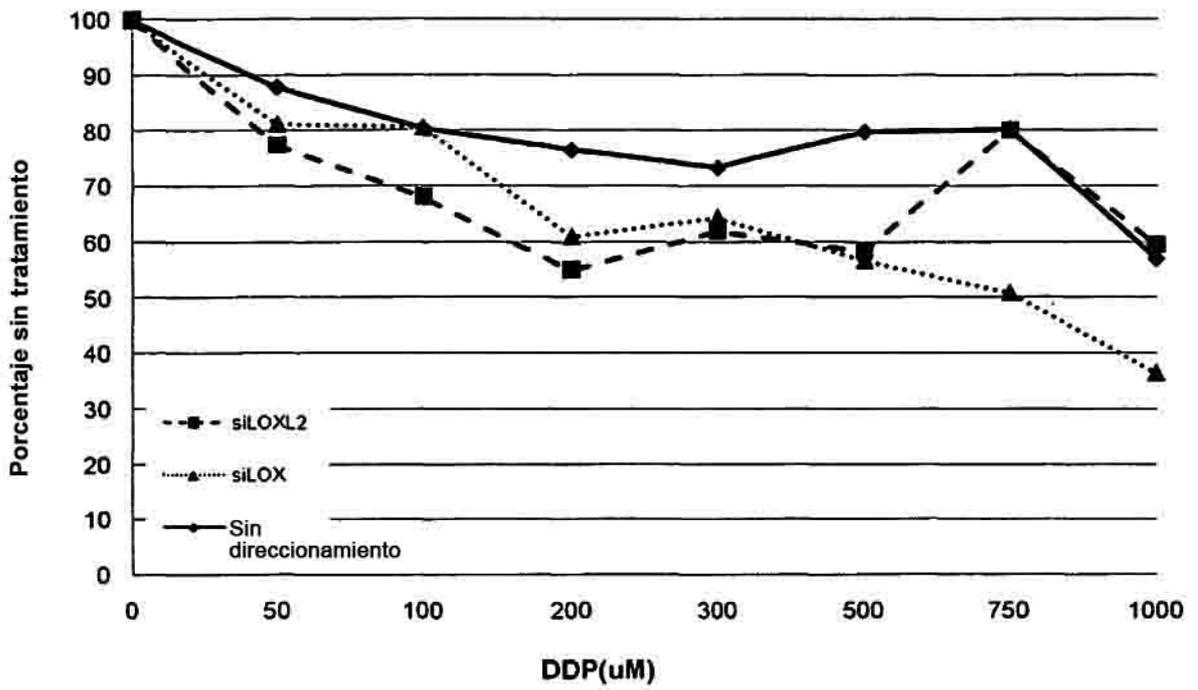
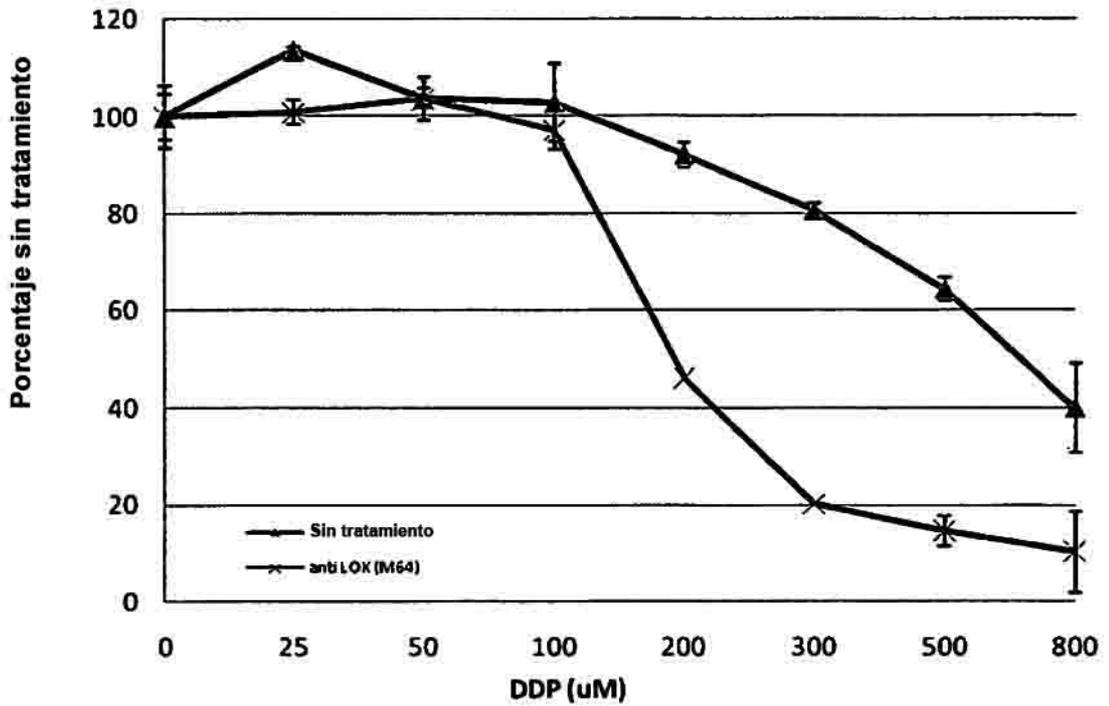


FIG. 38

B

Sensibilidad a DDP en la línea celular MiaPaCa 2 en placas tratadas con TC



C

IC50

| Línea celular | Sin tratamiento (uM) | Anti-LOX (M64) (uM) |
|---------------|----------------------|---------------------|
| 231 | 261,8±72,3 | 242,2±14,4 |
| HT1080 | 207,5±6,9 | 194,2±22,7 |
| MiaPaCa 2 | 664,6±112,8 | 174,7±5,7 |
| BT549 | 384±244,3 | 197,3±28,5 |

FIG. 38

D

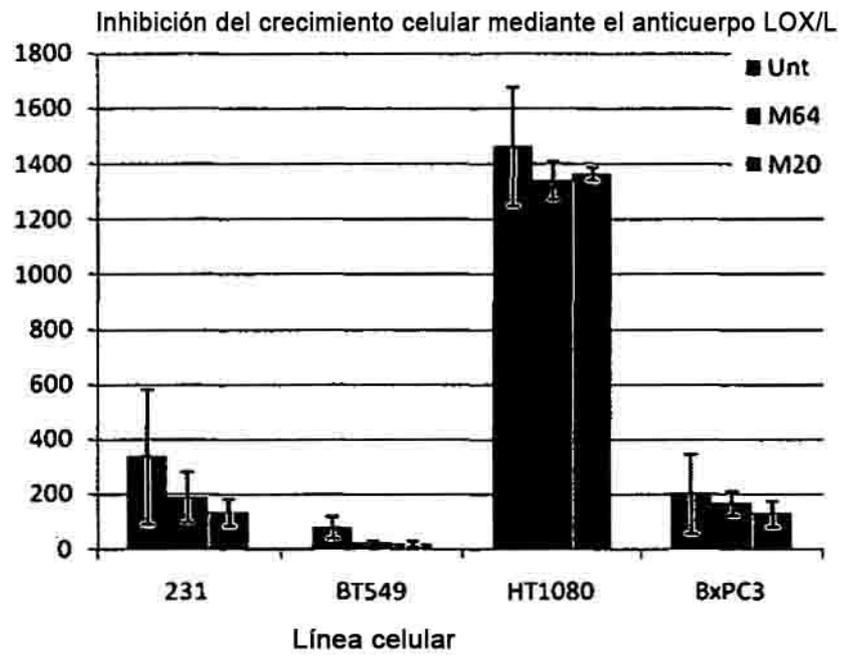


FIG. 39

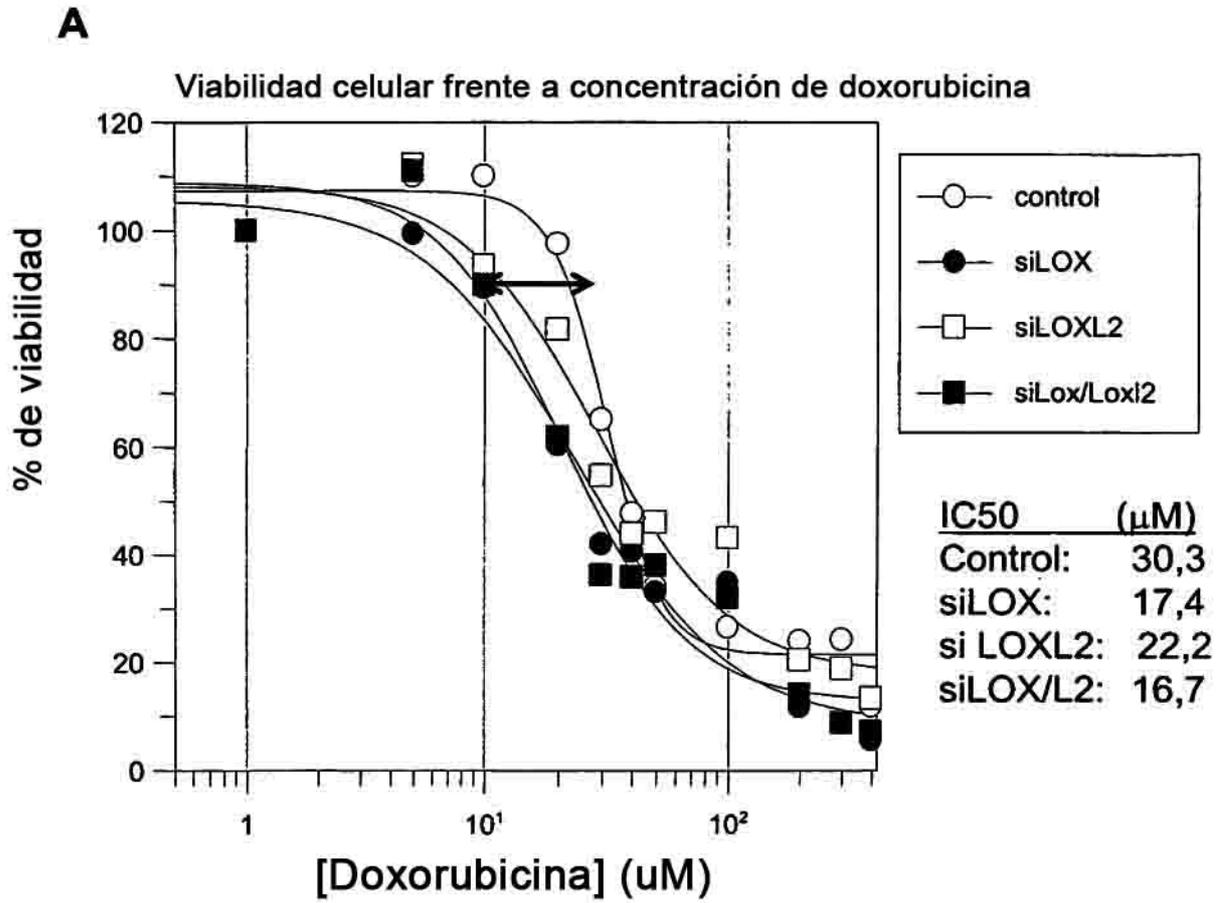


FIG. 39

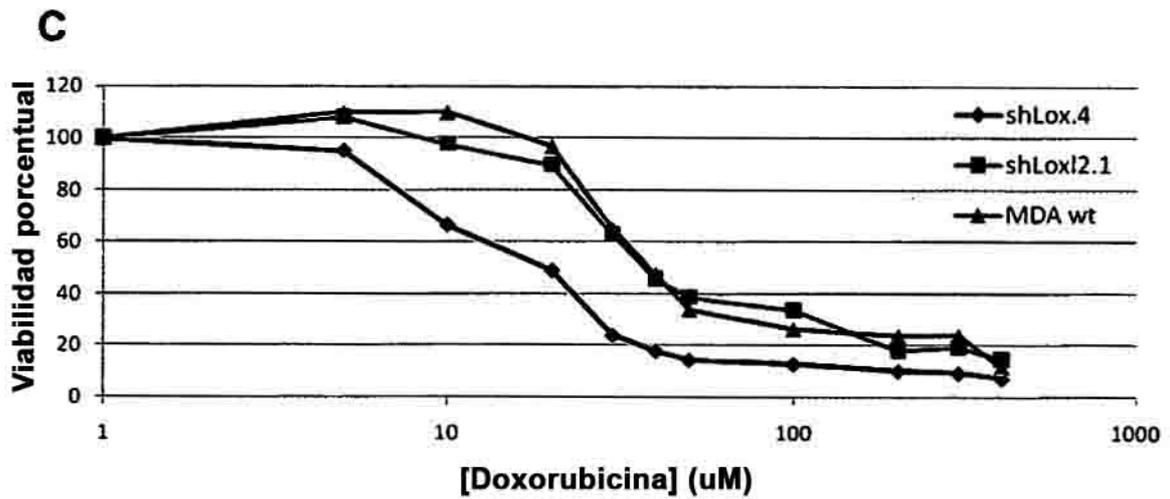
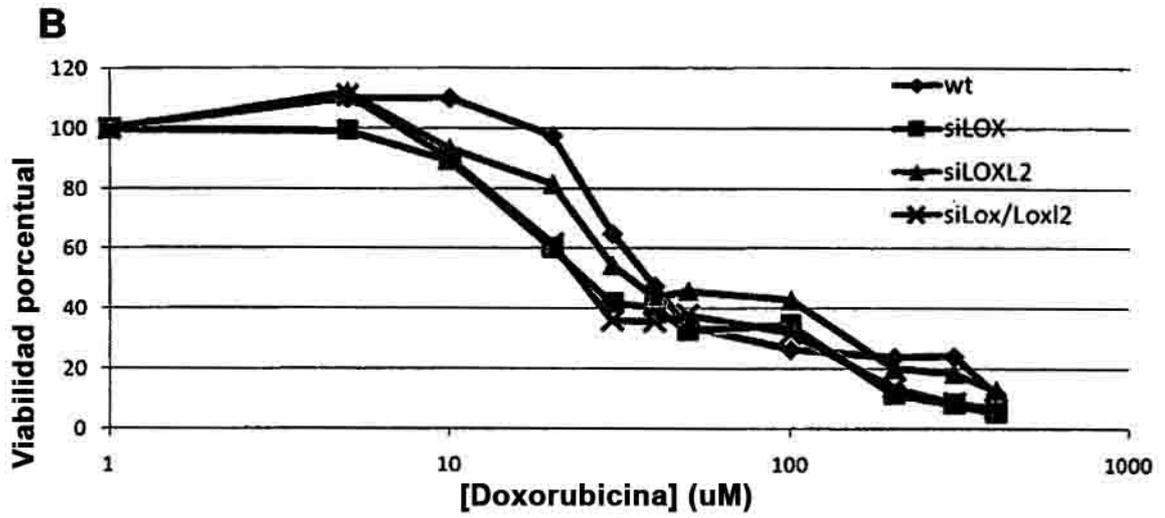


FIG. 40

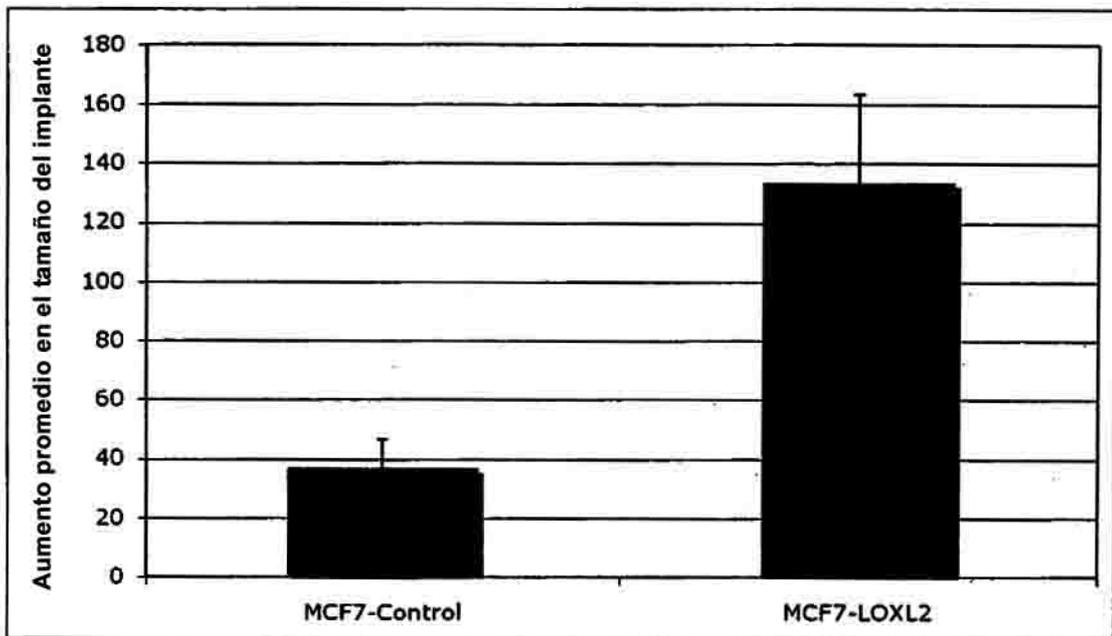


FIG. 41

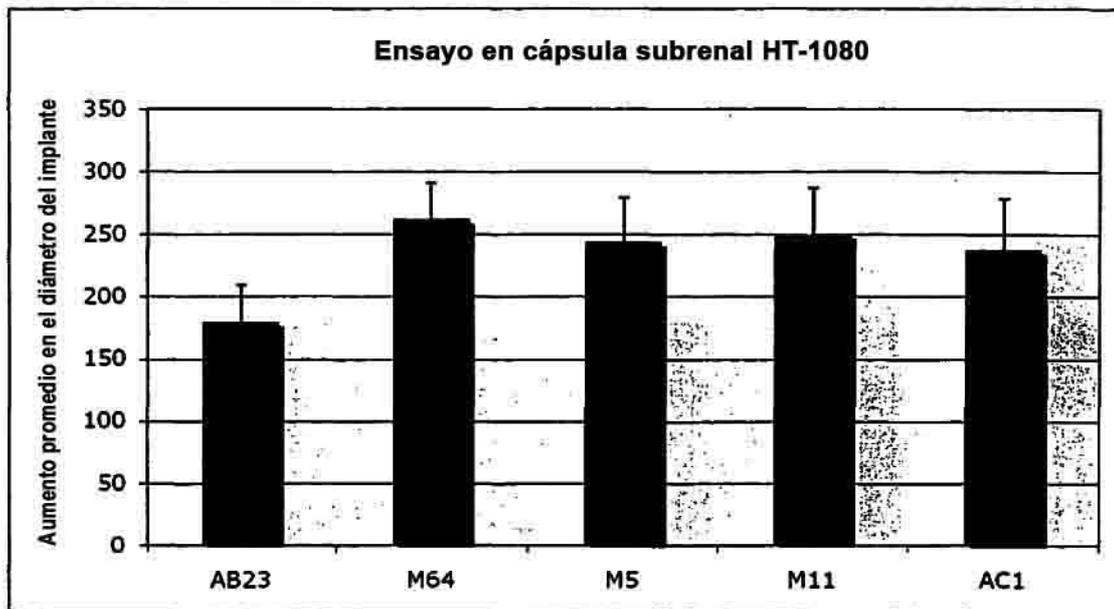


FIG. 42

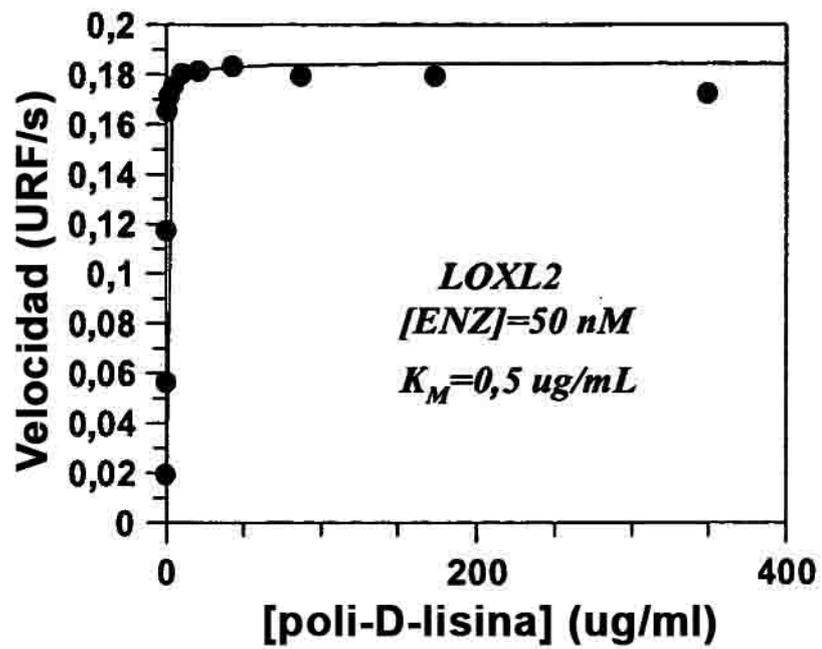


FIG. 43

Inhibición competitiva

- El inhibidor tiene habitualmente similitud estructural con el sustrato
- Se observa inhibición a bajas concentraciones de sustrato, pero se puede superar para concentraciones de sustrato elevadas

Inhibición anticompeticitiva

- El inhibidor se une al sitio que queda disponible una vez que el sustrato se ha unido al sitio activo
- Se observa más inhibición para concentraciones de sustrato elevadas

Inhibición no competitiva

- El inhibidor se une a un sitio alejado del sitio de unión del sustrato
- La inhibición relativa es la misma para todas las concentraciones de sustrato

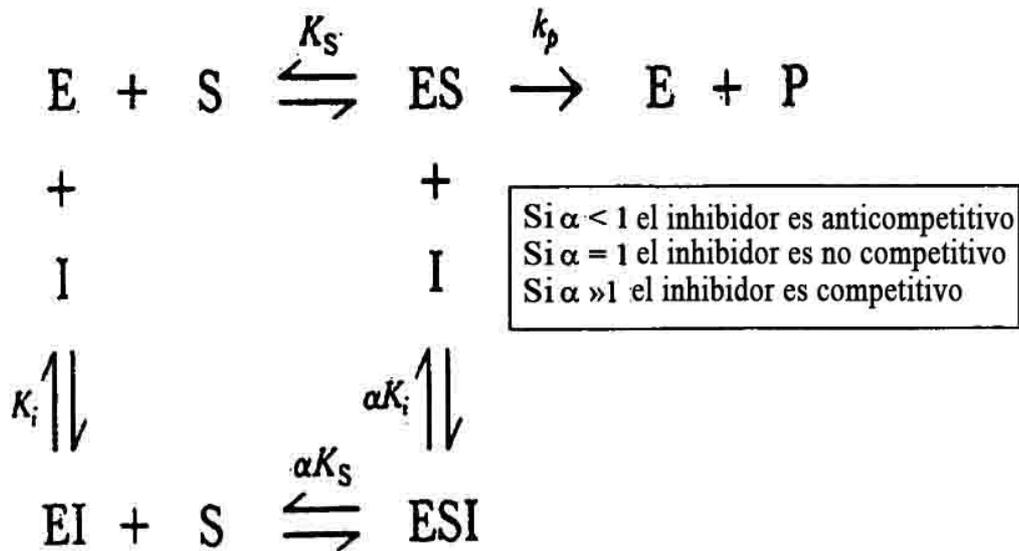


FIG. 44

