

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 490**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2008 E 08830207 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2185198**

54 Título: **Inhibidores de LOX y LOXL2 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

02.08.2007 US 963246 P

02.08.2007 US 963249 P

02.08.2007 US 963282 P

02.08.2007 US 963214 P

02.08.2007 US 963248 P

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

23.04.2015

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:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 534 490 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

Inhibidores de LOX y LOXL2 y usos de los mismos

5 **Antecedentes de la invención**

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 se debe al cáncer. La terapia para el cáncer implica tratar a los pacientes con fármacos quimioterapéuticos para eliminar células tumorales. Sin embargo, los subconjuntos de células tumorales son frecuentemente resistentes a la terapia con fármacos y sobreviven y vuelven a formar poblaciones en los sitios de origen y en sitios metastásicos distantes, dando lugar a una recurrencia detectable de la enfermedad y a morbilidad. Muchas células tumorales de carcinoma que tienen las propiedades de capacidad invasiva y metastásica aumentadas, y resistencia a fármacos alterada, se cree que han sufrido una transformación morfológica que abarca o es similar a la EMT (transición epitelial-mesenquimal). Las células que sufren EMT pierden las propiedades adhesivas normales de las células epiteliales y sufren un espectro de cambios que incluyen la pérdida de la expresión de E-cadherina y la expresión de marcadores mesenquimales, una motilidad aumentada, una invasividad aumentada, y una resistencia aumentada a la muerte celular.

Las principales terapias para el cáncer son actualmente cirugía, radiación y quimioterapia. Las estrategias quimioterapéuticas, tales como antibióticos antitumorales, agentes alquilantes, compuestos de nitrosourea, alcaloides de la vinca, hormonas esteroideas, y antimetabolitos forman la mayoría de las terapias disponibles para los oncólogos. A pesar de los avances en el campo del tratamiento del cáncer, el cáncer sigue siendo un problema de salud importante.

La angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos fuera de los capilares preexistentes, es una secuencia de eventos que es de importancia clave en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos. El crecimiento normal de tejidos, tal como el desarrollo embrionario, cicatrización de heridas, y el ciclo menstrual, está caracterizado por la dependencia de la formación de nuevos vasos para el suministro de oxígeno y nutrientes así como la retirada de productos de desecho. Una gran variedad de enfermedades diferentes y no relacionadas también se asocian con la formación de nueva vasculatura. Entre determinadas patologías, hay afecciones en las que la angiogénesis es baja, y debe potenciarse para mejorar los estados de enfermedad. Más frecuentemente, sin embargo, la angiogénesis excesiva es una característica importante de varias patologías, incluyendo patologías caracterizadas o asociadas con una proliferación de células anormal o no controlada. Las patologías que implican una angiogénesis excesiva incluyen, por ejemplo, cánceres (tumores tanto sólidos como hematológicos), enfermedades cardiovasculares (tales como aterosclerosis y restenosis), inflamación crónica (artritis reumatoide, enfermedad de Crohn), diabetes (retinopatía diabética), psoriasis, endometriosis, glaucoma neovascular y adiposidad (3). Estas afecciones pueden beneficiarse de la inhibición quimioterapéutica de la angiogénesis.

Hablando de manera general, el proceso angiogénico implica la proliferación y migración de un endotelio normalmente quiescente, la proteólisis controlada de la matriz pericelular, y la síntesis de nuevos componentes de matriz extracelular por los capilares en desarrollo. El establecimiento de nuevos contactos intra e intercelulares y la diferenciación morfológica de células endoteliales a redes tubulares de tipo capilar proporciona soporte para su posterior maduración, ramificación, remodelado y regresión selectiva para formar una red microvascular funcional elevadamente organizada. Las interacciones autocrinas, paracrinas y anficrinas del endotelio vascular con sus componentes estromales circundantes, así como con las citocinas pro-angiogénicas y angiostáticas y factores de crecimiento que orquestan la angiogénesis fisiológica, normalmente están estrechamente reguladas tanto espacial como temporalmente.

La angiogénesis es crucial para el crecimiento de tejidos neoplásicos. Durante más de 100 años, se han observado los tumores más como tejidos vasculares que normales. Varios estudios experimentales han sugerido que tanto el crecimiento primario de tumores como la metástasis necesitan neovascularización. A diferencia del proceso bien orquestado descrito anteriormente para el crecimiento normal de tejidos, la angiogénesis patológica necesaria para el crecimiento activo de tumores es generalmente sostenida y persistente, siendo la adquisición inicial del fenotipo angiogénico un mecanismo común para el desarrollo de varios tipos de tumores sólidos y hematopoyéticos. Los tumores que son incapaces de reclutar y mantener una red vascular permanecen normalmente durmientes como lesiones asintomáticas *in situ*. La metástasis también es dependiente de la angiogénesis: para que una célula tumoral metastatice de manera exitosa, generalmente tiene que lograr acceso a la vasculatura en el tumor primario, sobrevivir a la circulación, detenerse en la microvasculatura del órgano diana, salir de esta vasculatura, crecer en el órgano diana, e inducir la angiogénesis en el sitio diana. Por lo tanto, la angiogénesis parece ser necesaria al comienzo así como la compleción de la cascada metastásica.

La capacidad crítica de la angiogénesis para el crecimiento y la metástasis de neoplasias proporciona por lo tanto una diana potencial óptima para los esfuerzos quimioterapéuticos. Los agentes anti-angiogénicos adecuados pueden actuar directamente o indirectamente para influenciar la angiogénesis asociada a tumores ya sea retrasando su aparición (es decir, bloqueando un "interruptor angiogénico") o bloqueando la neovascularización sostenida y focal que es característica de muchos tipos de tumores. Las terapias anti-angiogénesis dirigidas contra el endotelio

asociado al tumor y los múltiples procesos moleculares y celulares y dianas implicadas en la angiogénesis patológica sostenida se están evaluando activamente en cuanto a su seguridad y eficacia en múltiples ensayos clínicos. Sin embargo, ha habido un éxito limitado hasta la fecha en cuanto al descubrimiento y/o identificación de agentes anti-angiogénicos seguros y/o eficaces.

5 La fibrosis es la acumulación anormal de tejido fibrótico que puede suceder como parte del proceso de curación de heridas en el tejido dañado. Dicho daño tisular puede ser el resultado de una lesión física, inflamación, infección, exposición a toxinas, y otras causas.

10 La fibrosis de hígado (hepática), por ejemplo, sucede como parte de la respuesta de curación de heridas en la lesión hepática crónica. La fibrosis sucede como una complicación de la hemocromatosis, la enfermedad de Wilson, el alcoholismo, la esquistosomiasis, la hepatitis vírica, la obstrucción del conducto biliar, exposición a toxinas, y trastornos metabólicos. Esta formación de tejido cicatrizal se cree que representa un intento del cuerpo para encapsular al tejido lesionado. La fibrosis hepática está caracterizada por la acumulación de matriz extracelular que
15 puede distinguirse cualitativamente de aquella en el hígado normal. Si no se controla, la fibrosis hepática progresa a cirrosis (definida por la presencia de nódulos encapsulados), insuficiencia hepática, y la muerte.

Como se resume por 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, toxina o agente infeccioso), la supresión de la inflamación (usando, por ejemplo, corticoesteroides, antagonistas del receptor de IL-1, u otros agentes), la regulación negativa de la activación de células estrelladas usando, por ejemplo, interferón gamma y antioxidantes), la promoción de la degradación de la matriz, o la promoción de la apoptosis de células estrelladas. A pesar del progreso reciente, muchas de estas estrategias todavía se encuentran en etapa experimental, y las terapias existentes están dirigidas a la supresión de la inflamación más que a dirigirse a los
20 procesos bioquímicos subyacentes. Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad en la técnica de materiales y métodos para tratar la fibrosis, incluyendo la fibrosis hepática y pulmonar.

Los tejidos fibróticos se acumulan en el corazón y los vasos sanguíneos a causa de la hipertensión, de la enfermedad cardíaca hipertensiva, aterosclerosis, e infarto de miocardio. La presión sanguínea elevada, o hipertensión, puede estar causada por varios factores y a menudo da lugar al desarrollo de la enfermedad coronaria hipertensiva (HHD) con progresión a paro cardíaco e infarto de miocardio. De manera similar, la aterosclerosis y otras enfermedades cardíacas isquémicas también dan a menudo como resultado paro cardíaco. Todas estas enfermedades cardiovasculares muestran una acumulación de matriz extracelular o deposición fibrótica que da como resultado el endurecimiento de la vasculatura y el enfurecimiento del tejido cardíaco en sí. Esta deposición de material fibrótico es una respuesta al daño inducido por el estado hipertenso y/o esclerótico, pero los efectos de esta respuesta también dan como resultado los efectos negativos del endurecimiento vascular y cardíaco así como dilatación ventricular. Adicionalmente, se cree que la fibrosis cardíaca aumentada observada en la enfermedad cardiovascular interrumpe o altera las señales transmitidas a los cardiomiocitos a través del andamiaje tisular del corazón, dando lugar adicionalmente a la interrupción de la función cardíaca eficiente y a la promoción del paro cardíaco y al infarto de miocardio.
30
35
40

El documento WO 00/44910 describe polipéptidos, proteínas y anticuerpos de Lor-2. Peinado et al, EMBO Journal, vol. 24, Nº 19, 2005, páginas 3446-3458; y Peinado et al, Cancer Research 2008, vol. 68, Nº 12, 15 páginas 4541-4550, se refiere a LOXL2 y su uso como marcador pronóstico de carcinomas de células escamosas. El documento
45 US 2007/021365 se refiere a métodos para identificar inhibidores de LOX y el uso de dichos inhibidores para prevenir o tratar tumores.

Sumario de la invención

50 La Transición de Epitelial a Mesenquimal (EMT) se refiere al proceso mediante el cual una célula con una expresión génica/fenotipo característico de una célula epitelial (es decir, que expresa proteínas, factores y moléculas específicas) cambia o altera su nivel de expresión, lo que da como resultado un cambio en el fenotipo de la célula mostrado por la alteración o cambio en los genes expresados.

55 Se necesitan composiciones que previenen la EMT y que sean efectivas para bloquear la actividad de LOXL2. Dichos inhibidores son útiles para tratar enfermedades y trastornos asociados con niveles aberrantes de LOXL2.

La presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a una proteína asociada a lisil oxidasa 2 (LOXL2), en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une específicamente a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 6 e inhibe la actividad enzimática de la proteína LOXL2, en el que la inhibición es no competitiva. Estas y otras realizaciones de la invención se exponen en la descripción y en las reivindicaciones adjuntas.
60

La referencia en el presente documento a anticuerpos de LOXL2 significa anticuerpos de la invención tal como se han descrito anteriormente.
65

Los anticuerpos que se unen a enzimas pueden ser inhibidores competitivos, inhibidores acompetitivos o inhibidores no competitivos. Respecto de la inhibición competitiva, un inhibidor tiene una similitud estructural con el sustrato. La inhibición será observable a bajas concentraciones de sustrato, pero puede superarse a elevadas concentraciones de sustrato. Respecto de la inhibición acompetitiva, un inhibidor se une en un sitio que se hace disponible después de que el sustrato se une en el sitio activo. La inhibición será más observable a elevada concentración de sustrato. Respecto de la inhibición no competitiva, un inhibidor se une a un sitio distante del sitio de unión del sustrato y la inhibición relativa será generalmente la misma a todas las concentraciones de sustrato. En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento se une específicamente a LOXL2 de longitud completa y procesada. En un aspecto, LOXL2 tanto de longitud completa como procesada son formas activas de la enzima.

En un aspecto, el anticuerpo de LOXL2 de la invención que se une al aminoácido de SEC ID N°: 5 comprende una cadena pesada variable que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1, y una cadena ligera variable que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 2.

En una realización, un anticuerpo de LOXL2 o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una cadena pesada variable que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 1. En otra realización, un anticuerpo de LOXL2 o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una cadena ligera variable que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 2. En otra realización más, un anticuerpo de LOXL2 o fragmento de unión a antígeno del mismo, compite con, o se une específicamente a, cualquiera de los anticuerpos anti-LOXL2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento por unirse a LOXL2. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden unirse específicamente a LOXL2 con una afinidad de unión al menos 2, 5, 10, 50, 100, 500 o 1000 veces mayor que a al menos uno de LOX, LOXL1, LOXL3 o LOXL4.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos anti-LOXL2 humanizados. En una realización, el anticuerpo de LOXL2 humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una cadena pesada variable que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 25, 26, 27 o 28 y una cadena ligera variable que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 30, 31 o 32.

Un anticuerpo de LOXL2 humanizado aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede comprender una cadena pesada variable que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 25, 26, 27 o 28, y una cadena ligera variable que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 30, 31 o 32.

Un anticuerpo de LOXL2 humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede comprender una cadena pesada variable que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 25, 26, 27 o 28.

Un anticuerpo de LOXL2 humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede comprender una cadena ligera variable que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 30, 31 o 32. Pueden efectuarse combinaciones de cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables para evaluar la afinidad de unión.

En el presente documento se proporciona un anticuerpo de LOXL2 humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que compite con, o se une específicamente a, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento por la unión a LOXL2.

En el presente documento se proporciona un anticuerpo de LOXL2 humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a LOXL2, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en el que dicha región variable de cadena ligera comprende:

(i) una FR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 33 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 33 salvo por una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) una sustitución de glutamina (Q) por valina (V) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 24;
- (b) una sustitución de leucina (L) por valina (V) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 30;
- (c) una sustitución de valina (V) por lisina (K) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 31;
- (d) una sustitución de arginina (R) por lisina (K) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 32;

(e) una sustitución de treonina (T) por alanina (A) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 35;

y una eliminación de los restos de aminoácidos 1-19;

5 (ii) una FR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 34 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 34 salvo por una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) una sustitución de lisina (K) por arginina (R) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 3;

10 (b) una sustitución de arginina (R) por alanina (A) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 5, y

15 (iii) una FR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 35 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 35 salvo por una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) una sustitución de lisina (K) por arginina (R) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 1;

20 (b) una sustitución de alanina (A) por valina (V) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 2;

(c) una sustitución de leucina (L) por isoleucina (I) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 4;

25 (d) una sustitución de serina (S) por treonina (T) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 10;

(e) una sustitución de glutamina (Q) por ácido glutámico (E) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 16;

30 (f) una sustitución de treonina (T) por arginina (R) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 21;

(g) una sustitución de ácido aspártico (D) por ácido glutámico (E) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 23;

35 (h) una sustitución de serina (S) por treonina (T) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 25; y

(i) una sustitución de fenilalanina (F) por tirosina (Y) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 29;

40 y

(iv) una FR4 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 36 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 36 salvo por una sustitución de lisina (K) por valina (V) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 7,

45 y en la que dicha región variable de cadena ligera comprende:

50 (i) una FR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 49 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 49 salvo por una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) una sustitución de alanina (A) por treonina (T) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 27;

55 (b) una sustitución de alanina (A) por prolina (P) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 28;

(c) una sustitución de prolina (P) por leucina (L) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 29;

60 (d) una sustitución de valina (V) por leucina (L) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 31;

(e) una sustitución de ácido glutámico (E) por glutamina (Q) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 37;

65 (d) una sustitución de serina (S) por prolina (P) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 38;

(f) una sustitución de valina (R) por alanina (A) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 39;

y una eliminación de los restos de aminoácidos 1-20;

(ii) una FR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 50 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 50 salvo por una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) una sustitución de fenilalanina (F) por tirosina (Y) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 2; y
- (b) una sustitución de arginina (R) por lisina (K) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 5;

(iii) una FR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 51 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 51 salvo por una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) una sustitución de alanina (A) por ácido aspártico (D) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 14; y
- (b) una sustitución de arginina (R) por lisina (K) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 18;

y

(iv) una FR4 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 52 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 52 salvo por una sustitución de lisina (K) por valina (V) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 7.

En una realización, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región FR1 variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEC ID N°: 33, 37 o 44; una región FR2 variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEC ID N°: 34, 38 o 45; una región FR3 variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEC ID N°: 35, 39, 46, 47 o 48; una región FR4 variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEC ID N°: 36 o 40; una región FR1 variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEC ID N°: 49 o 53; una región FR2 variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEC ID N°: 50, 54 o 60; una región FR3 variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEC ID N°: 51, 55 o 61; y una región FR4 variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEC ID N°: 52 o 56.

Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo puede marcarse con un marcador detectable, un marcador terapéutico o ambos.

En una realización, un fragmento de unión a antígeno es, por ejemplo, una cadena pesada variable, una cadena ligera variable, un fragmento Fv, un fragmento scFv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un anticuerpo modificado por ingeniería genética, un anticuerpo monoclonal, o un anticuerpo humanizado.

En el presente documento se proporciona un kit para tratar una afección asociada a LOXL2, que comprende una composición de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las realizaciones precedentes y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Una afección asociada a LOXL2 puede ser, por ejemplo, un tumor, una metástasis, angiogénesis, o fibrosis. Un kit puede comprender además un marcador detectable, un marcador terapéutico o ambos. Los kits pueden comprender además instrucciones escritas que describen cómo conjugar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo con el marcador detectable, un marcador terapéutico o ambos. Además, las instrucciones escritas pueden describir cómo administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En una realización, las composiciones en el kit están libres de pirógenos y pueden, en algunos casos, estar liofilizadas.

En el presente documento se proporciona un método para diagnosticar una afección asociada con LOXL2 que comprende determinar un nivel de LOXL2 en una muestra de un sujeto, poniendo en contacto dicha muestra con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, en el que un cambio en el nivel de LOXL2 en la muestra en comparación con una muestra de referencia indica la presencia o aumento de un tumor o metástasis. Una afección asociada a LOXL2 puede ser, por ejemplo, un tumor, una metástasis, angiogénesis, o una afección fibrótica. En una realización, un aumento en los niveles de LOXL2 en la muestra en comparación con una muestra de referencia indica la presencia de un tumor o una metástasis o un aumento en el crecimiento tumoral o metastásico. Una muestra de referencia es una muestra tomada del sujeto en un punto temporal anterior o una muestra de otro individuo. Los niveles de LOXL2 en la muestra se detectan poniendo en contacto la muestra con cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento. Para fines de detección, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se marca de manera detectable según sea necesario dependiendo del método usado para determinar la unión.

En el presente documento se proporciona un método para inhibir LOXL2 poniendo en contacto una muestra o tejido celular con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento. En una realización, la unión de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a LOXL2 inhibe la acción

enzimática de LOXL2.

La inhibición de LOX o LOXL2 puede reducir el crecimiento tumoral en un sujeto ya sea parcial o totalmente. La inhibición de LOXL2 puede reducir la angiogénesis en un sujeto de tal forma que sucede un beneficio terapéutico. La inhibición de LOXL2 puede reducir la fibrosis en un sujeto de tal forma que sucede un beneficio terapéutico.

En el presente documento se proporciona un método para reducir el crecimiento de un tumor en un sujeto, que comprende administrar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento. Un tumor puede ser un tumor primario o un tumor metastásico. En un aspecto, un tumor es, por ejemplo, cáncer de pulmón (incluyendo adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, carcinoma bronquioalveolar, carcinoma no microcítico, carcinoma microcítico, mesotelioma); cáncer de mama (incluyendo carcinoma ductal, carcinoma lobular, cáncer inflamatorio de mama, carcinoma de células claras, carcinoma mucinoso); cáncer colorrectal (cáncer de colon, cáncer rectal); cáncer anal; cáncer pancreático (incluyendo adenocarcinoma pancreático, carcinoma de células de islote, tumores neuroendocrinos); cáncer de próstata; carcinoma de ovarios (carcinoma epitelial ovárico o tumor epitelial-estromal incluyendo tumor grave, tumor endometroide y cistadenocarcinoma mucinoso, tumor estromal de los cordones sexuales); carcinoma hepático y del conducto biliar (incluyendo carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, hemangioma); carcinoma esofágico (incluyendo adenocarcinoma esofágico y carcinoma de células escamosas); linfoma no de Hodgkin; carcinoma de vejiga; carcinoma del útero (incluyendo adenocarcinoma endometrial, carcinoma seroso papilar uterino, carcinoma uterino de células claras, sarcomas uterinos y leiomiomas, tumores mullerianos mixtos); glioma, glioblastoma, meduloblastoma, y otros tumores del cerebro; cánceres de riñón (incluyendo carcinoma de células renales, carcinoma de células claras, tumor de Wilm); cáncer de la cabeza y cuello (incluyendo carcinomas de células escamosas); cáncer de estómago (adenocarcinoma de estómago, tumor estromal gastrointestinal); mieloma múltiple; cáncer testicular; tumor de células germinales; tumor neuroendocrino; cáncer de cuello de útero; carcinoides del tracto gastrointestinal, mama, y otros órganos; carcinoma de células en anillo de sello; tumores mesenquimales incluyendo sarcomas, fibrosarcomas, hemangioma, angiomatosis, hemangiopericitoma, hiperplasia estromal pseudoangiomatosa, miofibroblastoma, fibromatosis, tumor miofibroblástico inflamatorio, lipoma, angioliopoma, tumor de células granulosas, neurofibroma, schwannoma, angiosarcoma, liposarcoma, rabdiomiosarcoma, osteosarcoma, leiomioma o un leiomiomasarcoma. En una realización, un tumor es, por ejemplo, un tumor de colon, un tumor ovárico, un tumor de pulmón, un tumor esofágico, un tumor de mama, un tumor de próstata, un carcinoma. El tamaño del tumor en un paciente puede reducirse en al menos un 10 %, 25 %, 50 %, 70 %, 90 %, 95 %, o más después del tratamiento en comparación con el tumor en el sujeto antes del tratamiento. En un aspecto, la supervivencia de un sujeto con un tumor aumenta en al menos 10 días, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años, o más en comparación con un sujeto al que no se le administra el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. La carga de tumor metastásico de un sujeto puede estabilizarse después de la administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento. Por ejemplo, la carga de tumor metastásico puede estabilizarse durante al menos 10 días, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más.

En el presente documento se proporciona un método para inhibir la angiogénesis en un sujeto mediante un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento.

En el presente documento se proporciona un método para inhibir una enfermedad fibrótica en un sujeto administrando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento. Las enfermedades fibróticas incluyen, pero sin limitación, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis cardíaca y escleroderma. En una realización, la fibrosis renal incluye, pero sin limitación, nefropatía diabética, reflujo vesiculoureteral, fibrosis renal tubulointersticial; glomerulonefritis o nefritis glomerular, incluyendo glomeruloesclerosis segmental focal y glomerulonefritis membranosa, y nefritis glomerular mesangiocapilar. En una realización, la fibrosis hepática da como resultado fibrosis, y afecciones asociadas tales como hepatitis viral crónica, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis alcohólica (ASH), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis biliar primaria (PBC), cirrosis biliar, y hepatitis autoinmune.

En el presente documento se proporciona un método para disminuir la formación de matriz extracelular poniendo en contacto una muestra de tejido celular con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento. La administración o puesta en contacto puede suceder, en un ejemplo, mediante administración parenteral.

En el presente documento se proporciona un método para controlar la respuesta de un sujeto a la administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento detectando los niveles y/o actividad de LOXL2.

En una realización, dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, está marcado con un marcador terapéutico.

En el presente documento se contempla la terapia combinada en la que los métodos comprenden además la administración conjunta de un segundo agente terapéutico. En una realización, el segundo agente terapéutico es un

anticuerpo o un agente quimioterapéutico.

En el presente documento se proporciona un uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento en la preparación de una formulación para inhibir LOXL2, reducir el crecimiento tumoral, inhibir la angiogénesis, inhibir una enfermedad fibrótica o disminuir la formación de matriz extracelular en un sujeto. En una realización, dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está marcado con un marcador terapéutico y, opcionalmente, un marcador diagnóstico.

En el presente documento se proporciona un uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento en la preparación de una formulación para diagnosticar un tumor o metástasis que comprende determinar los niveles de LOXL2 en una muestra de un paciente, en el que un cambio en los niveles de LOXL2 en la muestra en comparación con una muestra de referencia indica la presencia de un tumor o una metástasis o un aumento en el crecimiento tumoral o metastásico. En una realización, Dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está marcado con un marcador diagnóstico.

Breve descripción de los dibujos

Las características de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención en referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y las ilustraciones que la acompañan.

La Figura 1 ilustra la enzimología de la lisil oxidasa. Las enzimas LOX/L actúan a través de un mecanismo de ping-pong que puede describirse mediante cinética de Michaelis-Menten.

La Figura 2 ilustra modos comunes de inhibición enzimática.

La Figura 3 ilustra que β APN es un inhibidor competitivo de LOXL2.

La Figura 4 ilustra modos de inhibición enzimática: LOXL2.

La Figura 5 ilustra la localización extracelular de LOXL2 y la función de LOXL2 extracelular.

La Figura 6A proporciona las secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada y la Figura 6B proporciona las secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena ligera de un anticuerpo que se une a la región SRCR3-4 de LOXL2. Para cada región variable, los péptidos de señal se muestran en cursiva, las CDR están subrayadas y el comienzo de la región marco conservada constante se muestra en negrita.

La Figura 7A proporciona las secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada y las Figuras 7B y 7C proporcionan las secuencias de aminoácidos de dos regiones variables de cadena ligera de anticuerpos que se unen a LOX. Para cada región variable, los péptidos de señal se muestran en cursiva y las CDR están subrayadas.

La Figura 8 proporciona una actualización de la exploración de proteínas B utilizando anticuerpos anti-LOXL2. Se determinó la actividad enzimática de LOXL2.

La Figura 9 ilustra la actividad enzimática de un anticuerpo anti-LOXL2, AB0023.

La Figura 10 demuestra que el anticuerpo anti-LOXL2, AB0023 es un inhibidor no competitivo.

La Figura 11 ilustra la afinidad de unión y la velocidad de disociación del anticuerpo anti-LOXL2, AB0023.

La Figura 12 ilustra el mapeo de dominios del anticuerpo anti-LOXL2, AB0023; AB0023 se une al dominio SRCR 3-4 de LOXL2.

La Figura 13 muestra que el anticuerpo anti-LOXL2, AB0023, demuestra una inhibición consistente de la migración/invasión en colágeno I y colágeno IV, a partir de sobrenadantes a través de 10 ml de material de preparación y a mayor escala en 100 ml de material de preparación y de ascitis. También se observa inhibición parcial en ensayos de adhesión celular. En las muestras de ensayo, las células en el ensayo migran a través del suero y se mide la fluorescencia para determinar el recuento y la migración celular. La barra del extremo izquierdo es una muestra de control en la que no hay presente anticuerpo y la capa inferior contiene suero (control positivo para invasión celular). La segunda barra desde la derecha es un control negativo en el que no hay presente anticuerpo y la capa inferior no contiene suero.

La Figura 14 proporciona secuencias de aminoácidos de las cadenas variable pesada (VH) y variable ligera (VL) del anticuerpo monoclonal murino AB0023 (anti-hLOXL2). Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se muestran mediante subrayado en negrita. La Figura 14 también proporciona variantes humanizadas del anticuerpo murino monoclonal. Los restos en las regiones marco conservadas (FR) de las cadenas variables ligera y pesada que difieren del anticuerpo monoclonal murino se muestran mediante guiones (---) o mediante subrayado en cursiva.

La Figura 15 demuestra que M64 se une a LOX de manera dependiente de la dosis. El lote 3 tiene una K_D de 6,6 nM, El lote 4 tiene una K_D de 5,0 nM y el lote 5 tiene una K_D de 5,7 nM.

La Figura 16 ilustra la afinidad de unión del anticuerpo anti-LOX M64.

La Figura 17 demuestra que los anticuerpos anti-LOXL2 inhibieron el crecimiento celular de cuatro líneas celulares derivadas de cáncer.

La Figura 18 demuestra un efecto sinérgico de un anticuerpo anti-LOX en combinación con cisplatino. Los valores de CI_{50} de M64 también se determinaron en cuatro líneas celulares.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al campo de la medicina, incluyendo el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Un aspecto de la invención se refiere a LOXL2 como indicador de la progresión de la enfermedad y una diana para agentes terapéuticos.

La presente invención proporciona una metodología innovadora y composiciones y kits relacionados para diagnosticar o controlar varias enfermedades asociadas con la proliferación celular anormal, la angiogénesis y la fibrosis, usando agentes que reconocen específicamente a formas activas o maduras de proteínas de tipo lisil oxidasa (LOXL2).

Se proporcionan métodos para diagnosticar o controlar la metástasis del cáncer en un sujeto, que comprenden: determinar los niveles de LOXL2 activa o la actividad en la sangre o en un tumor, mediante los cuales un cambio en los niveles de LOXL2 activa o en la actividad en la sangre o en el tumor en comparación con una muestra de referencia, indica la presencia de crecimiento de tumor metastásico.

Tal como se describe en más detalle más adelante, Los niveles de LOX2 activa pueden determinarse mediante diversos métodos que incluyen, pero sin limitación, inmunohistoquímica usando anticuerpos que se unen específicamente a la forma activa o madura de LOXL2. La actividad enzimática de LOXL2 activa puede medirse usando varios métodos que incluyen, pero sin limitación, ensayos cromogénicos y fluorométricos.

También se proporcionan en el presente documento anticuerpos o fragmento de unión a antígeno de los mismos, que reconocen específicamente formas activas de LOXL2, métodos para generar anticuerpos contra formas activas de LOXL2, y un método para usar los anticuerpos para tratar la proliferación anormal de células, la angiogénesis y la fibrosis.

I. Definiciones generales

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto habitual en la materia a la cual pertenece esta invención. Si una definición expuesta en esta sección es contraria o de otro modo no consistente con una definición expuesta en las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones, prevalece la definición expuesta en esta sección. Los encabezados proporcionados en el presente documento son solo por comodidad.

Tal como se usa en el presente documento, "un", "una", o "uno" significa "al menos uno" o "uno o más".

La expresión "sustitución conservativa de aminoácidos" se refiere a un agrupamiento de aminoácidos basándose en determinadas propiedades comunes. Una forma funcional para definir propiedades comunes entre aminoácidos individuales es analizar las frecuencias normalizadas de cambios de aminoácidos entre proteínas correspondientes de organismos homólogos (Shulz, G. E. y R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). De acuerdo con dichos análisis, pueden definirse grupos de aminoácidos donde los aminoácidos dentro de un grupo se intercambian preferentemente entre sí, y por lo tanto se asemejan entre sí sobre todo en su impacto en la estructura general de la proteína (Shulz, G. E. y R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). Los ejemplos de grupos de aminoácidos definidos de este modo incluyen:

- (i) un grupo cargado, que consiste en Glu y Asp, Lys, Arg y His,
- (ii) un grupo cargado positivamente, que consiste en Lys, Arg y His,
- (iii) un grupo cargado negativamente, que consiste en Glu y Asp,
- (iv) un grupo aromático, que consiste en Phe, Tyr y Trp,
- (v) un grupo de anillo de nitrógeno, que consiste en His y Trp,
- (vi) un grupo grande alifático no polar, que consiste en Val, Leu e Ile,
- (vii) un grupo ligeramente polar, que consiste en Met y Cys,
- (viii) un grupo de resto pequeño, que consiste en Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gln y Pro,
- (ix) un grupo alifático que consiste en Val, Leu, Ile, Met y Cys, y
- (x) y un pequeño grupo hidroxilo que consiste en Ser y Thr.

Además de los grupos presentados anteriormente, cada resto de aminoácido puede formar su propio grupo, y el grupo formado por un aminoácido individual puede citarse simplemente mediante la abreviatura de una y/o tres letras para ese aminoácido usada de forma común en la técnica tal como se describe anteriormente.

Un "resto conservado" es un aminoácido que es relativamente invariable a lo largo de varias proteínas similares. Normalmente, los restos conservados solo variarán siendo sustituidos con un aminoácido similar, tal como se describe anteriormente para "sustitución de aminoácido conservativa".

La letra "x" o "xaa" tal como se usa en secuencias de aminoácidos en el presente documento pretende indicar que puede ponerse cualquiera de los veinte aminoácidos estándar en esta posición a menos que se indique

específicamente lo contrario. Para los fines del diseño de peptidomiméticos, una "x" o un "xaa" en una secuencia de aminoácidos puede reemplazarse por un mimético del aminoácido presente en la secuencia diana, o puede reemplazarse el aminoácido por un espaciador de esencialmente cualquier forma que no interfiera con la actividad del peptidomimético.

5 "Homología" o "identidad" o "similitud" se refiere a la similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología y la identidad pueden cada una determinarse comparando una posición en cada secuencia que puede alinearse con fines de comparación. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando el sitio equivalente está ocupado por el mismo o por un resto de aminoácido similar (por ejemplo, similar en su naturaleza estérica y/o electrónica), se puede decir que las moléculas son homólogas (similares) en esa posición. La expresión como un porcentaje de homología/similitud o identidad se refiere a la función del número de aminoácidos similares o idénticos en posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Una secuencia que está "no relacionada" o es "no homóloga" comparte menos de un 40 % de identidad, aunque preferentemente menos de un 25 % de identidad con una secuencia de la presente invención. Al comparar dos secuencias, la ausencia de restos (aminoácidos o ácidos nucleicos) o la presencia de restos adicionales también disminuye la identidad y homología/similitud.

20 El término "homología" describe una comparación de base matemática de similitudes de secuencias que se usa para identificar genes o proteínas con funciones o motivos similares. Las secuencias del ácido nucleico (nucleótido, oligonucleótido) y del aminoácidos (proteína) de la presente invención puede usarse como una "secuencia de consulta" para efectuar una búsqueda en una base de datos pública para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia, secuencias relacionadas u homólogos. Dichas búsquedas pueden efectuarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas BLAST de nucleótidos pueden efectuarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de la palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas BLAST de aminoácidos pueden efectuarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de la palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a moléculas de proteínas de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, puede usarse Gapped BLAST tal como se describe en Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y BLAST) (véase, www.ncbi.nlm.nih.gov).

35 Tal como se usa en el presente documento, "identidad" significa el porcentaje de nucleótidos o aminoácidos idénticos en posiciones correspondientes en dos o más secuencias cuando se alinean las secuencias para maximizar el emparejamiento de secuencias, es decir, teniendo en cuenta espacios en blanco e inserciones. La identidad puede calcularse fácilmente mediante métodos conocidos, incluyendo, pero sin limitación aquellos descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Parte I*, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Los métodos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar la coincidencia mayor entre las secuencias probadas. Además, los métodos para determinar la identidad están codificados en programas informáticos públicamente disponibles. Los métodos de programas informáticos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete informático GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.* 215: 403-410 (1990) y Altschul et al. *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402 (1997)). El programa BLAST X está públicamente disponible a través del NCBI y otras fuentes (Manual de BLAST, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990)). También puede usarse el algoritmo bien conocido Smith Waterman para determinar la identidad.

La expresión "sustancialmente idéntico" significa identidad entre una primera secuencia de aminoácidos que contiene un número suficiente o mínimo de restos de aminoácidos que son i) idénticos a, o ii) sustituciones conservativas de restos de aminoácidos alineados en una segunda secuencia de aminoácidos de tal forma que la primera y la segunda secuencia de aminoácidos pueden tener un dominio estructural común y/o actividad funcional común. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos sustancialmente idénticas a LOX contienen un dominio estructural común que tiene al menos un 60 %, o 65 % de identidad, probablemente un 75 % de identidad, más probablemente un 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con LOX. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos que contienen un dominio estructural común que tiene al menos aproximadamente un 60 %, o 65 % de identidad, probablemente un 75 % de identidad, más probablemente un 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con LOXL2 se denominan suficiente o sustancialmente idénticas. En el contexto de secuencia de nucleótidos, la expresión "sustancialmente idénticas" se usa en el presente documento para referirse a una primera secuencia de ácido nucleico que contiene un número suficiente o mínimo de nucleótidos que son idénticos a nucleótidos alineados en una segunda secuencia de ácido nucleico de tal forma que la primera y la segunda secuencia de aminoácidos codifican un polipéptido que tienen una

actividad funcional común, o codifican un dominio polipeptídico estructural común o una actividad polipeptídica funcional común. Por ejemplo, secuencias de nucleótidos que tienen al menos aproximadamente un 60 %, o 65 % de identidad, probablemente un 75 % de identidad, más probablemente un 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con secuencias de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento se denominan sustancialmente idénticas.

II. Proteínas lisil oxidasa (LOX) y similar a lisil oxidasa (LOXL)

Normalmente, los tumores sólidos contienen áreas de baja tensión de oxígeno (hipoxia). Las células hipóxicas presentan un gran problema en el tratamiento del cáncer debido a que estas células son elevadamente agresivas, metastásicas y resistentes a la terapia. Los mecanismos subyacentes que contribuyen a estas características se conocen poco. La metástasis supone un problema particular en el cáncer de mama ya que no hay un tratamiento eficaz para la mayoría de pacientes con cáncer de mama metastásico detectable (Steege, PS. Br. Can. Res. 2(6): 396-9 (2000)).

La matriz extracelular (ECM) puede tener una influencia importante en las células tumorales (Chang y Werb. Trends Cell. Biol. 11: S37-43 (2001); y Radisky et al. Semin. Cancer Bio. 11: 87-95 (2001)). Los ratones expuestos a hipoxia muestran aumentos específicos de tejido de la actividad de lisil oxidasa (LOX), una oxidasa de amina que juega un papel esencial en la formación y mantenimiento de la ECM (Brody et al. Am. Rev. Respir. Dis. 120: 1289-95 (2001)). Un estudio con micromatrices reciente confirmó que LOX es un gen inducido por hipoxia en varias líneas celulares (Denko, NC. Oncogene 22: 5907-14 (2003)). Sin embargo, no se identificó un papel biológico de LOX en condiciones hipóxicas. LOX inicia la reticulación covalente de colágenos y elastina en la ECM, aumentando la deposición de matriz insoluble y la fuerza tensil (Kagan y Li. J. Cell. Biochem. 88: 660-72 (2003)). La expresión de LOX es esencial para la curación de heridas y una función normal del tejido conectivo, y los ratones *knockout* mueren pronto después del alumbramiento debido a la inestabilidad cardiovascular (Homstra et al. J. Biol. Chem. 278: 14387-93 (2003)). La actividad disminuida de LOX se asocia con enfermedades, tales como el síndrome de Ehler-Danlos (Pinnell, SR. J. Invest. Dermatol. 79 (Sup. 1): 90S-92S (1982); Royce et al. Biochem. J. 192: 579-86 (1980); y Khakoo et al. Clin. Genet. 51: 109-14 (1997)). La actividad de LOX aumentada contribuye a enfermedades fibróticas y de remodelado de tejidos, tales como cirrosis hepática (Kagan, HM. Pathol. Res. Pract. 190: 910-0 (1994); Chanki et al. Br. J. Dermatol. 133: 710-5 (1995); y Ooshima y Midorikawa. Jpn. Circ. J. 41: 1337-40 (1977)).

La expresión elevada de LOX se correlaciona con un estadio aumentado en el cáncer de células renales (Stassar et al. Br. J. Cancer, 85: 1372-82 (2001)), y una expresión aumentada de LOX se observa en líneas celulares de cáncer de mama elevadamente metastásicas y/o invasivas (Kirschmann et al. Breast Cancer Res. Treat. 55: 127-36 (1999); y Kirschmann et al. Cancer Res. 62: 4478-83 (2002)). Por el contrario, LOX actúa como un supresor tumoral en revertientes no tumorigénicos de fibroblastos transformados por ras (Smith-Mungo y Kagan. Matrix Biol. 16: 387-98 (1998)). La pérdida de LOX se asocia con la tumorigénesis en varios tipos de cáncer, tales como el cáncer gástrico, de colon y de próstata (Ren et al. Cancer Res. 58: 1285-90 (1998); Cxiszar et al. Int. J. Cancer 97: 636-42 (2002); y Kaneda et al. Cancer Res. 64: 6410-5 (2004)). Puede parecer, sin embargo, que el papel supresor de tumores de LOX depende del tipo celular y del estado de transformación. Se demostró recientemente que el dominio de propéptido (y no la enzima activa) es responsable de las actividades supresoras de tumores. En cáncer de mama, la expresión aumentada de LOX se asocia con la reacción estromal temprana (Decitre et al. Lab. Invest. 78: 143-51 (1998)), y el tratamiento con LOX antisentido en este tipo celular de cáncer previene la invasión *in vitro* (Kirschmann et al. Cancer Res. 62: 4478-83 (2002)).

La secuencia de aminoácidos de LOXL2 comparte una extensa homología de secuencia con los dominios conservados de unión a cobre y catalíticos tanto de LOX como de LOXL. Estos dominios conservados están codificados por cinco exones consecutivos en los genes de LOX, LOXL, y LOXL2 que también mantienen la conservación de estructura exón-intrón. La conservación de la secuencia de nucleótidos y la deducida de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de LOXL2, LOX, y LOXL incluye el dominio de unión a cobre (WEWHSCHQHYH) en LOX y LOXL y WIWHDCHRHYH en LOXL2 con las cuatro histidinas que proporcionan ligandos de nitrógeno para el complejo de coordinación de cobre específico para las proteínas de lisil oxidasa (Krebs y Krawetz, Biochim. Biophys. Acta 1202: 7-12 (1993)). El sitio activo en LOX (DIDCQWWIDITDVXPGNY) y en LOXL2 (DIDC-QWVDITDVPPPGDY) contiene, en cada uno, un resto de Tyr (Y) en el extremo COOH terminal, que participa junto con un resto de Lys en la formación del cofactor de quinona que está presente en estas proteínas. Diez cisteínas características de LOX y LOXL están conservadas de manera similar en LOXL2 (Kagan et al., (1994) en Molecular Biology and Pathology of Elastic Tissue (Mecham, R. P., y Roberts, L., eds), Ciba Foundation Symposium Series, Wiley, Chichester, R.U.). También se ha identificado un dominio de factor de crecimiento y de receptor de citocina presente en las proteínas LOX y LOXL en la secuencia de aminoácidos derivada de LOXL2. También están presentes cuatro repeticiones del dominio rico en cisteína del receptor limpiador (*scavenger*) de LOXL2 (Saito et al., J. Biol. Chem 272: 8157-8160 (1997), Resnick et al., Trends Biochem Sci. 19: 5-8 (1994)).

Se han observado tres sitios principales de terminación de la traducción en los dominios 3'-UTR del ADNc de LOXL2. El primer sitio de terminación está a 690 pb 3' del codon de terminación, el segundo sitio está a 740 pb, y el sitio de terminación de la transcripción final está a 900 pb 3' del codon de terminación. Estos ARNm todos tienen regiones 3'-UTR que difieren ligeramente en tamaño. La mayor parte de límites exón-intrón del gen de LOXL2

muestran la secuencia consenso (C/T)AG-exón-GT(A/G). Los tamaños de los 11 exones del gen de LOXL2 están en el intervalo de 112 a 940 pb. Aunque el gen de LOXL2 tiene 11 exones, cinco exones consecutivos (exones 6-10), que codifican los dominios de unión a cobre y catalíticos, muestran un 84 % de similitud de secuencia, y los tamaños de los exones son muy similares a los correspondientes exones de los genes de LOX y LOXL. Todos los demás exones en el gen de LOXL2 son divergentes tanto en secuencia como en tamaño. Se ha identificado LOXL2 en todos los tejidos a excepción de los leucocitos de la sangre. El ARNm de LOXL2 se ha detectado en el corazón, hígado, y páncreas; la expresión es significativamente mayor en la placenta, próstata, útero, y páncreas (proporciones entre 2 y 3) en comparación con una menor expresión en el cerebro, pulmón, músculo esquelético, timo, y riñón (proporciones por debajo de 0,5). (Jourdan-Le Saux, et al. J. Biol. Chem., 274(18): 12939-12944 (1999)).

La expresión de LOX y las diferentes proteínas de LOXL varía en diferentes enfermedades. Esto puede deberse a varias razones, tales como la diferencia en la distribución de tejidos, su procesamiento, dominios, regulación de actividad, así como otras diferencias entre las proteínas. Por ejemplo, LOX y LOXL están implicadas en enfermedades fibróticas ya que tanto LOX como LOXL están elevadamente expresadas en miofibroblastos alrededor de las áreas fibróticas (Kagen, Pathol. Res. Pract. 190:910-919 (1994); Murawaki et al., Hepatology 14:1167-1173 (1991); Siegel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2945-2949 (1978); Jourdan Le-Saux et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 199:587-592 (1994); Kim et al., J. Cell Biochem. 72:181-188 (1999)). LOX y las diversas LOXL también están implicadas en varios cánceres. Por ejemplo, se ha demostrado que LOXL y LOXL4 están silenciadas epigenéticamente y pueden inhibir la vía de señalización de cinasas reguladas por señales extracelulares/ras en el cáncer de vejiga humano (Wu et al., Cancer Res. 67:4123-4129 (2007)). Otros han demostrado la regulación positiva selectiva y la amplificación del gen de LOXL2 en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Gorough et al., J. Pathol. 212:74-82 (2007)). LOX y LOXL2 también se han implicado en varios tumores, tales como cánceres de colon y esofágicos (Csiszar, Prog. Nucl. Acid Res. 70:1-32 (2001)). En cáncer de mama, LOX y los miembros de la familia de LOXL se han relacionado con el cáncer (Kirschmann et al., Cancer Res. 62:448-4483 (2002)).

La lisil oxidasa cataliza la desaminación oxidativa de los restos de peptidil lisina e hidroxil lisina en colágenos, y de restos de peptidil lisina en elastina. Los aldehídos de peptidilo resultantes se condensan espontáneamente y sufren reacciones de oxidación para formar las reticulaciones covalentes derivadas de lisina necesarias para la integridad estructural normal de la matriz extracelular. En la reacción de la lisil oxidasa con sus sustratos, se liberan peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y amonio en cantidades estequiométricas con el producto de aldehído de peptidilo. Véase, por ejemplo, Kagan et al., J. Cell. Biochem. 88:660-72 (2003).

La lisil oxidasa se secreta dentro del ambiente extracelular donde se procesa posteriormente mediante escisión proteolítica hasta una encima funcional de 30 kDa y un propéptido de 18 kDa. La lisil oxidasa de 30 kDa es enzimáticamente activa mientras que la proenzima de 50 kDa no lo está. Las C-proteinasas de procolágeno procesan la pro-lisil oxidasa a su forma activa y son productos de los genes de Bmp1, Tll1 y Tll2. La localización de la enzima es principalmente extracelular, aunque la lisil oxidasa procesada también se localiza intracelular y nuclearmente. La codificación de secuencia para el propéptido está moderadamente conservada (60-70 %) entre las proteínas de LOX y LOXL, mientras que la secuencia que codifica la región C-terminal de 30 kDa de la proenzima en la que se localiza el sitio activo está elevadamente conservada (aproximadamente un 95 %). Véase Kagan et al., J. Cell Biochem. 59:329-38 (1995). LOX se induce por varios factores de crecimiento y esteroides tales como TGF-β, TNF-α e interferón (Csiszar, Prog. Nucl. Acid Res. 70:1-32 (2001)).

Se sabe que existen cinco lisil oxidasas diferentes tanto en humanos como en ratones, LOX y cuatro relacionadas con LOX, o proteínas similares a LOX (LOXL, LOXL2, LOXL3, LOXL4). LOX y las proteínas similares a LOX se citan de manera colectiva como "LOX/LOXL" para los fines de la presente divulgación. Las cinco formas de lisil oxidasas residen en cinco cromosomas diferentes. Estos miembros de la familia muestran cierto solapamiento en estructura y función, pero también parecen tener funciones distintas. Por ejemplo, aunque la principal actividad de LOX es la oxidación de restos de lisina específicos en el colágeno y elastina fuera de la célula, también puede actuar intracelularmente, donde puede regular la expresión génica. Además, LOX induce la quimiotaxis de monocitos, fibroblastos y células musculares lisas. Además, una eliminación de LOX en ratones *knockout* parece ser letal en el parto (Hornstra et al., J. Biol. Chem. 278:14387-14393 (2003)), mientras que la deficiencia en LOXL no causa un fenotipo de desarrollo grave (Bronson et al., Neurosci. Lett. 390:118-122 (2005)).

La principal actividad de LOX es la oxidación de restos de lisina específicos en el colágeno y elastina fuera de la célula, sin embargo, también puede actuar intracelularmente, donde puede regular la expresión génica (Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12817-12822 (1997); Giampuzzi et al., J. Biol. Chem. 275:36341-36349 (2000)). Además, LOX induce la quimiotaxis de monocitos, fibroblastos y células musculares lisas (Lazarus et al., Matrix Biol. 14:727-731 (1995); Nelson et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 188:346-352 (1988)). LOX en sí se induce por varios factores de crecimiento y esteroides tales como TGF-β, TNF-α e interferón (Csiszar, Prog. Nucl. Acid Res. 70:1-32 (2001)). Los estudios recientes han atribuido otros papeles para LOX en varias funciones biológicas, tales como la regulación del desarrollo, la supresión tumoral, la motilidad celular, y la senescencia celular. El papel diverso de LOX, y su familia de amino oxidasas recientemente descubierta, similar a LOX (LOXL), puede jugar papeles importantes con su localización intracelular y extracelular.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "lisil oxidasa" se refiere a una enzima que cataliza la

- siguiente reacción: peptidil-L-lisil-péptido + O₂ + H₂O → peptidil-alisil-péptido + NH₃ + H₂O₂. Otros sinónimos para lisil oxidasa (EC 1.4.3.13) incluyen proteína-lisina 6-oxidasa y proteína-L-lisina:oxígeno 6-oxidoreductasa (desaminativa). Véase, por ejemplo, Harris et al., *Biochim. Biophys. Acta* 341:332-44 (1974); Rayton et al., *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 tirosil quinina en su centro activo, cataliza mediante LOX la oxidación de peptidil lisina para dar como resultado la formación de peptidil alfa-aminoadípico-delta-semialdehído. Una vez formado, este semialdehído puede condensarse espontáneamente con aldehídos vecinos o con otros grupos lisilo para formar reticulaciones intra e intercadena. Véase, por ejemplo, Rucker et al., *Am. J. Clin. Nutr.* 67:996S-1002S (1998).
- El término "LOX" se refiere a una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a un polipéptido expresado o traducido de una de las siguientes secuencias: Números de referencia EMBL/GenBank: M94054 (SEC ID N°: 10); AAA59525.1 (SEC ID N°: 11) - ARNm; S45875 (SEC ID N°: 12); AAB23549.1 (SEC ID N°: 13) - ARNm; S78694 (SEC ID N°: 14); AAB21243.1 (SEC ID N°: 15) - ARNm; AF039291 (SEC ID N°: 16); AAD02130.1 (SEC ID N°: 17) - ARNm; BC074820 (SEC ID N°: 18); AAH74820.1 (SEC ID N°: 19) - ARNm; BC074872 (SEC ID N°: 20); M84150 (SEC ID N°: 22); AAA59541.1 (SEC ID N°: 23) - ADN genómico. Una realización de LOX es preproteína de lisil oxidasa humana (hLOX) que tiene una secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 7), una hLOX secretada después de la escisión del péptido de señal, tal como SEC ID N°: 8 o una hLOX madura tras el procesamiento proteolítico, tal como SEC ID N°: 9.
- LOX tiene dominios de proteína elevadamente conservados, conservados en varias especies incluyendo seres humanos, ratón, rata, pollo, peces y *Drosophila*. La familia de LOX humana tiene una región C-terminal elevadamente conservada que contiene el dominio catalítico de LOX de 205 aminoácidos. La región conservada contiene el sitio de unión a cobre (Cu), el dominio de similar a receptor de citocina conservado (CRL), y el sitio de cofactor de lisil-tirosilquinona (LTQ). También están conservados de manera similar doce restos de cisteína, en los que dos de ellos residen dentro de la región de propéptido y diez están en la forma procesada catalíticamente activa de LOX (Csiszar, *Prog. Nucl. Acid Res.* 70:1-32 (2001)). La región conservada también incluye un dominio de unión a fibronectina.
- La región de propéptido de LOX contiene el péptido de señal, y se escinde, siendo el sitio de escisión previsto entre Cys21-Ala22, para generar un péptido de secuencia de señal y una forma de propéptido de aminoácidos de 48 kDa de LOX, que todavía está inactiva. El propéptido se glucosila en N durante su paso a través del aparato de Golgi que se secreta en el ambiente extracelular donde la proteína, o propéptido, se escinde entre Gly168-Asp169 por medio de una metaloproteasa, una C-proteinasa de procolágeno, que son productos de los genes de *Bmp1*, *Tll11* y *Tll2*. BMP I (proteína morfogenética del hueso I) es una C-proteinasa de procolágeno que procesa al propéptido para producir una enzima funcional de 30 kDa y un propéptido de 18 kDa. La secuencia que codifica al propéptido está moderadamente conservada (60-70 %), mientras que la secuencia que codifica la región C-terminal de 30 kDa de la proenzima en la que se localiza el sitio activo está elevadamente conservada (aproximadamente un 95 %). (Kagan y Li, *J. Cell. Biochem.* 88:660-672 (2003); Kagan et al., *J. Cell Biochem.* 59:329-38 (1995)). Las unidades de N-glucosilo se retiran posteriormente. LOX aparece en formas no procesadas y/o procesadas (maduras). La forma madura de LOX está normalmente activa, sin embargo, en algunas realizaciones, LOX no procesada está también activa.
- Los ejemplos particulares de una enzima o proteína de LOXL se describen en Molnar et al., *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. (Nótese que en estas 3 publicaciones, "LOXL1" fue citado como "LOXL" mientras que en la presente invención "LOXL" se usa para referirse a proteínas similares a lisil oxidasa en general, no solo a LOXL1). Estas enzimas incluyen LOXL1, codificada por un ARNm depositado en GenBank/EMBL BC015090; AAH15090.1; LOXL2, codificada por un ARNm depositado en GenBank/EMBL U89942; LOXL3, codificada por un ARNm depositado en GenBank/EMBL AF282619; AAK51671.1; y LOXL4, codificada por un ARNm depositado en GenBank/EMBL AF338441; AAK71934.1.
- Se han predicho péptidos de señal potenciales similares a los descritos anteriormente para LOX en el extremo amino terminal de LOXL, LOXL2, LOXL3, y LOXL4. Los sitios de escisión de la señal predichos están entre Gly25-Gln26 para LOXL, entre Ala25-Gln26, para LOXL2, y entre Gly25-Ser26 para LOXL3. El consenso para la escisión de BUMP-1 en pro-colágenos y pro-LOX está entre Ala/Gly-Asp, y a menudo está seguido por un resto ácido o cargado. Un sitio de escisión potencial para generar LOXL activo es Gly303-Asp304, sin embargo, después está seguido de una Pro atípica. LOXL3 también tiene un sitio potencial de escisión en Gly447-Asp448, que está seguido de un Asp, el procesamiento en este sitio puede dar lugar a un péptido activo de tamaño similar a LOX activo. También se identificó un sitio potencial de escisión de BMP-1 en LOXL4, en los restos Ala569-Asp570 (Kim et al., *J. Biol. Chem.* 278:52071-52074 (2003)). LOXL2 también puede escindirse proteolíticamente de manera análoga a los otros miembros de la familia de LOXL y se secreta (Akiri et al., *Cancer Res.* 63:1657-1666 (2003)).
- Las enzimas de LOX y LOXL actúan a través de mecanismos de ping-pong que pueden describirse mediante cinética de Michaelis-Menten (véase la Figura 1).
- Un ejemplo de proteína de LOX o LOXL incluye la enzima que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente

idéntica a un polipéptido expresado o traducido a partir de una de las siguientes secuencias: Referencias EMBL/GenBank: 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.

5 Los términos "LOX" y "LOXL" también abarcan fragmentos funcionales o derivados que mantienen sustancialmente la actividad enzimática catalizando la desaminación de restos de lisilo. Normalmente, un fragmento funcional o derivado mantiene al menos un 50 % o 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de su actividad de oxidación de lisilo. También se pretende que una proteína de LOX o LOXL2 pueda incluir sustituciones de aminoácidos conservativas que no alteren esta actividad sustancialmente. Las sustituciones conservativas adecuadas de aminoácidos son conocidas para los expertos en la materia y pueden efectuarse generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en la materia reconocerán que, por lo general, sustituciones sencillas de aminoácidos en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica. Véase, por ejemplo, Watson, et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4ª Edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224. Las sustituciones conservativas y no conservativas de aminoácidos se han descrito anteriormente.

20 Una característica no conocida como común entre las proteínas LOX y LOXL es el dominio rico en cisteína de receptor limpiador (*scavenger*) (SRCR). LOX y LOXL carecen de dominios SRCR, mientras que LOXL2, LOXL3, y LOXL4 tienen cada una cuatro dominios SRCR en el extremo N-terminal. Los dominios SRCR se encuentran en proteínas secretadas, transmembrana o de la matriz extracelular. Se sabe que los dominios SRCR median la unión a ligando en varias proteínas secretadas y receptoras (Hoheneste et al., *Nat. Struct. Biol.* 6:228-232 (1999); Sasaki et al., *EMBO J.* 17:1606-1613 (1998)). Otro dominio único para LOXL es la presencia de un dominio rico en prolina (Molnar et al., *Biochimica Biophysica Acta* 1647:220-224 (2003)).

25 La distribución en tejidos también puede diferir entre LOX y las diversas LOXL. LOX está elevadamente expresada en el corazón, placenta, testículos, pulmón, riñón y útero, pero de manera marginal en el cerebro e hígado. LOXL1 está expresada en la placenta, riñón, músculo, corazón, pulmón, y páncreas, y al igual que con LOX, tiene una expresión mucho más baja en el cerebro e hígado (Kim et al., *J. Biol. Chem.* 270:7176-7182 (1995)). LOXL2 está elevadamente expresada en el útero, placenta, y otros órganos, pero de manera similar a LOX y LOXL, bajamente expresada en el cerebro e hígado (Jourdan Le-Saux et al., *J. Biol. Chem.* 274:12939:12944 (1999)). LOXL3 está elevadamente expresada en los testículos, bazo, y próstata, moderadamente en la placenta, y no expresada en el hígado, mientras que LOXL4 está elevadamente expresada en el hígado (Huang et al., *Matrix Biol.* 20:153-157 (2001); Maki y Kivirikko, *Biochem. J.* 355:381-387 (2001); Jourdan Le-Saux et al., *Genomics* 74:211-218 (2001); Asuncion et al., *Matrix Biol.* 20:487-491 (2001)).

40 La expresión, o implicación de LOX y las diferentes proteínas de LOXL, en enfermedades también puede variar. Esto puede deberse a varias razones, tales como la diferencia en la distribución de tejidos, su procesamiento, dominios, regulación de actividad, así como otras diferencias entre las proteínas. Por ejemplo, LOX y LOXL están implicadas en enfermedades fibróticas ya que tanto LOX como LOXL están elevadamente expresadas en miofibroblastos alrededor de las áreas fibróticas (Kagen, *Pathol. Res. Pract.* 190:910-919 (1994); Murawaki et al., *Hepatology* 14:1167-1173 (1991); Siegel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2945-2949 (1978); Jourdan Le-Saux et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 199:587-592 (1994); Kim et al., *J. Cell Biochem.* 72:181-188 (1999)). LOX y las diversas LOXL también están implicadas en varios cánceres. Por ejemplo, se ha demostrado que LOXL y LOXL4 están silenciadas epigenéticamente y pueden inhibir la vía de señalización de cinasas reguladas por señales extracelulares/ras en el cáncer de vejiga humano (Wu et al., *Cancer Res.* 67:4123-4129 (2007)). Otros han demostrado la regulación positiva selectiva y la amplificación del gen de LOXL2 en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Gorough et al., *J. Pathol.* 212:74-82 (2007)). LOX y LOXL2 también se han implicado en varios tumores, tales como cánceres de colon y esofágicos (Csizsar, *Prog. Nucl. Acid Res.* 70:1-32 (2001)). En cáncer de mama, LOX y los miembros de la familia de LOXL se han relacionado con el cáncer (Kirschmann et al., *Cancer Res.* 62:448-4483 (2002)).

III. Transición epitelial - mesenquimal

55 La Transición de Epitelial a Mesenquimal (EMT) se refiere al proceso mediante el cual una célula con una expresión génica/fenotipo característico de una célula epitelial (es decir, que expresa proteínas, factores y moléculas específicas) cambia o altera su nivel de expresión, lo que da como resultado un cambio en el fenotipo de la célula mostrado por la alteración o cambio en los genes expresados.

60 Las células epiteliales y mesenquimales representan distintos linajes, cada uno con un perfil de expresión génica único que imparte atributos específicos para cada tipo celular. La conversión de una célula epitelial en una célula mesenquimal necesita alteraciones en la morfología, arquitectura celular, adhesión, y/o capacidad de migración. Las células de tumores avanzados muestran frecuentemente una regulación negativa llamativa de marcadores epiteliales y una pérdida de uniones intercelulares, que da como resultado una pérdida de polaridad epitelial y una adhesión intercelular reducida. La pérdida de las características epiteliales está a menudo acompañada por una motilidad celular aumentada y la expresión de genes mesenquimales. La EMT puede incluir la pérdida de inhibición por

contacto, un control del crecimiento alterado, y/o una invasividad potenciada (Christiansen y Rajasekaran, *Cancer Res.*, 66(17): 8319-8326 (2006); y Thiery et al., *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 15: 740-6 (2003)). Las características moleculares y morfológicas indicativas de EMT se correlacionan con una pobre diferenciación histológica, la destrucción de la integridad tisular, y la metástasis. La EMT proporciona mecanismos para que las células epiteliales superen las restricciones físicas impuestas sobre ellas por las uniones intercelulares y adopten un fenotipo móvil (Burdsal et al. *Development*, 118:829-44 (1993); y Nieto et al., *Mech. Dev.*, 105:27-35 (2001)).

Los marcadores moleculares usados de manera común para la EMT incluyen la expresión aumentada de N-cadherina y vimentina, la localización nuclear de β -catenina, y la producción aumentada de los factores de transcripción, tales como Snail (caracol), Snai2 (babosa), Twist, EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2, y/o E47 que inhiben la producción de E-cadherina. Los marcadores fenotípicos para una EMT incluyen, pero sin limitación, una capacidad aumentada para la migración e invasión tridimensional, así como resistencia a la apoptosis. Estos marcadores se han correlacionado además con la inducción de la EMT y una asociación con fenotipos cancerosos.

La aparición de EMT durante la progresión del tumor permite a las células tumorales adquirir la capacidad de infiltrarse en el tejido circundante y en último lugar metastatizar a sitios distantes. Los cambios en la expresión génica en las células tumorales pueden indicar una progresión de patrón de expresión génica epitelial o similar a epitelial a un patrón de expresión génica mesenquimal o similar a mesenquimal. A modo de ejemplo, la identificación de la pérdida de E-cadherina está correlacionada con el carcinoma metastásico así como a la resistencia a terapias contra el cáncer tales como inhibidores de EGFR e inhibidores de IGF-R1. El análisis de muchos tipos diferentes de cáncer revela que las células tumorales en circulación, o aquellas encontradas como micrometástasis, evidencian la conversión mesenquimal basándose en cambios de expresión en un conjunto de marcadores. Estos marcadores incluyen, pero sin limitación, EGFR, E-cadherina, ErbB3, RAB25, integrina beta 6, cadherina-2, proteína 1 de unión a factor de crecimiento de fibroblastos, caja homeótica distal-less 1, ZEB1 (factor de transcripción 8), SIP1, y vimentina.

A modo de ejemplo, un perfil de expresión génica similar a epitelial incluye la expresión, o aumento de expresión de genes tales como E-cadherina, ErbB3, o EGFR. Un perfil de expresión génica de tipo epitelial puede incluir la expresión de uno o más de estos genes, al menos dos, o al menos tres de estos genes.

Al igual que con los cánceres resistentes a terapia descritos anteriormente, los niveles de expresión de E-cadherina, ErbB3, RAB25, integrina beta 6, cadherina-2, proteína 1 de unión a factor de crecimiento de fibroblastos, caja homeótica distal-less 1, ZEB1 (factor de transcripción 8), SIP1, TGF- β , FOXC2, GSK-3 β , Smad-3, Pez, Snail1, Snail2, e ILK, y vimentina representan genes que son comunes a características de EMT así como con aquellas células tumorales/cánceres de base epitelial que desarrollan resistencia a sus respectivas terapias. La presente invención también se refiere generalmente a un método para tratar a un paciente con cáncer, y particularmente un cáncer que ha experimentado EMT. Los inventores han descubierto que los cánceres pueden haber experimentado EMT o han cambiado de un patrón de expresión génica de tipo epitelial a un patrón de expresión génica similar a epitelial responden a los inhibidores de LOX/LOXL.

Para la determinación de la expresión de biomarcadores epiteliales o mesenquimales de células tumorales, pueden usarse muestras de pacientes que contienen células tumorales o proteínas o ácidos nucleicos producidos por estas células tumorales en los métodos descritos, por ejemplo, en la Publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos Número 20070065858. En resumen, el nivel de expresión del biomarcador puede determinarse determinando la cantidad (por ejemplo, cantidad absoluta o concentración) del marcador en una muestra de células tumorales, por ejemplo, una biopsia tumoral obtenida de un paciente, u otra muestra del paciente que contiene material derivado del tumor (por ejemplo, sangre, suero, orina, u otros fluidos corporales o excreciones tal como se define anteriormente en el presente documento). La muestra celular puede, por supuesto, someterse a varias técnicas preparativas y de almacenamiento después de su recolección (por ejemplo, extracción de ácidos nucleicos y/o proteínas, fijación, almacenamiento, congelación, ultrafiltración, evaporación, centrifugación, etc.) antes de determinar la cantidad del marcador en la muestra. Del mismo modo, las biopsias de tumores también pueden someterse a técnicas preparativas y de almacenamiento después de la recolección, por ejemplo, fijación.

Se puede detectar la expresión de proteínas biomarcadores que tienen al menos una porción que se muestran sobre la superficie de las células tumorales que la expresan. Es una tarea simple para el experto en la materia determinar si una proteína marcadora, o una porción de la misma, está expuesta sobre la superficie celular. Por ejemplo, pueden usarse métodos inmunológicos para detectar dichas proteínas en células completas, o métodos de análisis de secuencia asistidos por ordenador para predecir la presencia de al menos un dominio extracelular (es decir, incluyendo tanto proteínas secretadas como proteínas que tienen al menos un dominio de superficie celular). La expresión de una proteína marcadora que tiene al menos una porción que se muestra sobre la superficie de una célula que la expresa puede detectarse sin lisar necesariamente la célula tumoral (por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente con un dominio de superficie celular de la proteína).

La expresión de biomarcadores puede determinarse mediante cualquiera de una amplia variedad de métodos bien conocidos para detectar la expresión de un ácido nucleico transcrito o proteína. Los ejemplos no limitantes de dichos métodos incluyen, por ejemplo, métodos inmunológicos para la detección de proteínas secretadas, de la superficie

celular, citoplásmicas, o nucleares, métodos de purificación de proteínas, ensayos de función o actividad de proteínas, métodos de hibridación de ácido nucleico, métodos de retrotranscripción de ácido nucleico, y métodos de amplificación de ácido nucleico.

5 La expresión de un biomarcador puede determinarse usando un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo marcado radiactivamente, marcado con cromóforo, marcado con fluoróforo, o marcado con enzimas), un derivado de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con un sustrato o con la proteína o ligando de un par proteína-ligando (por ejemplo, biotina-estreptavidina), o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monocatenario, un dominio hipervariable de anticuerpo aislado, etc.) que se une específicamente con una proteína biomarcadora o fragmento de la misma, incluyendo una proteína biomarcadora que ha sufrido entera o una porción de modificaciones postraduccionales a las que normalmente se somete en la célula tumoral (por ejemplo, glucosilación, fosforilación, metilación, etc.).

15 La expresión de un biomarcador también puede determinarse preparando ARNm/ADNc (es decir, un polinucleótido transcrito) de células en una muestra del paciente, e hibridando el ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia que es un complemento de un ácido nucleico biomarcador, o un fragmento del mismo. El ADNc puede, opcionalmente, amplificarse usando cualquiera de varios métodos de reacción en cadena de la polimerasa antes de la hibridación con el polinucleótido de referencia. La expresión de uno o más biomarcadores puede igualmente detectarse usando PCR cuantitativa para determinar el nivel de expresión del biomarcador o biomarcadores. Como alternativa, puede usarse cualquiera de los muchos métodos conocidos para detectar mutaciones o variantes (por ejemplo, polimorfismos, deleciones etc. de nucleótidos simples) de un biomarcador para detectar la aparición de un biomarcador en un paciente.

25 Puede ponerse en contacto una mezcla de polinucleótidos transcritos obtenidos de la muestra con un sustrato que tiene fijado a este un polinucleótido complementario a u homólogo con al menos una porción (por ejemplo, al menos 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 500, o más restos de nucleótidos) de un ácido nucleico biomarcador. Si los polinucleótidos complementarios a, u homólogos con, son detectables de manera diferencial sobre el sustrato (por ejemplo, detectables usando diferentes cromóforos o fluoróforos, o fijados en diferentes posiciones seleccionadas), los niveles de expresión de una pluralidad de biomarcadores pueden determinarse simultáneamente usando un solo sustrato (por ejemplo, una micromatriz de "microplaca génica" de polinucleótidos fijados en posiciones seleccionadas). Cuando se usa un método para determinar la expresión de biomarcador que implica hibridación de un ácido nucleico con otro, la hibridación puede llevarse a cabo en condiciones de hibridación rigurosas.

35 Cuando una pluralidad de biomarcadores de la invención se usan en los métodos de la invención, el nivel de expresión de cada biomarcador en una muestra del paciente puede compararse con el nivel normal de expresión de cada uno de la pluralidad de biomarcadores en muestras no cancerosas del mismo tipo, bien en una sola mezcla de reacción (es decir, usando reactivos, tales como diferentes sondas fluorescentes, para cada biomarcador) o en mezclas de reacción individuales correspondientes a uno o más de los biomarcadores.

40 El nivel de expresión de un biomarcador en tejido normal humano (es decir, no canceroso) puede determinarse mediante varias formas. Este nivel normal de expresión puede determinarse evaluando el nivel de expresión del biomarcador en una porción de células que parece no ser cancerosa, y después comparando el nivel normal de expresión con el nivel de expresión en una porción de las células tumorales. A medida que más información se hace disponible como resultado de la puesta en práctica rutinaria de los métodos descritos en el presente documento, pueden usarse valores promedio de población para la expresión normal de los biomarcadores. Como alternativa, el nivel normal de expresión de un biomarcador puede determinarse evaluando la expresión del biomarcador en una muestra de paciente obtenida de un paciente no afectado de cáncer, de una muestra de paciente obtenida de un paciente antes de la sospecha de aparición de cáncer en el paciente, de muestras de pacientes archivadas, y similares.

50 Un método ilustrativo para detectar la presencia o ausencia de una proteína biomarcadora o ácido nucleico en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica (por ejemplo, un fluido corporal asociado al tumor) de un sujeto de ensayo y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar al polipéptido o ácido nucleico (por ejemplo, ARNm, ADN genómico, o ADNc). Los métodos de detección pueden, por lo tanto, usarse para detectar ARNm, proteínas, ADNc, o ADN genómico, por ejemplo, en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Las técnicas *in vitro* para la detección de ARNm incluyen, por ejemplo, hibridaciones de Northern e hibridaciones in situ. Las técnicas *in vitro* para la detección de una proteína biomarcadora incluyen, pero sin limitación, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), transferencias de Western, inmunoprecipitación e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de ADN genómico incluyen, por ejemplo, hibridaciones de Southern. Las técnicas *in vivo* para la detección de ARNm incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridaciones de Northern e hibridaciones in situ. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de una proteína biomarcadora incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo marcado dirigido contra la proteína o fragmento de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar marcado con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto puede detectarse mediante técnicas de obtención de imágenes estándar.

65 Un principio general de dichos ensayos diagnósticos y pronósticos implica preparar una muestra o mezcla de

reacción que puede contener un biomarcador, y una sonda, en condiciones adecuadas y durante un tiempo suficiente para permitir que el biomarcador y la sonda interactúen y se unan, de este modo formando un complejo que puede eliminarse y/o detectarse en la mezcla de reacción. Estos ensayos pueden llevarse a cabo de varias formas.

5 Por ejemplo, un método para llevar a cabo dicho ensayo implica anclar el biomarcador o sonda en un soporte de fase sólida, también citado como sustrato, y detectar los complejos biomarcador/sonda diana anclados sobre la fase sólida al final de la reacción. En una realización de dicho método, puede anclarse una muestra de un sujeto, en la que se va a ensayar la presencia y/o concentración de biomarcador, sobre un vehículo o soporte de fase sólida. En
10 otra realización, es posible la situación inversa, en la que la sonda puede anclarse a una fase sólida y puede dejarse reaccionar una muestra de un sujeto como componente no anclado del ensayo.

Hay varios métodos establecidos para anclar componentes de ensayo a una fase sólida. Estos incluyen, sin limitación, moléculas de biomarcador o sonda que se inmovilizan mediante conjugación de biotina y estreptavidina. Dichos componentes de ensayo biotinilados pueden prepararse a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) usando técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, I11.), e inmovilizarse en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). En determinadas realizaciones, las superficies con componentes de ensayo inmovilizados pueden prepararse con antelación y almacenarse. Otros vehículos adecuados o soportes de fase sólida para dichos ensayos incluyen cualquier material capaz de unirse a la clase de molécula a la que pertenece el biomarcador o sonda. Los soportes o vehículos bien conocidos incluyen, pero sin limitación, vidrio, poliestireno, nailon, polipropileno, nailon, polietileno, dextrano, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros, y magnetita. Para llevar a cabo los ensayos con las estrategias anteriormente mencionadas, se añade el componente no inmovilizado a la fase sólida tras lo cual se ancla el segundo componente. Después de que esté completa la reacción, los componentes no
15 complejados pueden retirarse (por ejemplo, mediante lavado) en condiciones tales que cualquiera de los complejos formados permanecerá inmóvil sobre la fase sólida. La detección de complejos biomarcador/sonda anclados a la fase sólida puede llevarse a cabo mediante varios métodos indicados de manera general en el presente documento. En una realización, la sonda, cuando es el componente de ensayo no anclado, puede marcarse con fines de detección y lectura del ensayo, de forma directa o indirecta, con marcadores detectables discutidos en el presente
20 documento que son bien conocidos para un experto en la materia.

También es posible detectar directamente la formación de complejo biomarcador/sonda sin manipulación adicional o marcado de cualquier componente (biomarcador o sonda), por ejemplo, utilizando la técnica de transferencia de energía de fluorescencia (es decir, FET, véase, por ejemplo, Lakowicz et al., la patente de Estados Unidos N° 5.631.169; Stavrianopoulos, et al., la patente de Estados Unidos N° 4.868.103). Se selecciona un marcador de fluoróforo en la primera molécula donante de tal forma que tras la excitación con luz incidente de la longitud de onda adecuada, su energía de fluorescencia emitida sea absorbida por un marcador fluorescente en una segunda molécula aceptora, que a su vez es capaz de emitir fluorescencia debido a la energía absorbida. Como alternativa, la molécula de proteína donante puede utilizar simplemente la energía fluorescente natural de los restos de triptófano. Se seleccionan marcadores que emiten diferentes longitudes de onda de luz, de tal forma que el marcador de la molécula aceptora pueda diferenciarse del de la donante. Ya que la eficiencia de la transferencia de energía entre marcadores está relacionada con la distancia que separa a las moléculas, pueden determinarse las relaciones espaciales entre las moléculas. En una situación en la que sucede la unión entre las moléculas, la emisión fluorescente del marcador de la molécula aceptora en un ensayo debe ser máxima. Un suceso de unión FET puede medirse de manera conveniente mediante medios de detección fluorimétrica estándar bien conocidos en la materia (por ejemplo, usando un fluorímetro).
35
40
45

En otra realización, la determinación de la capacidad de una sonda para reconocer un biomarcador puede llevarse a cabo sin marcar algún componente del ensayo (sonda o biomarcador) utilizando una tecnología tal como análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIA) (véase, por ejemplo, Sjolander, S. y Urbaniczky, C., 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345 y Szabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705). Tal como se usa en el presente documento, "BIA" o "resonancia de plasmón superficial" es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactuantes (por ejemplo, BIAcore). Los cambios en la masa en la superficie de unión (indicativos de un evento de unión) dan como resultado alteraciones en el índice refractivo de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de resonancia de plasmón superficial (SPR)), dando como resultado una señal detectable que puede usarse como indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.
50
55

Como alternativa, en otra realización, pueden llevarse a cabo ensayos diagnósticos y pronósticos análogos con biomarcador y sonda como solutos en una fase líquida. En dicho ensayo, el biomarcador complejado y la sonda se separan de componentes no complejados mediante cualquiera de varias técnicas estándar, incluyendo, pero sin limitación: centrifugación diferencial, cromatografía, electroforesis e inmunoprecipitación. En la centrifugación diferencial, los complejos biomarcador/sonda pueden separarse de los componentes de ensayo no complejados mediante una serie de etapas de centrifugación, debido a los diferentes equilibrios de sedimentación de los complejos basándose en sus diferentes tamaños y densidades (véase, por ejemplo, Rivas, G., y Minton, A. P., 1993, Trends Biochem. Sci. 18(8):284-7). También pueden utilizarse técnicas cromatográficas estándar para separar moléculas complejadas de aquellas no complejadas. Por ejemplo, la cromatografía de filtración en gel separa
60
65

moléculas basándose en el tamaño, y mediante la utilización de una resina de filtración en gel adecuada en un formato de columna; por ejemplo, el complejo relativamente mayor puede separarse de los componentes no complejados relativamente menores. De manera similar, pueden explorarse las propiedades de carga relativamente diferentes de los complejos biomarcador/sonda en comparación con los componentes no complejados para diferencial el complejo de los componentes no complejados, por ejemplo, mediante la utilización de resinas de cromatografía de intercambio iónico. Dichas resinas y técnicas cromatográficas se conocen bien por un experto en la materia (véase, por ejemplo, Heegaard, N. H., 1998, J. Mol. Recognit. Winter 11(1-6):141-8; Hage, D. S., y Tweed, S. A. J. Chromatogr B Biomed Sci Appl Oct. 10, 1997;699(1-2):499-525). También puede usarse electroforesis en gel para separar componentes de ensayo complejados de componentes no unidos (véase, por ejemplo, Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987-1999). En esta técnica, los complejos de proteína o ácido nucleico se separan basándose en el tamaño o carga, por ejemplo. Para mantener la interacción de unión durante el proceso electroforético, se usan normalmente materiales de matriz de gel no desnaturizantes en ausencia de agente reductor. Las condiciones adecuadas para el ensayo particular y componentes del mismo serán bien conocidas para un experto en la materia.

En otra realización, el nivel de ARNm biomarcador puede determinarse tanto mediante formatos *in situ* como *in vitro* en una muestra biológica usando métodos conocidos en la materia. La expresión "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células, fluidos biológicos y aislados de los mismos, aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Muchos métodos de detección de expresión usan ARN aislado. Para métodos *in vitro*, puede utilizarse cualquier técnica de aislamiento de ARN que no seleccione contra el aislamiento de ARNm para la purificación de ARN de células tumorales (véase, por ejemplo, Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York 1987-1999). Adicionalmente, pueden procesarse fácilmente grandes números de muestras de tejido usando técnicas bien conocidas para los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, el proceso de aislamiento de ARN en un solo paso de Chomczynsky (1989, patente de Estados Unidos N° 4.843.155).

El ARNm aislado puede usarse en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero sin limitación, análisis de Southern o de Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa y matrices de sondas. Un método diagnóstico para la detección de niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridar con el ARNm codificado por el gen que se está detectando. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud completa, o una porción del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente en condiciones rigurosas con un ARNm o ADN genómico que codifica un biomarcador de la presente invención. Otras sondas adecuadas para su uso en los ensayos diagnósticos de la invención se describen en el presente documento. La hibridación de un ARNm con la sonda indica que el biomarcador en cuestión se está expresando.

En un formato, el ARNm está inmovilizado sobre una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo, corriendo el ARNm aislado en un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En un formato alternativo, la sonda o sondas se inmovilizan sobre una superficie sólida y se pone en contacto el ARNm con la sonda o sondas, por ejemplo, en una matriz de microplaca génica Affymetrix. Un experto en la materia puede adaptar fácilmente métodos conocidos de detección de ARNm para su uso en la detección del nivel de ARNm codificado por los biomarcadores de la presente invención.

Un método alternativo para determinar el nivel de biomarcador de ARNm en una muestra implica el proceso de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, mediante RT-PCR (la realización experimental expuesta en Mullis, 1987, patente de Estados Unidos N° 4.683.202), reacción en cadena de la ligasa (Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189-193), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), Q-Beta replicasa (Lizardi et al., 1988, Bio/Technology 6:1197), replicación por círculo rodante (Lizardi et al., patente de los Estados Unidos N° 5.854.033) o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas para los expertos en la materia. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si dichas moléculas están presentes en números muy bajos. Tal como se usa en el presente documento, los cebadores de amplificación se definen como un par de moléculas de ácido nucleico que pueden hibridar con regiones 5' o 3' de un gen (hebras más y menos, respectivamente, o vice-versa) y contienen una región corta entre medias. En general, los cebadores de amplificación son de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos de longitud y flanquean a una región de aproximadamente 50 a 200 nucleótidos de longitud. En las condiciones adecuadas y con los reactivos adecuados, dichos cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

Para los métodos *in situ*, no se necesita aislar el ARNm de las células tumorales antes de la detección. En dichos métodos, se prepara una célula o muestra de tejido y/o se procesa usando métodos histológicos conocidos. Después la muestra se inmoviliza sobre un soporte, normalmente un cubreobjetos de vidrio, y después se pone en contacto con una sonda que puede hibridar con ARNm que codifica al biomarcador. Como alternativa a efectuar determinaciones basándose en el nivel de expresión absoluta del biomarcador, las

determinaciones pueden basarse en el nivel de expresión normalizado del biomarcador. Los niveles de expresión se normalizan corrigiendo el nivel de expresión absoluto de un biomarcador comparando su expresión con la expresión de un gen que no es un biomarcador, por ejemplo, un gen constitutivo que está expresado de manera constitutiva. Los genes adecuados para la normalización incluyen genes constitutivos tales como el gen de actina, o genes
 5 específicos de células epiteliales. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra, por ejemplo, una muestra de paciente, con otra muestra, por ejemplo, una muestra no tumoral, o entre muestras de diferentes fuentes.

Como alternativa, el nivel de expresión puede proporcionarse como un nivel de expresión relativo. Para determinar
 10 un nivel de expresión relativo de un biomarcador (por ejemplo, un biomarcador mesenquimal), se determina el nivel de expresión del biomarcador para 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, o 50 o más muestras de aislados celulares normales frente a cáncer antes de la determinación del nivel de expresión para la muestra en cuestión. Se determina el nivel de expresión medio de cada uno de los genes ensayados en el mayor número de muestras y este se usa como nivel de expresión basal del biomarcador. El nivel de expresión del biomarcador determinado para la
 15 muestra de ensayo (nivel de expresión absoluta) se divide entre el valor de expresión media obtenido para ese biomarcador. Esto proporciona un nivel de expresión relativa.

En otra realización de la presente invención, se detecta una proteína biomarcadora. Un tipo de agente para detectar
 20 proteína biomarcadora de la invención es un anticuerpo capaz de unirse a dicha proteína o fragmento de la misma tal como, por ejemplo, un anticuerpo marcado de manera detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales y monoclonales. Puede usarse un anticuerpo intacto, o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, polipéptido monocatenario de unión). El término "marcado", en referencia a la sonda o anticuerpo, pretende abarcar el marcado directo de la sonda o anticuerpo mediante acoplamiento (es decir, unión física) de una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o anticuerpo
 25 mediante reactividad con otro reactivo que está unido directamente. Los ejemplos de marcado indirecto incluyen detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y marcaje final de una sonda de ADN con biotina de tal modo que puede detectarse con estreptavidina marcada fluorescentemente.

Las proteínas de células tumorales pueden aislarse usando técnicas que son bien conocidas para los expertos en la
 30 materia. Los métodos de aislamiento de proteínas pueden, por ejemplo, ser tales como los descritos en Harlow y Lane (Harlow y Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Puede emplearse varios formatos para determinar si una muestra contiene una proteína que se une a un anticuerpo
 35 dado. Los ejemplos de dichos formatos incluyen, pero sin limitación, inmunoensayos enzimáticos (EIA), radioinmunoensayo (RIA), análisis de transferencia de Western y ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA). Un experto en la materia puede adaptar fácilmente métodos de detección de proteína/anticuerpo conocidos para su uso en la determinación de si las células tumorales expresan un biomarcador de la presente invención.

En un formato, pueden usarse anticuerpos, o fragmentos o derivados de anticuerpos, en métodos tales como
 40 transferencias de Western o técnicas de inmunofluorescencia para detectar las proteínas expresadas. En dichos casos, pueden inmovilizarse el anticuerpo o las proteínas sobre un soporte sólido. Los soportes de fase sólida o vehículos adecuados incluyen cualquier soporte capaz de unirse a un antígeno o a un anticuerpo. Los soportes o vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros, y magnetita. Un experto en la materia conocerá muchos otros
 45 vehículos adecuados para unirse a anticuerpo o antígeno, y serán capaces de adaptar dicho soporte para su uso con la presente invención. Por ejemplo, puede correrse proteína aislada de células tumorales en una electroforesis en gel de poliacrilamida e inmovilizarse sobre un soporte de fase sólida, tal como nitrocelulosa. El soporte puede entonces lavarse con tampones adecuados seguido de tratamiento con el anticuerpo marcado de manera
 50 detectable. El soporte de fase sólida puede entonces lavarse con el tampón una segunda vez para retirar el anticuerpo no unido. La cantidad de marcador unido sobre el soporte sólido puede detectarse por medios convencionales.

Para los ensayos de ELISA, los pares de unión específicos pueden ser de tipo inmune o no inmune. Los pares de
 55 unión inmunes específicos se ejemplifican por sistemas antígeno-anticuerpo o sistemas hapteno/anti-hapteno. Pueden mencionarse fluoresceína/anti-fluoresceína, dinitrofenilo/anti-dinitrofenilo, biotina/anti-biotina, péptido/anti-péptido y similares. El miembro de anticuerpo del par de unión específica puede producirse mediante métodos convencionales familiares para los expertos en la materia. Dichos métodos implican inmunizar a un animal con el miembro de antígeno del par de unión específico. Si el miembro de antígeno del par de unión específico no es
 60 inmunogénico, por ejemplo, un hapteno, puede acoplarse covalentemente a una proteína transportadora para hacerlo inmunogénico. Los pares de unión no inmunes incluyen sistemas en los que los dos componentes comparten una afinidad natural entre sí pero que no son anticuerpos. Los pares no inmunes ejemplares son biotina-estreptavidina, factor intrínseco-vitamina B 12, ácido fólico-proteína de unión a folato y similares.

Hay disponible varios métodos para marcar anticuerpos covalentemente con miembros de pares de unión específicos. Los métodos se seleccionan basándose en la naturaleza del miembro del par de unión específico, del tipo de unión deseada, y de la tolerancia del anticuerpo a varias químicas de conjugación. La biotina puede acoplarse covalentemente a anticuerpos utilizando derivados activos comercialmente disponibles. Algunos de estos son biotina-N-hidroxi-succinimida que se une a grupos amina de proteínas; hidrazida de biotina que se une a restos de carbohidrato, aldehídos y grupos carboxilo a través de un acoplamiento de carbodiimida; y maleimida de biotina y yodoacetil biotina que se une a grupos sulfhidrilo. La fluoresceína puede acoplarse a grupos amina de proteína usando isotiocianato de fluoresceína. Los grupos dinitrofenilo pueden acoplarse a grupos amina de proteína usando sulfato de 2,4-dinitrobenceno o 2,4-dinitrofluorobenceno. Otros métodos estándar de conjugación pueden emplearse para acoplar anticuerpos monoclonales a un miembro de un par de unión específico incluyendo dialdehído, acoplamiento de carbodiimida, reticulación homofuncional, y reticulación heterobifuncional. El acoplamiento de carbodiimida es un método eficaz para acoplar grupos carboxilo de una sustancia a grupos amina de otra. El acoplamiento de carbodiimida se facilita usando el reactivo comercialmente disponible 1-etil-3-(dimetil-aminopropil)-carbodiimida (EDAC).

Los reticulantes homobifuncionales, incluyendo los imidoésteres bifuncionales y los ésteres bifuncionales de N-hidroxisuccinimida, están comercialmente disponibles y se emplean para acoplar grupos amina en una sustancia a grupos amina en otra. Los reticulantes heterobifuncionales son reactivos que poseen diferentes grupos funcionales. Los reticulantes heterobifuncionales comercialmente disponibles más comunes tienen un éster de N-hidroxisuccinimida reactivo con amina como un grupo funcional, y un grupo reactivo con sulfhidrilo como el segundo grupo funcional. Los grupos reactivos con sulfhidrilo más comunes son maleimidas, disulfuros de piridilo y halógenos activos. Uno de los grupos funcionales puede ser aril nitreno fotoactivo, que tras la irradiación reacciona con varios grupos.

El anticuerpo marcado de manera detectable o miembro marcado de manera detectable del par de unión específico se prepara mediante acoplamiento a un indicador, que puede ser un isótopo radiactivo, una enzima, materiales fluorogénicos, quimioluminiscentes o electroquímicos. Dos isótopos radiactivos usados comúnmente son ^{125}I y ^3H . Los procedimientos de marcado radiactivo isotópico estándar incluyen los métodos de cloramina T, lactoperoxidasa y de Bolton-Hunter para ^{125}I y metilación reductiva para ^3H . La expresión "marcado de manera detectable" se refiere a una molécula marcada de tal forma que puede detectarse fácilmente mediante la actividad enzimática intrínseca del marcador o mediante la unión al marcador de otro componente, que puede en sí ser fácilmente detectable.

Las enzimas adecuadas para su uso en esta invención incluyen, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucosa oxidasa, luciferasas, incluyendo de luciérnaga y renilla, β -lactamasa, ureasa, proteína fluorescente verde (GFP) y lisozima. El marcaje enzimático se facilita usando dialdehído, acoplamiento de carbodiimida, reticulantes homobifuncionales y reticulantes heterobifuncionales tal como se describe anteriormente para acoplar un anticuerpo con un miembro de un par de unión específico.

El método de marcado elegido depende de los grupos funcionales disponibles en la enzima y del material a marcar, y de la tolerancia de ambos a las condiciones de conjugación. El método de marcado usado en la presente invención puede ser uno de, pero sin limitación, cualesquiera métodos convencionales empleados actualmente incluyendo aquellos descritos por Engvall y Pearlmann, *Immunochemistry* 8, 871 (1971), Avrameas y Temyck, *Immunochemistry* 8, 1175 (1975), Ishikawa et al., *J. Immunoassay* 4(3):209-327 (1983) y Jablonski, *Anal. Biochem.* 148:199 (1985).

El marcado puede efectuarse mediante métodos indirectos, tales como el uso de espaciadores u otros miembros de pares de unión específicos. Un ejemplo de esto es la detección de un anticuerpo biotinilado con estreptavidina no marcada y enzima biotinilada, añadiéndose la estreptavidina y la enzima biotinilada bien secuencial o bien simultáneamente. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, el anticuerpo usado para detectar puede estar marcado de manera detectable directamente con un indicador o indirectamente con un primer miembro de un par de unión específico. Cuando el anticuerpo está acoplado a un primer miembro de un par de unión específico, la detección se efectúa haciendo reaccionar al complejo anticuerpo-primer miembro de una unión específica con el segundo miembro del par de unión que está marcado o no marcado tal como se ha mencionado anteriormente.

Además, el anticuerpo detector no marcado puede detectarse haciendo reaccionar al anticuerpo no marcado con un anticuerpo marcado específico para el anticuerpo no marcado. En este caso, "marcado de manera detectable", tal como se usa anteriormente, se entiende que significa que contiene un epítipo mediante el cual puede unirse un anticuerpo específico para el anticuerpo no marcado. Dicho anti-anticuerpo puede marcarse directa o indirectamente usando cualquiera de las estrategias discutidas anteriormente. Por ejemplo, el anticuerpo puede acoplarse a biotina que se detecta haciendo reaccionar con el sistema estreptavidina-peroxidasa de rábano picante discutido anteriormente. Por lo tanto, en una realización, se utiliza biotina. El anticuerpo biotinilado se hace reaccionar a su vez con complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. Pueden usarse ortofenilendiamina, 4-cloro-naftol, tetrametilbencidina (TMB), ABTS, BTS o ASA para la detección cromogénica.

En un formato de inmunoensayo para poner en práctica esta invención, se usa un ensayo en sándwich directo en el que el reactivo de captura se ha inmovilizado, usando técnicas convencionales, sobre la superficie de un soporte.

Los soportes adecuados usados en los ensayos incluyen soportes poliméricos sintéticos, tales como prolipropileno, poliestireno, poliestireno sustituido, por ejemplo, poliestireno aminado o carboxilado, poliacrilamidas, poliamidas, cloruro de polivinilo, perlas de vidrio, agarosa, o nitrocelulosa.

5 IV. Anticuerpos anti-LOXL2

En el presente documento se proporcionan anticuerpos que pueden usarse para diagnosticar angiogénesis y enfermedades asociadas, fibrosis y enfermedades asociadas, tumores o metástasis. En el presente documento se proporcionan anticuerpos que inhiben la angiogénesis y enfermedades asociadas, que inhiben fibrosis y enfermedades asociadas, y tratan tumores o metástasis. En el presente documento se proporcionan anticuerpos que pueden usarse para controlar la eficacia de pautas de tratamiento y protocolos y similares tal como se describen a lo largo de la presente solicitud y son conocidos en la materia. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno útiles en dichos métodos son aquellos, por ejemplo, que se unen específicamente a LOXL2.

15 La divulgación también describe líneas celulares que producen los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos, métodos para producir las líneas celulares, y métodos para producir los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos.

20 El término "anticuerpo" o "molécula de anticuerpo" en sus varias formas gramaticales se usa en el presente documento como un nombre colectivo que se refiere a una población de moléculas de inmunoglobulina y/o porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de combinación a anticuerpo o parátipo. Por lo tanto, la referencia a un "anticuerpo" también incluye referencia a cualquiera de los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos.

25 Tal como se usa en el presente documento, "inmunorreactivo" se refiere a anticuerpos o fragmentos de los mismos que son específicos para una secuencia de restos de aminoácidos ("sitio de unión" o "epítipo"), incluso si reaccionan de manera cruzada con otros péptidos/proteínas, no son tóxicos a los niveles a los que se formulan para administración para uso humano. "Epítipo" se refiere a aquella porción de un antígeno capaz de formar una interacción de unión con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Dicha interacción de unión puede manifestarse como un contacto intermolecular con uno o más restos de aminoácidos de una CDR. La unión a antígeno puede implicar una CDR3 o un par de CDR3. Un epítipo puede ser una secuencia de péptido lineal (es decir, "continuo") o puede estar compuesto de secuencias de aminoácidos no contiguas (es decir, "conformacional" o "discontinuo"). La expresión "se une preferentemente" significa que el agente de unión se une al sitio de unión con mayor afinidad que con la que se une a secuencias de aminoácidos no relacionadas.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "afinidad" se refiere a la constante de equilibrio para la unión reversible de dos agentes y se expresa como una constante de disociación (Kd). La afinidad puede ser al menos 1 vez mayor, al menos 2 veces mayor, al menos 3 veces mayor, al menos 4 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 6 veces mayor, al menos 7 veces mayor, al menos 8 veces mayor, al menos 9 veces mayor, al menos 10 veces mayor, al menos 20 veces mayor, al menos 30 veces mayor, al menos 40 veces mayor, al menos 50 veces mayor, al menos 60 veces mayor, al menos 70 veces mayor, al menos 80 veces mayor, al menos 90 veces mayor, al menos 100 veces mayor, o al menos 1000 veces mayor, o superior, que la afinidad de un anticuerpo por secuencias de aminoácidos no relacionadas. La afinidad de un anticuerpo por una proteína diana puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nanomolar (nM) a aproximadamente 0,1 nM, de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 1 picomolar (pM), o de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 1 femtomolar (fM) o más. Tal como se usa en el presente documento, el término "avidez" se refiere a la resistencia de un complejo de dos o más agentes a la disociación después de la dilución. Las expresiones "inmunorreactivo" y "se une preferentemente" se usan de manera intercambiable en el presente documento respecto de anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno.

50 El término "anticuerpo" también incluye moléculas que se han diseñado por ingeniería genética mediante el uso de técnicas biológicas moleculares para incluir solo porciones de la molécula nativa en la medida que esas moléculas tengan la capacidad de unirse a un antígeno particular o secuencia de aminoácidos con la especificada requerida. Dichas moléculas de anticuerpo alternativas incluyen porciones clásicas conocidas de las moléculas de anticuerpo, anticuerpos monocatenarios, y moléculas de unión monocatenarias.

Un "sitio de combinación de anticuerpo" es aquella porción estructural de una molécula de anticuerpo compuesta de regiones variables e hipervariables de cadena pesada y ligera que se unen específicamente al antígeno.

60 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "CDR" o "región determinante de la complementariedad" pretende significar los sitios de combinación de antígenos no contiguos encontrados dentro de la región variable de los polipéptidos tanto de cadena pesada como de cadena ligera. Estas regiones particulares se han descrito por Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991); por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); y MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), donde las definiciones incluyen solapamiento o subconjuntos de restos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquier definición para referirse

a una CDR de un anticuerpo o anticuerpos injertados o variantes de los mismos pretende encontrarse dentro del alcance del término tal como se usa en el presente documento. Los restos de aminoácidos que abarcan las CDR tal como se definen en cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen en la Tabla 1 a modo de comparación.

5

Tabla 1: Definiciones de CDR

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	93-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

¹ La numeración de restos sigue la nomenclatura de Kabat et al., *anteriormente citado*

² La numeración de restos sigue la nomenclatura de Chothia et al., *anteriormente citado*

³ La numeración de restos sigue la nomenclatura de MacCallum et al., *anteriormente citado*

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "marco conservada" cuando se usa en referencia a una región variable de anticuerpo pretende significar todos los restos de aminoácidos fuera de las regiones CDR dentro de la región variable de un anticuerpo. Una región variable marco conservada es generalmente una secuencia de aminoácidos discontinua de entre aproximadamente 100-120 aminoácidos de longitud pero se pretende que se refiera solamente a aquellos aminoácidos fuera de las CDR. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "región marco conservada" pretende significar cada dominio de la región marco conservada que está separada por las CDR.

15 Un "inhibidor de la actividad de LOXL2" puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que inhibe directa o indirectamente la actividad de lisil oxidasa, incluyendo, pero sin limitación, a la expresión génica, modificación postraduccional, procesamiento o escisión enzimática, unión a un modulador de LOXL2, actividad enzimática de LOXL2 o cualquier otra actividad descrita en el presente documento.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a un agente de unión aislado o recombinante que comprende las secuencias de región variable necesarias para unirse específicamente a un epítipo antigénico. Por lo tanto, un anticuerpo es cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que muestra la actividad biológica deseada, por ejemplo, unión al antígeno diana específico. Por lo tanto, se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, 25 diacuerpos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo incluyendo, pero sin limitación, polipéptidos monocatenarios de unión, V_H, V_L, Fv, scFv, Fab, y Fab2, etc., en tanto que muestren la actividad biológica deseada. La expresión "anticuerpo humano" por lo tanto se refiere a anticuerpos que contienen secuencias de origen humano, excepto para posibles regiones CDR no humanas, y no implica que la estructura completa de una molécula de Ig esté presente, solo que el anticuerpo tiene una inmunogenicidad mínima en un ser humano.

35 El término "unión" se refiere a una asociación directa entre dos moléculas, debido a, por ejemplo, interacciones covalentes, electrostáticas, hidrófobas e iónicas y/o de enlace de hidrógeno, incluyendo interacciones tales como puentes de sal y puentes de agua. La expresión "unión específica" es aplicable a una situación en la que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no muestra una unión significativa a moléculas distintas de su epítipo. En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a una LOX humana o a una LOXL2 humana con una constante de disociación K_d igual a o menor de aproximadamente 100 nM, menor de aproximadamente 10 nM, menor de aproximadamente 1 nM, menor de aproximadamente 0,5 nM, 40 menor de aproximadamente 0,1 nM, menor de aproximadamente 0,01 nM, o menor de aproximadamente 0,005 nM medida a una temperatura de aproximadamente 4 °C, 25 °C, 37 °C o 42 °C.

45 Pueden usarse métodos convencionales para preparar anticuerpos. Por ejemplo, usando un péptido o proteína de longitud completa de lisil oxidasa, pueden producirse antiseros policlonales o anticuerpos monoclonales usando métodos estándar. Puede inmunizarse a un mamífero (por ejemplo, un ratón, un hámster o un conejo) con una forma inmunogénica del péptido que provoca una respuesta de anticuerpos en el mamífero. Las técnicas para conferir inmunogenicidad potenciada a un péptido incluyen conjugación a vehículos u otras técnicas bien conocidas en la materia. Por ejemplo, la proteína o péptido puede administrarse en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización puede controlarse mediante la detección de titulaciones de anticuerpo en plasma o suero. Pueden

usarse procedimientos ELISA estándar u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno para determinar los niveles de anticuerpos. Después de la inmunización, pueden obtenerse antisueros y, si se desea, aislarse anticuerpos policlonales de los sueros.

5 Los anticuerpos pueden generarse en cultivo celular, en fagos, o en varios animales, incluyendo, pero sin limitación a vacas, conejos, cabras, ratones, ratas, hámsteres, cobayas, ovejas, perros, gatos, monos, chimpancés, simios. Por lo tanto, un anticuerpo útil en los presentes métodos es normalmente un anticuerpo de mamífero. Pueden usarse técnicas de fagos para aislar un anticuerpo inicial o para generar variantes con características de especificidad o avidez alteradas. Dichas técnicas son rutinarias y bien conocidas en la materia. En una realización, el anticuerpo se produce por medios recombinantes conocidos en la materia. Por ejemplo, puede producirse un anticuerpo recombinante transfectando una célula hospedadora con un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica al anticuerpo. Pueden usarse uno o más vectores para transfectar la secuencia de ADN que expresa al menos una región VL y una región VH en la célula hospedadora. Las descripciones ilustrativas de medios recombinantes de generación y producción de anticuerpos incluyen Delves, *Antibody Production: Essential Techniques* (Wiley, 1997); Shephard, et al., *Monoclonal Antibodies* (Oxford University Press, 2000); y Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (Academic Press, 1993).

También pueden producirse anticuerpos de acuerdo con el protocolo descrito en Kenney, et al. ("Production of monoclonal antibodies using a secretion capture report web." *Biotechnology* 13:787-790, 1995). En resumen, se inyecta a ratones por vía subcutánea (s.c.), con un antígeno en una formulación adyuvante. Para antígenos peptídicos, los péptidos se conjugan a albúmina de suero bovino y se formulan en adyuvante de Freund (FA) antes de la inmunización. Para antígenos proteicos, la proteína se formula en adyuvante de alhidrogel-muramil dipéptido (ALD/MDP). Se aíslan células del bazo y nódulos linfáticos de los ratones y se fusionan con células adecuadas y se cultivan. Se aísla una biblioteca de hibridoma de células seleccionadas por HAT y se clona. Las células se clasifican y el suero y los sobrenadantes se exploran para presencia de anticuerpos.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, y puede incluir la región de unión a antígeno o variable de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, fragmentos Fv, fragmentos scFv, diacuerpos, anticuerpos lineales (Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 (1995)), moléculas de anticuerpo monocatenarias, polipéptidos de unión monocatenarios, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La digestión en papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con antígeno y es todavía capaz de reticular antígeno.

Un "polipéptido monocatenario de unión a antígeno" se refiere a un polipéptido que tiene una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera y, opcionalmente, una región Fc de inmunoglobulina. Dicha molécula es un fragmento variable monocatenario que tiene opcionalmente función efectora mediante la presencia de la región Fc de inmunoglobulina. Los métodos para preparar polipéptidos monocatenarios de unión se conocen en la materia (por ejemplo, Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2005/0238646).

"Fv" se refiere a un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena ligera y de cadena pesada en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. De manera colectiva, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

Un fragmento "Fab" contiene un "Fv" y también contiene 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' en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el resto (o los restos de cisteína) de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada (Fc) que corresponden a las diferentes clases de

inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Se conocen bien las estructuras de las subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas.

5 Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamadas kappa o (" κ ") y lambda o (" λ "), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

10 Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenarios" o "sFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Un polipéptido Fv puede incluir además, si fuese necesario, un enlazante polipeptídico entre los dominios VH y VL, que permite al sFv formar una estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

15 El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazante que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a que se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y en Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

25 Un anticuerpo también puede ser un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, quiméricos, humanos o humanizados que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es, por ejemplo, LOX o LOXL2, la otra es por cualquier otro antígeno, tales como, por ejemplo, una proteína de superficie celular o receptor o subunidad de receptor. En realizaciones adicionales, un anticuerpo biespecífico es específico para LOX y LOXL2.

30 Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos está basada en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la distribución al azar de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) reproducen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se consigue normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Trauneker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

40 Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina usando métodos convencionales conocidos en la técnica. La fusión es, en general, con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que contiene al menos parte de las regiones bisagra, CH2, y CH3. En una realización, la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de cadena ligera está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, pueden insertarse en vectores de expresión separados, y pueden transfectarse de manera conjunta en un organismo hospedador adecuado. Para detalles adicionales acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

50 De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse mediante ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz puede comprender al menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo "cavidades" compensatorias de tamaño similar o idéntico al de la cadena (o cadenas) lateral reemplazando cadenas laterales grandes de aminoácido por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

60 Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de F(ab')₂). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan et al., *Science* 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejos de ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte al Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo

biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Pueden recuperarse directamente fragmentos Fab' de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífica F(ab')₂ totalmente humanizada. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor de ErbB2 y a linfocitos T humanos normales, así como de provocar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito varias técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente a partir de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" se describe por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) por medio de un enlazante que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, se fuerza a que los dominios VH y VL de un fragmento se emparejen con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha comunicado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros monocatenarios de Fv (sFv). Véase, Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítomos distintos en un polipéptido de LOXL2 proporcionado en el presente documento. Como alternativa, un brazo de polipéptido anti-LOXL2 puede combinarse con un brazo que se une a una molécula activadora en un leucocito, tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28, o B7), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD 16) para enfocar los mecanismos de defensa celular a la célula que expresa un polipéptido diana particular. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos a células que expresan un polipéptido diana particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a diana y un brazo que se une a un agente citotóxico o a un quelante de radionúclidos, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA, o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al polipéptido diana y además se une a factor tisular (TF).

El anticuerpo anti-LOXL2 también puede ser un anticuerpo heteroconjugado. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Se han propuesto dichos anticuerpos para, por ejemplo, dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360 y WO 92/200373). Pueden prepararse anticuerpos *in vitro* usando métodos conocidos de química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen, pero sin limitación, iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y aquellos divulgados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

Puede ser deseable modificar un anticuerpo anti-LOXL2 respecto a su función efectora, para potenciar, por ejemplo, la efectividad del anticuerpo para tratar o prevenir la metástasis del cáncer. Por ejemplo, pueden introducirse restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una eliminación de células mediada por complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentada. Véase Caron et al., J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad anti-tumoral potenciada también pueden prepararse usando reticulantes heterobifuncionales tal como se describen en Wolff et al. Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, puede modificarse por ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y puede de este modo potenciarse la lisis de complemento y las capacidades de ADCC. Véase Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989).

Un "anticuerpo aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que pueden interferir con usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir, por ejemplo, enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En una realización, se purificará un anticuerpo (1) a más del 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 %.

95 %, o 99 % en peso de anticuerpo determinado mediante el método de Lowry, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácido N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, y/o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o tinción de plata. La expresión "anticuerpo aislado" incluye dentro de su alcance un anticuerpo *in situ* en células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. En general, el aislamiento de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo incluirá al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) incluyen, por ejemplo, inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, polipéptidos de unión monocatenarios, VH, VL, u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos quiméricos incluyen aquellos en los que las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera están combinadas con regiones constantes (Fc) humanas. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como de ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos correspondientes no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden contener restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o marco conservadas importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todas de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todas las regiones CDR se corresponden con aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana.

Un anticuerpo humanizado también puede contener al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente aquellas de una inmunoglobulina humana (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)).

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos se conocen bien en la materia. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en este a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se citan a menudo como restos "importados" o "donantes", que se toman normalmente de un dominio variable "importado" o "donante". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321:522 525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323 327 (1988)); Verhoeven et al. *Science*, 239:1534 1536 (1988)), mediante la sustitución de CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, 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 se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando varias técnicas conocidas en la materia, incluyendo bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)). De manera similar, pueden producirse anticuerpos humanos introduciendo locus de inmunoglobulina humanos en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes endógenos de inmunoglobulina se han inactivado parcial o completamente. Tras la exposición, se observa producción de anticuerpo humano, que se asemeja estrechamente a la vista en seres humanos a todos los respectos, incluyendo el reordenamiento de genes, ensamblaje, y repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 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 et al., *Bio/Technology* 10,779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812 13 (1994); Fishwald et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Se han desarrollado anticuerpos monoclonales murinos que se unen a LOX y LOXL2 y que bloquean la actividad enzimática de las mismas. Los anticuerpos humanizados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento se crean mediante humanización de las secuencias VL y VH de los anticuerpos monoclonales anti-LOX y anti-LOXL2 murinos.

Las inmunoglobulinas humanizadas, incluyendo anticuerpos humanizados, se han construido mediante diseño por ingeniería genética. La mayor parte de las inmunoglobulinas humanizadas que se han descrito anteriormente han comprendido una región marco conservada que es idéntica a la región marco conservada de una cadena de inmunoglobulina humana particular (es decir, un aceptor o receptor), y tres CDR de una cadena de inmunoglobulina

no humana (donante). Tal como se describe en el presente documento, la humanización también puede incluir criterios mediante los cuales se identifican un número limitado de aminoácidos en la región marco conservada de una inmunoglobulina humanizado y se seleccionan para ser iguales a los aminoácidos en esas posiciones en el donante en vez de en el aceptor, para aumentar la afinidad de un anticuerpo que comprende la cadena de

5 inmunoglobulina humanizada.

La presente invención está basada en parte en el modelo de que dos causas que contribuyen a la pérdida de afinidad en medios anteriores para producir anticuerpos humanizados (usando como ejemplos anticuerpos de ratón como la fuente de CDR) son: (1) cuando las CDR de ratón se combinan con una región marco conservada humana, los aminoácidos en las regiones marco conservadas próximos a las CDR se convierten en humanos en vez de ratón. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, estos aminoácidos cambiados pueden distorsionar ligeramente las CDR (por ejemplo, pueden crear diferentes fuerzas electrostáticas o hidrófobas que en anticuerpo de ratón donante, y las CDR distorsionadas pueden efectuar contactos no tan efectivos con el antígeno como hacían las CDR en el anticuerpo donante); (2) también, los aminoácidos en el anticuerpo original de ratón que están próximos a, pero no son parte de, las CDR (es decir, aún parte de la región marco conservada), pueden efectuar contactos con el antígeno que contribuye a la afinidad. Estos aminoácidos se pierden cuando el anticuerpo está humanizado ya que, en general, todos los aminoácidos de la región marco conservada se hacen humanos. Para superar estos problemas, y para producir anticuerpos humanizados que tengan una afinidad muy fuerte por un antígeno deseado, los anticuerpos humanizados y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden construirse usando uno o más de los principios siguientes.

Un principio es que como aceptor, se usa una región marco conservada de una inmunoglobulina humana particular que es inusualmente homóloga a la inmunoglobulina donante a humanizar, o se usa una región marco conservada consenso de muchos anticuerpos humanos como aceptor. Por ejemplo, la comparación de la secuencia de una región variable de cadena pesada (o ligera) de ratón contra una región variable de cadena pesada (o ligera) humana en una base de datos (por ejemplo, la National Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource o la base de datos de secuencias de proteínas del National Center for Biotechnology Information - NCBI) muestra que el alcance de la homología para diferentes regiones humanas puede variar ampliamente, por ejemplo, de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, o más. Mediante la elección como inmunoglobulina aceptora una de las regiones variables de cadena pesada humana que es más homóloga con la región variable de cadena pesada de la inmunoglobulina donante, se cambiarán menos aminoácidos en el paso de la inmunoglobulina donante a la inmunoglobulina humanizada. Mediante la elección como inmunoglobulina aceptora una de las regiones variables de cadena ligera humana que es más homóloga con la región variable de cadena ligera de la inmunoglobulina donante, se cambiarán menos aminoácidos en el paso de la inmunoglobulina donante a la inmunoglobulina humanizada. En general, usando dichas técnicas, hay una probabilidad reducida de cambiar un aminoácido próximo a una o más de las CDR que distorsione su conformación. Además, la forma general precisa de un anticuerpo humanizado que comprenda la cadena de inmunoglobulina humanizada puede asemejarse más estrechamente a la forma del anticuerpo donante, también reduciendo de este modo la probabilidad de distorsionar las CDR.

También pueden usarse cadenas ligeras y pesadas del mismo anticuerpo humano como secuencias aceptoras, para mejorar la probabilidad de que las cadenas ligeras y pesadas humanizadas efectúen contactos favorables entre sí. Como alternativa, también pueden usarse cadenas ligeras y pesadas de diferentes secuencias de anticuerpos de línea germinal humanas como secuencias aceptoras; cuando se usan dichas combinaciones, se puede determinar fácilmente si la VH y VL se unen a un epítipo de interés usando ensayos convencionales (por ejemplo, un ELISA). En un ejemplo, se seleccionará el anticuerpo humano en el que las secuencias de las regiones variables de cadena ligera y pesada, en su conjunto, sean en general lo más homólogas con las secuencias de región variable de cadena ligera y pesada donante. En ocasiones se dará más peso a la secuencia de la cadena pesada. Independientemente de cómo se elija la inmunoglobulina aceptora, puede lograrse en algunos casos una mayor afinidad seleccionando un pequeño número de aminoácidos en la región marco conservada de la cadena de la inmunoglobulina humanizada para que sean iguales que los aminoácidos en esas posiciones en el donante en vez de en el aceptor. Se conocen en la materia métodos de maduración por afinidad.

Los anticuerpos humanizados tienen generalmente al menos tres ventajas potenciales frente a anticuerpos de ratón o quiméricos para su uso en terapia humana. Debido a que la porción efectora de un anticuerpo es humana, se cree que interactúan mejor con las otras partes del sistema inmune humano (por ejemplo, eliminan a las células diana de una manera más eficaz mediante citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)). Adicionalmente, el sistema inmune humano no debe reconocer a la región marco conservada o constante del anticuerpo humanizado con exógena, y por lo tanto la respuesta de anticuerpos contra dicho anticuerpo inyectado debe ser menor que contra un anticuerpo de ratón totalmente exógeno o un anticuerpo quimérico parcialmente exógeno. Finalmente, se sabe que los anticuerpos de ratón tienen una semivida en la circulación humana que es mucho más corta que la semivida de anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanizados pueden, probablemente, tener una semivida más similar a la de los anticuerpos humanos de origen natural, permitiendo la administración de dosis menores y menos frecuentes.

65

La humanización de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, puede llevarse a cabo mediante varios métodos conocidos en la materia y descritos en el presente documento. De manera similar, la producción de anticuerpos humanizados también puede lograrse mediante métodos conocidos en la materia y descritos en el presente documento.

5 Los métodos para modificaciones de regiones marco conservadas se conocen en la técnica y se contemplan en el presente documento. La selección de una o más posiciones de aminoácidos marco conservados a alterar depende de varios criterios. Un criterio para seleccionar aminoácidos marco conservados relevantes a cambiar puede ser las diferencias relativas en los restos de aminoácidos marco conservados entre las moléculas donante y aceptora. La selección de las posiciones marco conservadas a alterar usando esta estrategia tiene la ventaja de evitar cualquier desviación subjetiva en la determinación de restos o cualquier desviación en la contribución del resto a la afinidad de unión de las CDR.

15 Otro criterio que puede usarse para determinar las posiciones de aminoácidos relevantes a cambiar puede ser, por ejemplo, la selección de restos marco conservados que se sabe que son importantes o contribuyen a la conformación de las CDR. Por ejemplo, los restos marco conservados canónicos son importantes para la conformación y/o estructura de las CDR. El direccionamiento de un resto marco conservado canónico como una posición relevante a cambiar puede usarse para identificar un resto de aminoácido más compatible en contexto con su secuencia de CDR donante asociada.

20 La frecuencia de un resto de aminoácido en una posición marco conservada particular es otro criterio que puede usarse para seleccionar posiciones de aminoácidos marco conservadas relevantes a cambiar. Por ejemplo, la comparación de la región marco conservada seleccionada con otras secuencias marco conservadas dentro de su subfamilia puede revelar restos que suceden a menores frecuencias en una posición o posiciones particulares. Las posiciones que portan restos menos abundantes son aplicables de manera similar para su selección como una posición a alterar en la región marco conservada de la región variable aceptora.

25 Las posiciones relevantes de aminoácidos a cambiar también se pueden seleccionar, por ejemplo, basándose en la proximidad a una CDR. En determinados contextos, los restos FR pueden participar en la conformación de las CDR y/o en la unión al antígeno. Además, este criterio puede usarse de manera similar para priorizar las posiciones relevantes seleccionadas mediante otro criterio descrito en el presente documento. Por lo tanto, la diferenciación entre restos proximales y distales a una o más CDR representa una forma de reducir el número de posiciones relevantes a cambiar.

35 Otro criterio para seleccionar posiciones marco conservadas de aminoácidos relevantes a cambiar incluye, por ejemplo, restos que se sabe o se predice que residen en un espacio tridimensional cerca de la interfaz antígeno-CDR o que se predice que modulan la actividad de la CDR. De manera similar, los restos marco conservados en los que se sabe, o se predice, que forman contactos entre la interfaz de la región variable de cadena pesada (V_H) y ligera (V_L) pueden seleccionarse. Dichas posiciones marco conservadas pueden afectar a la conformación y/o afinidad de una CDR modulando el bolsillo de unión de la CDR, la interacción con el antígeno (epítipo) o la interacción de la V_H y la V_L . Por lo tanto, la selección de estas posiciones de aminoácidos para construir una población diversa para explorar la actividad de unión puede usarse para identificar cambios de la región marco conservada que reemplazan a restos que tienen efectos perniciosos en la conformación de las CDR o compensan efectos perniciosos de restos que aparecen en cualquier otra parte de la región marco conservada.

45 Otros restos marco conservados que pueden seleccionarse para la alteración incluyen las posiciones de aminoácidos que son accesibles a disolvente. Dichos restos están generalmente enterrados en la región variable y, por lo tanto, son capaces de influenciar la conformación de la CDR o las interacciones de V_H y V_L . La accesibilidad de disolvente puede predecirse, por ejemplo, a partir de la hidrofobidad relativa del ambiente creado por las cadenas laterales de los aminoácidos del polipéptido y/o mediante datos estructurales tridimensionales conocidos.

50 Después de la selección de posiciones de aminoácidos relevantes en las CDR donantes, así como cualquier posición de aminoácidos relevante en las regiones marco conservadas que se desean variar, pueden incorporarse cambios de aminoácidos en algunas o en todas las posiciones seleccionadas en los ácidos nucleicos codificantes para la región marco conservada variable aceptora y las CDR donantes. Las secuencias marco conservadas o de CDR alteradas pueden producirse y ensayarse individualmente, o pueden combinarse secuencial o simultáneamente y ensayarse.

60 La variabilidad en cualquiera o todas de las posiciones alteradas puede variar desde unos pocos a una pluralidad de diferentes restos de aminoácidos, incluyendo todos los veinte aminoácidos de origen natural o equivalentes funcionales y análogos de los mismos. En algunos casos, también pueden considerarse y se conocen en la técnica aminoácidos de origen no natural.

65 La selección del número y localización de las posiciones de aminoácidos a variar es flexible y puede depender del uso previsto y de la eficacia deseada para la identificación de la región variable alterada que tiene una actividad deseable, tal como sustancialmente la misma o mayor afinidad de unión en comparación con la región variable

donante. En este sentido, a mayor número de cambios que se incorporen en una población de región variable alterada, es más eficiente identificar al menos una especie que muestre una actividad deseada, por ejemplo, sustancialmente la misma o mayor afinidad de unión que el donante. Como alternativa, cuando el usuario tiene datos empíricos o reales del grado al que determinados restos o posiciones de aminoácidos contribuyen de manera desproporcionada a la afinidad de unión, puede ser deseable producir una población limitada de regiones variables alteradas que se centre en cambios dentro o alrededor de aquellos restos o posiciones identificadas.

Por ejemplo, si se desean regiones variables injertadas con CDR, una gran población diversa de regiones variables alteradas puede incluir todas las posiciones de la región marco conservada no idénticas entre la región marco conservada y aceptora y todos los cambios de posiciones de aminoácidos individuales de las CDR. Como alternativa, una población de diversidad intermedia puede incluir subconjuntos, por ejemplo, de solo las posiciones marco conservadas no idénticas junto con todos los cambios de posiciones de aminoácidos individuales de las CDR para, por ejemplo, aumentar la afinidad de los anticuerpos humanizados o fragmentos de unión a antígeno. La diversidad de las poblaciones anteriores puede aumentarse adicionalmente, por ejemplo, incluyendo adicionalmente todos los cambios de posiciones de aminoácidos de las CDR por pares. Por el contrario, pueden construirse de manera similar poblaciones que se centran en restos predeterminados o posiciones que incorporan restos variantes en tan pocos como una región marco conservada y/o una posición de aminoácido de CDR para la exploración e identificación de una región variable de anticuerpo alterada. Al igual que con las poblaciones anteriores, la diversidad de dichas poblaciones enfocadas puede aumentarse adicionalmente expandiendo adicionalmente las posiciones seleccionadas para su cambio para que incluyan otras posiciones relevantes en una o ambas regiones marco conservadas y de CDR. Hay otras numerosas combinaciones que varían desde pocos cambios hasta muchos cambios en una o ambas regiones marco conservadas y CDR que pueden emplearse adicionalmente, todas las cuales darán como resultado una población de regiones variables alteradas que pueden explorarse para la identificación de al menos una región variable alterada injertada con CDR que tiene la actividad deseada, por ejemplo, actividad de unión a LOX/LOXL2. Los expertos en la materia sabrán, o podrán determinar, qué posiciones de restos seleccionadas en la región marco conservada o en las CDR donantes, o subconjuntos de las mismas, pueden variarse para producir una población para la exploración e identificación de un anticuerpo alterado de la invención dadas las enseñanzas y orientación proporcionadas en el presente documento. Se conocen en la materia codones que codifican aminoácidos.

Los anticuerpos humanizados y fragmentos de unión a antígeno pueden producirse usando técnicas convencionales conocidas en la materia. Además, pueden producirse a menudo anticuerpos preparados de manera recombinante en grandes cantidades, particularmente cuando se utilizan vectores de expresión de alto nivel.

Pueden secuenciarse anticuerpos usando técnicas convencionales conocidas en la técnica y determinarse las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). En un aspecto, se insertan las secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR en una secuencia sintética de, por ejemplo, región marco conservada de un anticuerpo humano (o fragmento de unión a antígeno del mismo) para crear un anticuerpo humano que pueda limitar los efectos secundarios adversos de tratar a un paciente humano con un anticuerpo no humano. También pueden insertarse las secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR en una secuencia sintética de, por ejemplo, una proteína de unión tal como una Avimer™ para crear una construcción para su administración a un paciente humano. Dichas técnicas pueden modificarse dependiendo de la especie de animal a tratar. Por ejemplo, para usos veterinarios, un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o proteína de unión puede sintetizarse para su administración a un primate, una vaca, un caballo, etc.

En otro aspecto, usando técnicas reconocidas en la materia tales como las proporcionadas e incorporadas en el presente documento, pueden insertarse nucleótidos que codifican secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes en sitios de restricción de endonucleasas de un polinucleótido existente que codifica un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o proteína de unión.

Para la producción de alto nivel, el sistema de expresión en mamífero más ampliamente usado es uno que utiliza el procedimiento de amplificación génica ofrecido por las células de ovario de hámster chino deficientes en dihidrofolato reductasa ("dhfr⁻"). El sistema se conoce bien por los expertos en la materia. El sistema está basado en el gen de dihidrofolato reductasa "dhfr", que codifica la enzima DHFR, que cataliza la conversión de dihidrofolato a tetrahidrofolato. Para lograr una elevada producción, las células dhfr⁻ CHO se transfectan con un vector de expresión que contiene un gen dhfr funcional, junto con un gen que codifica una proteína deseada. En este caso, la proteína deseada es la cadena ligera y/o pesada de anticuerpo recombinante.

Aumentando la cantidad del inhibidor competitivo de DHFR, metotrexato (MTX), las células recombinantes desarrollan resistencia amplificando el gen de dhfr. En casos estándar, la unidad de amplificación empleada es mucho mayor que el tamaño del gen de dhfr, y como resultado la cadena pesada del anticuerpo se amplifica de manera conjunta.

Cuando se desea la producción a gran escala de la proteína, tal como la cadena de anticuerpo, se tienen en cuenta tanto el nivel de expresión y la estabilidad de las células que se estén empleando. En cultivo a largo plazo, las poblaciones de CHO recombinantes pierden la homogeneidad con respecto a su productividad específica de

anticuerpo durante la amplificación, aunque se deriven de un solo clon parental.

5 La presente solicitud proporciona un polinucleótido aislado (ácido nucleico) que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tal como se describe en el presente documento, vectores que contienen dichos polinucleótidos, y células hospedadoras y sistemas de expresión para transcribir y traducir dichos polinucleótidos en polipéptidos.

La presente solicitud también proporciona construcciones en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un polinucleótido como los anteriores.

10 La presente solicitud también proporciona una célula hospedadora recombinante que comprende una o más construcciones como las anteriores. Un ácido nucleico que codifica cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento tal como se proporciona en sí mismo forma un aspecto de la presente solicitud, al igual que un método para la producción del anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo descritos en el presente documento, comprendiendo dicho método la expresión a partir del ácido nucleico codificante de este. La expresión puede lograrse de manera conveniente cultivando en las condiciones adecuadas
15 células hospedadoras que contienen al ácido nucleico. Después de la producción mediante expresión, puede aislarse un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o purificarse usando cualquier técnica adecuada, y después usarse según sea adecuado.

20 Los anticuerpos específicos, fragmentos de unión a antígeno, y moléculas de ácido nucleico codificantes y vectores descritos en el presente documento pueden proporcionarse aislados y/o purificados, por ejemplo, a partir de su ambiente natural, en forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso de ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o genes de origen distinto al de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. El ácido nucleico puede comprender ADN o ARN y puede ser completa o parcialmente
25 sintético.

Se conocen bien sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en varias células hospedadoras. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, levaduras y sistemas baculovirales. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen
30 células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de cría de hámster, células NSO de melanoma de ratón y muchas otras. Un hospedador bacteriano común es *E. coli*.

La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en células procariotas tales como *E. coli* está bien establecida en la materia. Para una revisión, véase, por ejemplo, Plückthun, A. Bio/Technology 9: 545-551 (1991). La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la materia para la producción
35 de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento, para revisiones recientes véanse, por ejemplo, Raff, M.E. (1993) Curr. Opinion Biotech. 4: 573-576; Trill J.J. et al. (1995) Curr. Opinion Biotech 6: 553-560.

40 Los vectores adecuados pueden seleccionarse o construirse, conteniendo secuencias reguladoras adecuadas, incluyendo secuencias de promotor, secuencias de terminador, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea necesario. Los vectores pueden ser plásmidos, virales, por ejemplo, fagos, o fagémidos, según sea adecuado. Para más detalles véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas
45 técnicas conocidas y protocolos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en Short Protocols in Molecular Biology, segunda edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.

50 Por lo tanto, un aspecto adicional proporciona una célula hospedadora que contiene ácido nucleico tal como se divulga en el presente documento. Otro aspecto adicional proporciona un método que comprende introducir dicho ácido nucleico en una célula hospedadora. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas puede incluir, por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, DEAE Dextrano, electroporación, biolística, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus, por
55 ejemplo, *vaccinia* o, para células de insecto, baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas puede incluir, por ejemplo, la transformación por cloruro de calcio, electroporación y transfección usando bacteriófagos.

La introducción puede estar seguida por causar o permitir la expresión a partir del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando células hospedadoras en condiciones para la expresión del gen.

60 En una realización, el ácido nucleico se integra en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula hospedadora. La integración puede estar promovida por la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar.

65 La presente solicitud también proporciona un método que comprende usar una construcción tal como se indica anteriormente en un sistema de expresión para expresar los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos como

los anteriores.

La presente solicitud también se refiere a ácidos nucleicos aislados, tales como moléculas de ADN recombinante o genes clonados, o variantes degeneradas de los mismos, mutantes, análogos, o fragmentos de los mismos, que codifican un anticuerpo o secuencia de unión a antígeno que se une a LOX o a LOXL2 descrito en el presente documento.

En un aspecto, la presente solicitud proporciona un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a LOX o LOXL2 tal como se describe en el presente documento.

En una realización adicional, la secuencia de ADN completa de la molécula de ADN recombinante o gen clonado de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento puede unirse operativamente a una secuencia de control de la expresión que puede introducirse en un hospedador adecuado. La solicitud por consiguiente se extiende a hospedadores unicelulares transformados con el gen clonado o molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica las V_H y/o V_L , o porciones de los mismos, del anticuerpo.

Otra característica es la expresión de las secuencias de ADN divulgadas en el presente documento. Como se conoce en la técnica, las secuencias de ADN pueden expresarse uniéndolas operativamente a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión adecuado y empleando ese vector de expresión para transformar un hospedador unicelular adecuado.

Dicha unión operativa de una secuencia de ADN a una secuencia de control de la expresión, por supuesto, incluye, si no una parte de la secuencia de ADN, la provisión de un codón de iniciación, ATG, en el marco de lectura correcto cadena arriba de la secuencia de ADN.

Pueden proporcionarse polinucleótidos y vectores en una forma aislada y/o purificada (por ejemplo, libre o sustancialmente libre de polinucleótidos de origen distinto del polinucleótido que codifica un polipéptido con la función requerida). Tal como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" y "sustancialmente libre" se refiere a una solución o suspensión que contiene menos de, por ejemplo, el 20 % o menos de material exógeno, el 10 % o menos de material exógeno, el 5 % o menos de material exógeno, el 4 % o menos de material exógeno, el 3 % o menos de material exógeno, el 2 % o menos de material exógeno, o el 1 % o menos de material exógeno.

Pueden emplearse una amplia variedad de combinaciones de hospedador/vector de expresión en la expresión de las secuencias de ADN de esta invención. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintéticas. Los vectores adecuados incluyen derivados de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, por ejemplo, los plásmidos de *E. coli* col E1, Pcr1, Pbr322, Pmb9 y sus derivados, plásmidos tales como RP4; ADN de fagos, por ejemplo, los numerosos derivados de fago λ , por ejemplo, NM989, y otros ADN de fago, por ejemplo, M13 y ADN de fago monocatenario filamentosos; plásmidos de levadura, tales como el plásmido 2u o derivados del mismo; vectores útiles en células eucariotas, tales como vectores útiles en células de insecto o de mamífero; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, tales como plásmidos que se han modificado para emplear ADN de fago u otras secuencias de control de la expresión; y similares.

También se proporciona en el presente documento una célula hospedadora recombinante que comprende una o más construcciones de polinucleótido. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tal como se proporciona en el presente documento forma un aspecto de la presente solicitud, al igual que lo es un método de producción del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, comprendiendo dicho método la expresión a partir del polinucleótido. La expresión puede lograrse, por ejemplo, cultivando en las condiciones adecuadas células hospedadoras recombinantes que contienen al polinucleótido. Entonces puede aislarse un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o purificarse usando cualquier técnica adecuada, y usarse según sea necesario.

Cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión - secuencias que controlan la expresión de una secuencia de ADN unida operativamente a ésta - puede usarse en estos vectores para expresar secuencias de ADN. Dichas secuencias de control de la expresión incluyen, por ejemplo, los promotores temprano o tardío de SV40, CMV, vaccinia, polioma o adenovirus, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC, el sistema TRC, el sistema LTR, las principales regiones operadoras y promotoras de fago λ , las regiones de control de la proteína de recubrimiento fd, el promotor para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de fosfatasa ácida (por ejemplo, Pho5), los promotores de los factores de emparejamiento de levaduras, y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y varias combinaciones de las mismas.

Se conocen bien sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en varias células hospedadoras. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, levaduras y sistemas baculovirales. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster, células NSO de

melanoma de ratón y muchas otras. Un hospedador bacteriano común puede ser, por ejemplo, *E. coli*.

La expresión de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno en células procariontes, tales como *E. coli*, está bien establecida en la materia. Para una revisión, véase, por ejemplo, Plückerthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991). La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la materia (Raff, M.E. (1993) *Curr. Opin. Biotech.* 4: 573-576; Trill J.J. et al. (1995) *Curr. Opin. Biotech* 6: 553-560).

También son útiles una amplia variedad de células hospedadoras unicelulares en la expresión de secuencias de ADN. Estos hospedadores incluyen hospedadores eucariotas y procariontes bien conocidos, tales como cepas de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, hongos tales como levaduras, y células animales, tales como CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1.1, B-W y células L-M, células de riñón de mono verde africano (por ejemplo, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, y BMT10), células de insecto (por ejemplo, Sf9), y células humanas y vegetales en cultivo tisular.

Se entenderá que no todos los vectores, secuencias de control de la expresión y hospedadores funcionarán igualmente bien para expresar las secuencias de ADN. Ni tampoco todos los hospedadores funcionarán igualmente bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, un experto en la materia será capaz de seleccionar los vectores adecuados, las secuencias de control de la expresión, y los hospedadores sin experimentación innecesaria para lograr la expresión deseada sin apartarse del alcance de esta solicitud. Por ejemplo, en la selección de un vector, tiene que tenerse en consideración al hospedador debido a que el vector tiene que funcionar en este. El número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias, y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como marcadores antibióticos, también se tendrán en consideración. Un experto habitual en la técnica puede seleccionar los vectores adecuados, las secuencias de control de la expresión, y los hospedadores para lograr la expresión deseada sin apartarse del alcance de esta solicitud. Por ejemplo, en la selección de un vector, se tiene en consideración al hospedador debido a que el vector funciona en este. El número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias, y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como marcadores antibióticos, también pueden tenerse en consideración.

La presente solicitud también proporciona construcciones en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión tal como se describen en otras partes en el presente documento que comprenden al menos un polinucleótido como los anteriores. Los vectores adecuados pueden seleccionarse o construirse, conteniendo secuencias reguladoras adecuadas, incluyendo secuencias de promotor, secuencias de terminador, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, marcadores de selección y otras secuencias según sea adecuado. Los vectores pueden ser plásmidos, virales, por ejemplo, fago, fagémido, etc., según sea adecuado. Para más detalles véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición*, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas conocidas y protocolos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en *Short Protocols in Molecular Biology*, segunda edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.

En la selección de una secuencia de control de la expresión, normalmente se tendrán en consideración varios factores. Estos incluyen, por ejemplo, la fuerza relativa del sistema, la capacidad para controlarlo, y su compatibilidad con la secuencia de ADN particular o gen a expresar, particularmente respecto a estructuras secundarias potenciales. Los hospedadores unicelulares adecuados se seleccionarán teniendo en consideración, por ejemplo, su compatibilidad con el vector elegido, sus características de secreción, su capacidad para plegar proteínas de manera adecuada, y sus necesidades de fermentación, así como la toxicidad para el hospedador del producto codificado por las secuencias de ADN a expresar, y la facilidad de purificación de los productos de expresión.

Un aspecto adicional proporciona una célula hospedadora que contiene uno o más polinucleótidos tal como divulga en el presente documento. Otro aspecto adicional más proporciona un método para introducir dichos uno o más polinucleótidos en una célula hospedadora, mediante cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas puede incluir, por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, DEAE Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus (por ejemplo, vaccinia) o, para células de insecto, baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir, por ejemplo, transformación mediante cloruro de calcio, electroporación y transfección usando bacteriófagos.

La introducción puede estar seguida por causar o permitir la expresión a partir de los uno o más polinucleótidos, por ejemplo, cultivando células hospedadoras en condiciones para la expresión de uno o más polipéptidos a partir de uno o más polinucleótidos. Pueden usarse sistemas inducibles e inducir la expresión mediante la adición de un activador.

En una realización, los polinucleótidos pueden integrarse en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula hospedadora. La integración puede estar promovida por la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar. En otra realización, el ácido nucleico se mantiene en un vector episomal en la célula hospedadora.

Se proporcionan métodos en el presente documento que incluyen el uso de una construcción tal como se indica anteriormente en un sistema de expresión para expresar un polipéptido específico.

5 Tomando en consideración estos y otros factores, un experto en la materia será capaz de construir varias combinaciones de vector/secuencia de control de la expresión/hospedador que expresará las secuencias de ADN durante la fermentación o en cultivos animales a gran escala.

10 Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, o una proteína de unión puede prepararse recombinantemente/sintéticamente además de, o en vez de, clonarse. El polinucleótido puede estar diseñado con los codones adecuados para el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, o proteína de unión. En general, se seleccionarán codones preferidos para un hospedador pretendido si la secuencia se va a usar para expresión. El polinucleótido completo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos solapantes preparados mediante métodos estándar y ensamblarse en una secuencia codificante completa. Véase, por ejemplo, Edge, Nature, 292:756 (1981); Nambair et al., Science, 223:1299 (1984); Jay et al., J. Biol. Chem., 259:6311 (1984).

15 Un método general para la incorporación específica de sitio de aminoácidos no naturales en proteínas se describe en Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, Science, 244:182-188 (abril de 1989). Este método puede usarse para crear análogos con aminoácidos no naturales.

20 Tal como se ha mencionado anteriormente, una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede prepararse sintéticamente en vez de clonarse. La secuencia de ADN puede diseñarse con los codones adecuados para la secuencia de aminoácido del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En general, se seleccionarán codones preferidos para el hospedador pretendido si la secuencia se va a usar para expresión. La secuencia completa se ensambla a partir de oligonucleótidos solapantes preparados mediante métodos estándar y ensamblarse en una secuencia codificante completa. Véase, por ejemplo, Edge, Nature, 292:756 (1981); Nambair et al., Science, 223:1299 (1984); Jay et al., J. Biol. Chem., 259:6311 (1984).

30 El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que potencia la respuesta inmune, particularmente para un antígeno. Un adyuvante puede servir como depósito de tejidos que libera lentamente al antígeno y también como un activador del sistema linfóide que potencia de manera no específica la respuesta inmune (Hood et al., Immunology, Segunda Edición., 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, pág. 384). A menudo, una exposición primaria con solo antígeno, en ausencia de un adyuvante, no logrará provocar una respuesta inmune humoral o celular. Los adyuvantes previamente conocidos y utilizados incluyen, pero sin limitación, adyuvante completo de Freund (CFA), adyuvante incompleto de Freund (IFA), saponina, geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas, tales como lisolecitina, polioles pluriónicos, polianiones, péptidos, aceite o emulsiones de hidrocarburo, hemocianina de lapa de ojo de cerradura, dinitrofenol, y adyuvante humano potencialmente útil, tal como BCG (Bacille Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Los adyuvantes de sales minerales incluyen, pero sin limitación: hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato de calcio, hidróxido de cinc e hidróxido de calcio. Preferentemente, la composición de adyuvante comprende además una emulsión de lípido o grasa que comprende aproximadamente un 10 % (en peso) de aceite vegetal y aproximadamente un 1-2 % (en peso) de fosfolípidos. Preferentemente, la composición de adyuvante comprende además opcionalmente una forma de emulsión que tiene partículas de aceite dispersas en una fase acuosa continua, que tiene un poliol formador de emulsión en una cantidad de desde aproximadamente un 0,2 % (en peso) a aproximadamente un 49 % (en peso), opcionalmente un aceite metabolizable en una cantidad formadora de emulsión de hasta el 15 % (en peso), y opcionalmente un tensioactivo basado en éter de glicol en una cantidad estabilizante de la emulsión de hasta aproximadamente un 5 % (en peso).

50 Los anticuerpos también pueden madurarse por afinidad usando métodos de selección y/o mutagénesis conocidos tal como se describen anteriormente. Los anticuerpos madurados por afinidad pueden tener una afinidad que es dos veces, cinco veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces o más mayor que la del anticuerpo de partida (generalmente murino, de conejo, pollo, humanizado o humano) a partir del cual se prepara el anticuerpo madurado. Las afinidades aparentes pueden determinarse mediante métodos tales como un ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA) o cualquier otra técnica familiar para un experto en la materia. Las avidedces pueden determinarse mediante métodos, tales como un análisis de Scatchard o cualquier otra técnica familiar para un experto en la materia. Otra técnica para medir la afinidad de unión aparente familiar para los expertos en la materia es una técnica de resonancia de plasmón superficial (analizada en un sistema BIACORE 2000) (Liljebblad, et al., Glyco. J. 2000, 17:323-329). Las mediciones estándar y los ensayos de unión tradicionales se describen por Heeley, R. P., Endocr. Res. 2002, 28:217-229.

60 En otra realización más, un anticuerpo se une específica y selectivamente a LOXL2 con una mayor afinidad de unión (por ejemplo, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces mayor) que la afinidad de unión para al menos uno de: LOX humano, la LOX humana madura o activa, la forma secretada de LOX u otras proteínas similares a lisil oxidasa (LOL) o relacionadas con lisil oxidasa (por ejemplo, LOXL1, LOXL3, y LOXL4) en productos no procesados, maduros, activos y/o secretados. En una realización, el anticuerpo se une específica y selectivamente a LOXL2 en sus formas no

procesadas y/o procesadas (maduras). La forma madura de LOXL2 está normalmente activa, sin embargo, en algunas realizaciones, LOXL2 no procesada también está activa.

5 Un anticuerpo puede unirse tanto a LOX humana o LOXL2 humana, con una mayor afinidad de unión (por ejemplo, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces mayor), que la afinidad de unión por al menos uno de: otras proteínas similares a lisil oxidasa o relacionadas con lisil oxidasa (por ejemplo, LOXL1, LOXL3, y LOXL4).

10 Los anticuerpos que se unen a enzimas pueden ser inhibidores competitivos, inhibidores incompetivos o inhibidores no competitivos. Respecto de la inhibición competitiva, un inhibidor tiene una similitud estructural con el sustrato. La inhibición será observable a bajas concentraciones de sustrato, pero puede superarse a elevadas concentraciones de sustrato. Respecto de la inhibición incompetiva, un inhibidor se une en un sitio que se hace disponible después de que el sustrato se une en el sitio activo. La inhibición será más observable a elevada concentración de sustrato.
15 Respecto de la inhibición no competitiva, un inhibidor se une a un sitio apartado del sitio de unión a sustrato. La inhibición relativa será generalmente la misma en todas las concentraciones de sustrato. El mecanismo de acción de los anticuerpos que actúan como inhibidores competitivos, inhibidores incompetivos e inhibidores no competitivos se ilustra en la Figura 4. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser inhibidores competitivos, inhibidores incompetivos o inhibidores no competitivos. En un aspecto, los anticuerpos descritos en el presente
20 documento pueden ser inhibidores no competitivos.

Los anticuerpos descritos en el presente documento son inhibidores no competitivos; esto es que los anticuerpos bloquean la actividad enzimática de LOXL2 independientemente de si las enzimas están unidas a sustrato (colágeno) o no.

25 La unión de un anticuerpo a LOXL2 puede (1) reducir o inhibir la captación o internalización de LOXL2 (por ejemplo, a través de integrina beta 1 u otros receptores o proteínas celulares) y/o (2) reducir o inhibir la actividad enzimática de LOXL2. Se cree que dicho anticuerpo puede reducir la EMT y de este modo es útil para las aplicaciones divulgadas en el presente documento. Un anticuerpo descrito en el presente documento puede unirse al sitio de escisión proteolítica de LOXL2, bloqueando de este modo de manera eficaz (inhibiendo) el procesamiento de la LOXL2 para reducir el nivel de LOX o LOXL2 activas. Dicha inhibición puede suceder a través de la unión directa a LOXL2 o a través de interferencia indirecta incluyendo impedancia estérica, alteración enzimática de LOXL2, inhibición de la transcripción o traducción, desestabilización de transcritos de ARNm, deterioro de la exportación, procesamiento o localización de LOXL2, y similares.

30 La unión de LOXL2 con otras proteínas, tales como receptores celulares (por ejemplo, receptor de captación integrina beta 1), BTK (tirosina cinasa de agammaglobulinemia de Burton), u otras integrinas también se efectúa usando el ensayo anteriormente mencionado, en el que en vez de proteínas ECM, se usan receptores celulares (por ejemplo, receptor de captación integrina beta 1), BTK (tirosina cinasa de agammaglobulinemia de Burton), u otras integrinas.
35

Aquellos anticuerpos anti-LOXL2 que inhiben la unión de LOXL2 a proteínas ECM, receptores celulares, e integrinas, se seleccionan como candidatos para posterior desarrollo. En una realización, los anticuerpos anti-LOXL2 que inhiben la unión de LOXL2 a proteínas ECM, receptores celulares, e integrinas, son inhibidores no competitivos.

45 En una realización, un anticuerpo descrito en el presente documento se une específicamente al dominio catalítico de LOX. Este dominio, en la región C-terminal, contiene los elementos necesarios para la actividad catalítica (el sitio de unión a cobre, restos de tirosilo y lisilo que contribuyen al cofactor de carbonilo, y 10 restos de cisteína. Véase, Thomassin et al. "The Pro-regions of lysyl oxidase and lysyl oxidase-like 1 are required for deposition onto elastic fibers," J Biol. Chem. 30 de diciembre de 2005; 280(52):42848-55 para detalles adicionales.
50

Los anticuerpos pueden unirse a LOXL2 de longitud completa y/o procesada.

55 En el presente documento se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a LOXL2 tal como se definen en las reivindicaciones. Los anticuerpos anti-LOXL2 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen y/o inhiben a LOXL2 tienen uso en los métodos de purificación, diagnósticos y terapéuticos descritos en el presente documento.

Además se proporcionan en el presente documento anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que compiten con, o se unen específicamente a, cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos anteriores por la unión a LOXL2.
60

Cualquiera de dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno puede unirse específicamente a LOXL2 con una afinidad de unión al menos 2,5, 10, 50, 100, 500 o 1000 veces mayor que a al menos uno de LOX, LOXL1, LOXL3 o LOXL4.
65

En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento se une específicamente a la región SRCR3-4 de LOXL2 y, por lo tanto, se une a LOXL2 tanto de longitud completa como procesado. En un aspecto, LOXL2 tanto de longitud completa como procesada son formas activas de la enzima. Un anticuerpo puede, por ejemplo, unirse específicamente a un epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 6. Dichos anticuerpos pueden servir como inhibidores parciales acompetitivos de la actividad enzimática *in vitro*, inhibiendo aproximadamente la mitad de la actividad enzimática contra un sustrato de 1,5-diaminopentano con una CI_{50} aparente de 20 - 30 nM. Dichos anticuerpos pueden servir como inhibidores no competitivos.

- 5
- 10 Cuando se humanizan anticuerpos, la incorporación simultánea de todos los ácidos nucleicos codificantes de las FR y/o CDR y todos los cambios de posición de aminoácidos seleccionados puede lograrse mediante varios métodos conocidos para los expertos en la materia, incluyendo, por ejemplo, síntesis recombinante y química. Por ejemplo, la incorporación simultánea puede lograrse, por ejemplo, sintetizando químicamente la secuencia de nucleótidos para la región variable aceptora, fusionada junto con los ácidos nucleicos que codifican a las CDR, e incorporando en las
- 15 posiciones seleccionadas por portar restos de aminoácidos variables una pluralidad de codones de aminoácidos correspondientes.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a LOXL2. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a LOXL2 pueden inhibir (parcial o completamente) o controlar/tratar (parcial o completamente) los síntomas asociados con y/o causados por la expresión aberrante de LOXL2. La solicitud también proporciona líneas celulares que pueden usarse para producir a los anticuerpos, métodos para producir las líneas celulares, métodos para expresar anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos y purificar a los mismos.

- 20
- 25 Puede reconocerse que los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a LOXL2 generados usando los métodos descritos en el presente documento pueden ensayarse usando los ensayos proporcionados en el presente documento o conocidos en la materia para la capacidad de unirse a LOXL2 (por ejemplo, ELISA) así como afinidad (por ejemplo, Biacore o resonancia de plasmón superficial).
- 30 Las versiones humanizadas de anticuerpos anti-LOXL2 tienen una o más de las siguientes características: retención de la función inhibidora de anticuerpos monoclonales murinos, afinidad de unión equivalente o aumentada con una lenta velocidad de disociación (por ejemplo, K_d 0,1 - 1 nM), unión a LOXL2 de longitud completa y/o procesada, inhibición parcial no competitiva de la actividad enzimática, CI_{50} equivalente o mejor (por ejemplo, aproximadamente 30 nM), actividad inhibidora en ensayos de migración/invasión basados en células, inhibición de un cambio de tipo
- 35 EMT inducido por la secreción de LOXL2 en medio condicionado de células tumorales, unión a LOXL2 asociado a la matriz generado por células tumorales humanas vivas, reactividad cruzada de unión a LOXL2 humano con LOXL2 murino, eficacia terapéutica (por ejemplo, reducción parcial del tamaño tumoral y/o síntomas), toxicidad reducida e inmunogenicidad reducida.
- 40 En el presente documento se proporcionan anticuerpos humanizados que se unen a hLOXL2, y anticuerpos humanizados que se unen a hLOXL2 y LOXL2 (LOXL2 murina). En un aspecto, los anticuerpos humanizados son inhibidores no competitivos.

En una realización, un anticuerpo anti-LOXL2 tiene una cadena VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 26, SEC ID N°: 27 o SEC ID N°: 28. Se entenderá que las modificaciones conservativas de aminoácidos pueden efectuarse usando los métodos descritos en el presente documento en una o más regiones CDR o marco conservadas para la maduración por afinidad del anticuerpo. Los anticuerpos modificados mediante dichos métodos pueden ensayarse respecto a su función usando cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

- 50
- 55 En otra realización, un anticuerpo anti-LOXL2 tiene una cadena VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 30, SEC ID N°: 31 o SEC ID N°: 32. Se entenderá que las modificaciones conservativas de aminoácidos pueden efectuarse usando los métodos descritos en el presente documento en una o más regiones CDR o marco conservadas para la maduración por afinidad del anticuerpo. Los anticuerpos modificados mediante dichos métodos pueden ensayarse respecto a su función usando cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

En el presente documento se proporciona un anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a LOXL2, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en el que dicha región variable de cadena ligera comprende:

- 60
- (i) una FR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 33 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 33 salvo por una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:
- 65 (a) una sustitución de glutamina (Q) por valina (V) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 24;

(b) una sustitución de leucina (L) por valina (V) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 30;

(c) una sustitución de valina (V) por lisina (K) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 31;

5 (d) una sustitución de arginina (R) por lisina (K) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 32;
y

(e) una sustitución de treonina (T) por alanina (A) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 35;

10 y una eliminación de los restos de aminoácidos 1-19;

(ii) una FR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 34 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 34 salvo por una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

15 (a) una sustitución de lisina (K) por arginina (R) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 3;

(b) una sustitución de arginina (R) por alanina (A) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 5,
y

20 (iii) una FR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 35 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 35 salvo por una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

25 (a) una sustitución de lisina (K) por arginina (R) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 1;

(b) una sustitución de alanina (A) por valina (V) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 2;

30 (c) una sustitución de leucina (L) por isoleucina (I) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 4;

(d) una sustitución de serina (S) por treonina (T) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 10;

35 (e) una sustitución de glutamina (Q) por ácido glutámico (E) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 16;

(f) una sustitución de treonina (T) por arginina (R) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 21;

40 (g) una sustitución de ácido aspártico (D) por ácido glutámico (E) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 23;

(h) una sustitución de serina (S) por treonina (T) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 25;
y

45 (i) una sustitución de fenilalanina (F) por tirosina (Y) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 29;

y

50 (iv) una FR4 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 36 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 36 salvo por una sustitución de lisina (K) por valina (V) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 7,

y en la que dicha región variable de cadena ligera comprende:

55 (i) una FR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 49 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 49 salvo por una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

60 (a) una sustitución de alanina (A) por treonina (T) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 27;

(b) una sustitución de alanina (A) por prolina (P) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 28;

65 (c) una sustitución de prolina (P) por leucina (L) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 29;

(d) una sustitución de valina (V) por leucina (L) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 31;

(e) una sustitución de ácido glutámico (E) por glutamina (Q) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 37; (d) una sustitución de serina (S) por prolina (P) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 38;

5 (f) una sustitución de valina (R) por alanina (A) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 39; y una eliminación de los restos de aminoácidos 1-20;

10 (ii) una FR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 50 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 50 salvo por una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) una sustitución de fenilalanina (F) por tirosina (Y) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 2; y

15 (b) una sustitución de arginina (R) por lisina (K) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 5;

(iii) una FR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 51 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 51 salvo por una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

20 (a) una sustitución de alanina (A) por ácido aspártico (D) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 14; y

(b) una sustitución de arginina (R) por lisina (K) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 18;

y

25 (iv) una FR4 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 52 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 52 salvo por una sustitución de lisina (K) por valina (V) o una sustitución conservativa de la misma en la posición 7.

30 En una realización, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región FR1 variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEC ID N°: 33, 37 o 44; una región FR2 variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEC ID N°: 34, 38 o 45; una región FR3 variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEC ID N°: 35, 39, 46, 47 o 48; una región FR4 variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEC ID N°: 36 o 40; una región FR1 variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEC ID N°: 49 o 53; una región FR2 variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEC ID N°: 50, 54 o 60; una región FR3 variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEC ID N°: 51, 55 o 61; y una región FR4 variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEC ID N°: 52 o 56.

40 Se encuentran abarcadas dentro del ámbito de la presente solicitud cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables que son al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o hasta un 100 % idénticas a las cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables descritas en el presente documento.

45 Las sustituciones conservativas son modificaciones menores de estas secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos que se pretende que estén incluidas como ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y pesadas y sus fragmentos funcionales. Dichas modificaciones menores incluyen, por ejemplo, aquellas que no cambian la secuencia de aminoácidos codificada debido a la degeneración del código genético así como aquellas que dan como resultado solo una sustitución conservativa de la secuencia de aminoácidos codificada o aquellas que no alteran sustancialmente la capacidad de unión del anticuerpo. Las sustituciones conservativas de aminoácidos codificados incluyen, por ejemplo, aminoácidos que pertenecen a los siguientes grupos: (1) aminoácidos no polares (Gly, Ala, Val, Leu, e Ile); (2) aminoácidos polares neutros (Cys, Met, Ser, Thr, Asn, y Gln); (3) aminoácidos ácidos polares (Asp y Glu); (4) aminoácidos polares básicos (Lys, Arg e His); y (5) aminoácidos aromáticos (Phe, Trp, Tyr, e His). Se incluyen otras modificaciones menores en los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de cadena pesada y ligera de la invención en tanto que el ácido nucleico o los polipéptidos codificados mantengan parte, o la totalidad, de su función tal como se describe en el presente documento y que tienen uso en los métodos descritos en el presente documento. Las sustituciones no conservativas son aquellas que no están identificadas como sustituciones conservativas. Usando los métodos descritos en el presente documento, se puede discernir si puede ser posible sustituir un aminoácido no conservativo para un resto de aminoácido marco conservado y evaluar la función del anticuerpo modificado usando los ensayos descritos en otras partes en el presente documento.

60 Las cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables modificadas pueden explorarse para unión y actividad usando métodos conocidos en la materia y descritos en el presente documento.

65 Una porción sustancial de un dominio variable incluirá tres regiones CDR, junto con sus regiones marco conservadas intercaladas. La porción también puede incluir al menos aproximadamente un 50 % de una o ambas de la primera y la cuarta región marco conservada, siendo el 50 % el 50 % C-terminal de la primera región marco conservada y el

50 % N-terminal de la cuarta región marco conservada. Los restos adicionales en los extremos N-terminal y C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos no asociados normalmente con regiones de dominio natural de origen natural. Por ejemplo, la construcción de anticuerpos anti-LOXL2 humanizados y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento producidos mediante técnicas de ADN recombinante pueden dar como resultado la introducción de restos N- o C-terminal codificados por enlaces introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlaces para unir dominios variables a secuencias de proteína adicionales incluyendo cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos) o marcadores proteicos tal como se discute en más detalle más adelante.

Puede determinarse la actividad anti-LOX o anti-LOXL2 de los anticuerpos abarcados en la presente solicitud, incluyendo, por ejemplo, aquellos que tienen cadenas pesadas o ligeras variables que tienen al menos un 50 % de identidad con aquellos descritos en el presente documento.

En el presente documento se proporciona un método para identificar un anticuerpo que inhibe el crecimiento de tumores metastásicos, que comprende poner en contacto a LOXL2 o a una célula que comprende LOXL2 con un anticuerpo candidato; y determinar la expresión o actividad de la LOXL2, mediante el cual el anticuerpo candidato que reduce la expresión o actividad de LOXL2 en comparación con la expresión o actividad detectada en ausencia del anticuerpo se identifica como el compuesto que inhibe el crecimiento de células tumorales metastásicas. En realizaciones particulares, el anticuerpo se pone en contacto con LOXL2 o una célula que expresa LOXL2 en condiciones hipóxicas. En un aspecto, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser inhibidores no competitivos.

También se proporciona en el presente documento un método para identificar un anticuerpo que aumenta la eficacia de agentes quimioterapéuticos, que comprende poner en contacto a LOXL2 o a una célula que comprende LOXL2 con un anticuerpo candidato; y determinar la expresión o actividad de la LOXL2, mediante el cual el anticuerpo candidato que reduce la expresión o actividad de LOXL2 en comparación con la expresión o actividad detectada en ausencia del anticuerpo se identifica como el anticuerpo que aumenta la eficacia de agentes quimioterapéuticos en la inhibición o reducción del crecimiento de tumores metastásicos.

Puede emplearse cualquier fuente adecuada de LOXL2 como una diana de anticuerpo en el presente método. La enzima puede derivarse, aislarse, o producirse recombinantemente a partir de cualquier fuente conocida en la materia, incluyendo levaduras, microbios, y mamíferos, que permitirán la generación de un producto adecuado que pueda generar un reactivo detectable o será biológicamente activo en un ensayo adecuado.

La actividad enzimática de LOXL2 puede determinarse mediante cualquier método adecuado descrito en el presente documento o conocido en la materia. Los métodos ejemplares para determinar la actividad de LOXL2 incluyen aquellos de Trackman et al., Anal. Biochem. 113:336-342 (1981); Kagan, et al., Methods Enzymol. 82A:637-49 (1982); Palamakumbura et al., Anal. Biochem. 300:245-51 (2002); Albini et al., Cancer Res. 47: 3239-45 (1987); Kamath et al., Cancer Res. 61:5933-40 (2001); patente de los Estados Unidos N° 4.997.854; y Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2004/0248871. Por ejemplo, la actividad enzimática puede determinarse detectando y/o cuantificando "subproductos de lisil oxidasa, tales como producción de H₂O₂; restos de piridinio de colágeno, producción de amonio; producción de producto de aldehído; oxidación de lisilo, desoxipiridinolina (Dpd) discutida más adelante. Puede también detectarse una capacidad invasiva celular cuantitativa *in vitro*; adhesión y crecimiento celular *in vitro*; y crecimiento metastásico *in vivo*. Los modelos *in vivo* incluyen, pero sin limitación, modelos singénicos adecuados, modelos de xenoinjerto de tumor humano, modelos ortópticos, modelos metastásicos, modelos transgénicos, y modelos de *knockout* génico (véase, por ejemplo, Teicher, Tumors Models in Cancer Research (Humana Press 2001)).

Las condiciones hipóxicas pueden ser introducidas o de origen natural. Las zonas hipóxicas aparecen con frecuencia en el interior de tumores sólidos. La hipoxia también puede inducirse *in vivo*, particularmente en modelos animales experimentales, usando la disminución o el cese del flujo sanguíneo arterial al tumor o la administración de compuestos vasoconstrictores. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.646.185. Los compuestos vasoconstrictores ejemplares incluyen agonistas adrenérgicos directos e indirectos, tales como norepinefrina, epinefrina, fenilefrina, y cocaína. La presencia de una región hipóxica en un tumor sólido presente en un sujeto puede observarse mediante varios métodos conocidos actualmente en la técnica, incluyendo resonancia magnética nuclear (RMN) e histografía de electrodo de oxígeno pO₂. Dichos métodos pueden usarse en el contexto de la presente invención (tal como se describe más adelante), para identificar regiones diana de tratamiento hipóxicas y para guiar en la administración de composiciones de tratamiento a dichas regiones. *In vitro*, las condiciones hipóxicas pueden inducirse usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, las células pueden mantenerse en condiciones anóxicas (< 0,1 % de O₂) a 37 °C en una cámara anaeróbica o en condiciones hipóxicas (del 1 al 2 % de O₂) a 37 °C en una cámara de incubador modular rellena con CO₂ al 5 % y del 1 al 2 % de O₂ equilibrado con N₂. Véase, por ejemplo, Erler et al., Mol. Cell. Biol. 24:2875-89 (2004).

Las enzimas LOXL2 o la célula que expresa LOXL2 pueden ponerse en contacto con un compuesto (por ejemplo, un inhibidor de LOX/LOXL tal como un anticuerpo) de cualquier modo adecuado durante cualquier longitud de tiempo

adecuada. Para las regiones tumorales que son accesibles a administración hipodérmica del agente, puede ser deseable inyectar el compuesto directamente en la región hipóxica. Las células pueden ponerse en contacto con el compuesto más de una vez durante la incubación o tratamiento. Normalmente, la dosis necesaria para un anticuerpo se encuentra en el intervalo de aproximadamente 1 microgramos/ml a 1000 microgramos/ml, más normalmente en el intervalo de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 800 µg/ml. La dosis exacta puede determinarse fácilmente a partir de cultivos *in vitro* de las células y la exposición de la célula a dosificaciones variables del compuesto. Normalmente, normalmente, la duración de tiempo en que la célula se pone en contacto con el antígeno es de aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas hasta 3 días o más, incluso indefinidamente, más normalmente durante aproximadamente 24 horas. Para los ensayos de invasión *in vitro*, puede usarse cualquier matriz adecuada. En una realización, la matriz es matriz de membrana basal reconstituida Matrigel™ (BD Sciences).

Los métodos de exploración también pueden incluir una etapa que mida FAK. Tal como se describe más adelante, la FAK (cinasa de adhesión focal [p125FAK]) se activa como parte del proceso de motilidad celular. Cuando se inhibe LOX, la fosforilación de FAK no aumenta en condiciones hipóxicas. En un ensayo de exploración de compuestos, una segunda etapa puede incluir la detección de niveles de fosfo-FAK con y sin la adición del anticuerpo de ensayo. Un anticuerpo inhibidor de ensayo también reducirá los niveles de fosfo-FAK.

Un anticuerpo es un inhibidor de la expresión o actividad biológica de LOXL2 cuando el anticuerpo reduce la expresión o actividad de LOXL2 en relación a la observada en ausencia del anticuerpo. En una realización, un anticuerpo es un inhibidor de LOXL2 cuando reduce la incidencia de metástasis en relación a la observada en ausencia del anticuerpo y, en ensayos posteriores, inhibe el crecimiento de tumores metastásicos. En un aspecto, los anticuerpos descritos en el presente documento son inhibidores no competitivos. La inhibición tumoral puede cuantificarse usando cualquier método de medida conveniente. La incidencia de metástasis puede determinarse examinando la diseminación relativa (por ejemplo, número de sitios de órganos implicados) y la carga de tumor relativa en estos sitios. EL crecimiento metastásico puede determinarse mediante análisis microscópico o macroscópico, según sea adecuado. La metástasis tumoral puede reducirse en aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más. En algunas realizaciones, puede explorarse el anticuerpo en relación a otros anticuerpos o compuestos que no tienen impacto en la expresión o actividad biológica de LOX o LOXL2. Los anticuerpos de ensayo pueden administrarse en el momento de inoculación tumoral, después del establecimiento del crecimiento de tumor primario, o después del establecimiento de metástasis locales y/o distantes. Puede darse una o múltiples administraciones del anticuerpo de ensayo usando cualquier modo conveniente de administración incluyendo, pero sin limitación, intravenosa, intraperitoneal, intratumoral, subcutánea e intradérmica.

Puede emplearse cualquier célula adecuada que exprese LOXL2 con los presentes métodos. Tal como se usa en el presente documento, el término "célula" incluye una célula biológica (por ejemplo, CHO, HeLa, etc.). La célula puede ser humana o no humana. La célula puede estar recién aislada (es decir, primaria) o derivarse de una línea celular establecida a corto plazo o largo plazo. Las líneas celulares biológicas ejemplares incluyen células de cáncer de mama humano MDA-MB 231, células de cáncer de mama humano MDA-MB 435, U-87 MG de glioma, células de carcinoma de células escamosas SCL1, CEM, HeLa de carcinoma epitelial, y células de ovario de hámster chino (CHO). Dichas líneas celulares se describen, por ejemplo, en el catálogo de líneas celulares de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD).

Una célula puede expresar la LOXL2 o su promotor de manera endógena o exógena (por ejemplo, como resultado de la transferencia estable de genes). La expresión endógena por una célula tal como se proporciona en el presente documento puede ser el resultado de la expresión constitutiva o inducida de genes endógenos.

La expresión exógena por una célula tal como se proporciona en el presente documento puede ser el resultado de la introducción de las secuencias de ácido nucleico codificantes o LOXL2 o un fragmento biológicamente activo de la misma, o la secuencia de ácido nucleico promotora de LOXL2. La transformación puede lograrse usando vectores virales, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, biolística, reactivos de lípidos catiónicos, o cualquier otra técnica conveniente conocida en la materia. El modo de transformación útil en la presente invención es convencional y se ejemplifica en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, et al., eds. 2000). La expresión exógena de la lisil oxidasa o su promotor puede ser transitoria, estable, o alguna combinación de las mismas. La expresión exógena de la enzima puede lograrse usando promotores constitutivos, por ejemplo, SV40, CMV, y similares, y promotores inducibles conocidos en la materia. Los promotores adecuados con aquellos que funcionarán en la célula de interés.

Los métodos descritos en el presente documento no son limitantes y cualquier otro método conocido en la materia puede usarse para ensayar la actividad de anticuerpos anti-LOXL2. Se describen ensayos adicionales más adelante en los Ejemplos.

Puede ser necesario en algunos casos introducir una región enlazante polipeptídica no estructurada entre un marcador de la presente invención y porciones de los anticuerpos. El enlazante puede facilitar una flexibilidad

potenciada, y/o reducir la impedancia estérica entre cualesquiera dos fragmentos. El enlazante también puede facilitar que suceda el plegado adecuado de cada fragmento. El enlazante puede ser de origen natural, tal como una secuencia que se determina que existe en forma de bucle al azar entre dos dominios de una proteína. Una secuencia enlazante ilustrativa es el enlazante encontrado entre los dominios C-terminal y N-terminal de la subunidad α de ARN polimerasa. Otros ejemplos de enlazantes de origen natural incluyen enlazantes encontrados en las proteínas 1Cl y LexA.

En el enlazante, la secuencia de aminoácidos puede variarse basándose en las características preferidas del enlazante según se determinen empíricamente o según se revele mediante modelado. Las consideraciones en la elección de un enlazante incluyen flexibilidad del enlazante, carga del enlazante, y la presencia de algunos aminoácidos del enlazante en las subunidades de origen natural. El enlazante también puede diseñarse de tal modo que los restos en el enlazante estén en contacto con ADN, de este modo influenciando la afinidad o especificidad de unión, o para interactuar con otras proteínas. En algunos casos, particularmente cuando es necesario abarcar una distancia mayor entre subunidades o cuando los dominios tienen que mantenerse en una configuración particular, el enlazante puede contener opcionalmente un dominio plegado adicional.

En algunas realizaciones es preferible que el diseño de un enlazante implique un ordenamiento de dominios que requiere que el enlazante se extienda una distancia relativamente corta, preferentemente menos de aproximadamente 10 Angstrom (Å). Sin embargo, en determinadas realizaciones, los enlazantes se extienden una distancia de hasta aproximadamente 50 Å.

Los anticuerpos proporcionados en el presente documento están conjugados o enlazados a restos terapéuticos y/o de obtención de imágenes/detectables. Los métodos para conjugar o enlazar anticuerpos se conocen bien en la materia. Las asociaciones entre anticuerpos y marcadores incluyen cualquier medio conocido en la materia incluyendo, pero sin limitación, interacciones covalentes y no covalentes.

En una realización no limitante, los anticuerpos pueden asociarse a una toxina, un radionúclido, un compuesto relacionado con hierro, un colorante, un reactivo de formación de imágenes, un marcador fluorescente o un agente quimioterapéutico que puede ser tóxico cuando se administra a una célula cancerosa.

Como alternativa, los anticuerpos pueden asociarse con un marcador detectable, tal como un radionúclido, compuesto relacionado con hierro, un colorante, un agente de formación de imágenes o un agente fluorescente para la inmunodetección de antígenos diana.

Los ejemplos no limitantes de radiomarcadores incluyen, por ejemplo, ^{32}P , ^{33}P , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{71}Ge , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{77}As , ^{77}Br , ^{81}Rb , $^{81\text{m}}\text{Kr}$, $^{97\text{m}}\text{Sr}$, ^{90}Y , ^{97}Ru , ^{99}Tc , ^{100}Pd , ^{101}Rh , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{113}In , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{123}I , ^{125}I , ^{127}I , ^{127}Cs , ^{128}Ba , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{169}Eu , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{191}Os , ^{193}Pt , ^{194}Ir , ^{197}Hg , ^{199}Au , ^{203}Pb , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi y ^{213}Bi .

Los ejemplos no limitantes de toxinas incluyen, por ejemplo, cadena A de difteria, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, cadena A de la exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, tricotecenos, fosfolipasa C de *Clostridium perfringens* (PLC), ribonucleasa pancreática bovina (BPR), proteína antiviral (PAP), abrina, factor de veneno de cobra (CVF), gelonina (GEL), saporina (SAP), viscumina.

Los ejemplos no limitantes de compuestos relacionados con hierro incluyen, por ejemplo, partículas de óxido de hierro magnético, partículas férricas o ferrosas, Fe^{203} y Fe^{304} . Los compuestos relacionados con hierro y métodos para marcar polipéptidos, proteínas y péptidos pueden encontrarse, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos 4.101.435 y 4.452.773, y en las Solicitudes Publicadas de los Estados Unidos 20020064502 y 20020136693.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos sujeto pueden acoplarse covalente o no covalentemente a una citotoxina u otro compuesto inhibidor de la proliferación celular, para localizar la administración de ese agente a una célula tumoral. Por ejemplo, el agente puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en inhibidores enzimáticos, inhibidores de la proliferación, agentes líticos, inhibidores de la síntesis de ADN o ARN, modificadores de la permeabilidad de la membrana, metabolitos de ADN, derivados de dicloroetilsulfuro, inhibidores de la producción de proteínas, inhibidores ribosomales, inductores de la apoptosis, y neurotoxinas.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos objeto pueden acoplarse a un agente útil para la obtención de imágenes del tumor. Dichos agentes incluyen: metales; quelantes metálicos; lantánidos; quelantes de lantánidos; radiometales; quelantes de radiometales; núcleos emisores de positrones; microburbujas (para ultrasonidos); liposomas; moléculas microencapsuladas en liposomas o nanoesferas; nanocompuestos de óxido de hierro monocristalino; agentes de contraste para obtención de imágenes por resonancia nuclear; agentes absorbentes, reflectantes y/o dispersantes de la luz; partículas coloidales; fluoróforos, tales como fluoróforos del infrarrojo cercano. En muchas realizaciones, dichos restos/funcionalidad secundarios serán relativamente grandes, por ejemplo, de al

menos 25 uma de tamaño, y en muchos casos puede ser de al menos 50, 100 o 250 uma de tamaño.

En determinadas realizaciones, la segunda funcionalidad es un resto quelante para quelar un metal, por ejemplo, un quelante para un radiometal o ión paramagnético. En realizaciones adicionales, es un quelante para un radionúclido útil para procedimientos de radioterapia o de obtención de imágenes.

Los radionúclidos útiles en la presente invención incluyen emisores gamma, emisores de positrones, emisores de electrones Auger, emisores de rayos X y emisores de fluorescencia, siendo los emisores alfa o beta los preferidos para uso terapéutico. Los ejemplos de radionúclidos útiles como toxinas en radioterapia incluyen: ^{32}P , ^{33}P , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{71}Ge , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{77}As , ^{77}Br , ^{81}Rb , ^{81}MKr , ^{87}MSr , ^{90}Y , ^{97}Ru , ^{99}Tc , ^{100}Pd , ^{101}Rh , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{113}In , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{128}Ba , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{191}Os , ^{193}Pt , ^{194}Ir , ^{197}Hg , ^{199}Au , ^{203}Pb , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi y ^{213}Bi . Los radionúclidos terapéuticos preferidos incluyen ^{188}Re , ^{186}Re , ^{203}Pb , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{109}Pd , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{77}Br , ^{211}At , ^{97}Ru , ^{105}Rh , ^{198}Au y ^{199}Ag , ^{166}Ho o ^{177}Lu . Se describen condiciones en las que un quelante se coordinará con un metal, por ejemplo, por Gasnow et al. Patentes de los Estados Unidos N^o 4.831.175, 4.454.106 y 4.472.509. Dentro de la presente invención, "radionúclido" y "radiomarcador" son intercambiables.

^{99}Tc es un radioisótopo particularmente atractivo para aplicaciones diagnósticas, ya que está fácilmente disponible para todos los departamentos de medicina nuclear, no es caro, proporciona dosis mínimas de radiación al paciente, y tiene propiedades de obtención de imágenes nucleares ideales. Tiene una semivida de seis horas, lo que significa es deseable un direccionamiento rápido de un anticuerpo marcado con tecnecio. Por consiguiente, en determinadas realizaciones preferidas, los anticuerpos modificados incluyen un agente quelante para tecnecio.

En otras realizaciones adicionales, la funcionalidad secundaria puede ser un agente radiosensibilizante, por ejemplo, un resto que aumenta la sensibilidad de las células a la radiación. Los ejemplos de agentes radiosensibilizantes incluyen nitroimidazoles, metrodinazol y misonidazol (véase: DeVita, V. T. en Harrison's Principles of Internal Medicine, pág. 68, McGraw-Hill Book Co., NY, 1983). Los anticuerpos modificados que comprenden un agente radiosensibilizante como resto activo se administran y localizan en la célula diana. Tras la exposición del individuo a la radiación, el agente radiosensibilizante se "excita" y causa la muerte de la célula.

Hay una amplia variedad de restos que pueden servir como quelantes y que pueden derivarse para los anticuerpos de la presente invención. Por ejemplo, el quelante puede ser un derivado de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecanotetraacético (DOTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y ácido 1-p-isotiocianato-bencil-metil-dietilentriaminopentaacético (ITC-MX). Estos quelantes tienen normalmente grupos en la cadena lateral mediante los cuales pueden usarse para la unión a antagonistas objeto. Dichos grupos incluyen, por ejemplo, bencilisotiocianato, mediante el cual el DOTA, DTPA o EDTA pueden acoplarse a, por ejemplo, un grupo amina.

En una realización, el resto de quelato es un resto de quelato "NxSy". Tal como se define en el presente documento, los "quelatos NxSy" incluyen quelantes bifuncionales que son capaces de unirse de manera coordinada a un metal o radiometal y, preferentemente, tienen núcleos de N_2S_2 o N_3S . Los quelatos NxSy ejemplares se describen, por ejemplo, en Fritzberg et al. (1998) PNAS 85: 4024-29; y Weber et al. (1990) Chem. 1: 431-37; y en las referencias citadas en estos.

Jacobsen et al. (Solicitud PCT WO 98/12156) proporciona métodos y composiciones, es decir, bibliotecas sintéticas de restos de unión, para identificar compuestos que se unen a un átomo metálico. La estrategia descrita en esta publicación puede usarse para identificar restos de unión que pueden añadirse posteriormente a los anticuerpos para derivar los anticuerpos modificados.

Un problema encontrado frecuentemente con el uso de proteínas conjugadas en aplicaciones radiodiagnósticas es una acumulación potencialmente peligrosa de los fragmentos de restos radiomarcados en el riñón. Cuando el conjugado se forma usando un enlazante lábil a ácido o base, puede suceder ventajosamente la escisión del quelato de radionúclido a partir de la proteína. Si el quelato es de relativamente bajo peso molecular, como se espera que sean la mayor parte de los anticuerpos modificados objeto, fragmentos de unión a antígeno y péptidos, no se retiene en el riñón y se excreta en la orina, reduciendo de este modo la exposición del riñón a la radiactividad. Sin embargo, en determinadas casos, puede ser ventajoso utilizar ligandos objeto lábiles a ácidos o bases por los mismos motivos que se han usado en las proteínas marcadas.

Por consiguiente, algunos de los anticuerpos objeto marcados/modificados pueden sintetizarse, mediante métodos estándar en la materia, para proporcionar grupos funcionales reactivos que pueden formar enlaces lábiles a ácidos con, por ejemplo, un grupo carbonilo del ligando. Los ejemplos de enlaces lábiles a ácidos adecuados incluyen funciones de hidrazona y tiosemicarbazona. Estos se forman haciendo reaccionar al carbohidrato oxidado con quelatos que portan hidrazina, tiosemicarbazona, y funciones, respectivamente.

Como alternativa, pueden usarse escindibles por bases que se han usado para la eliminación potenciada del radiomarcador por parte de los riñones. Véase, por ejemplo, Weber et al. 1990 Bioconj. Chem. 1:431. El

acoplamiento de un quelato bifuncional a un anticuerpo a través de un enlace de hidrazida puede incorporar restos éster sensibles a bases en un brazo espaciador enlazante. Dicha unidad enlazante que contiene éster se ejemplifica por glucobilis de etileno (succinato de succinimidilo), (EGS, disponible a través de Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.), que tiene dos derivados éster terminales de N-hidroxisuccinimida (NHS) de dos unidades de ácido 1,4-dibutírico, cada una de las cuales está enlazada a un solo resto de etilenglicol mediante dos ésteres de alquilo. Un éster de NHS puede reemplazarse con un BFC que contiene amina adecuado (por ejemplo, 2-aminobencil DTPA), mientras que el otro éster de NHS se hace reaccionar con una cantidad limitante de hidrazina. La hidrazida resultante se usa para acoplamiento a los antagonistas, formando un enlace ligando-BFC que contiene dos funciones de éster de alquilo. Dicho conjugado es estable a pH fisiológico, pero se escinde fácilmente a pH básico.

Los anticuerpos marcados mediante quelación de radioisótopos se someten a escisión inducida por radiación del quelante y a pérdida del radioisótopo mediante disociación del complejo de coordinación. En algunos casos, el metal disociado del complejo puede volver a complejarse, proporcionando una eliminación más rápida de isótopos localizados de manera no específica y por lo tanto una menor toxicidad para tejidos no diana. Por ejemplo, los compuestos de quelante, tales como EDTA o DTPA pueden infundirse a pacientes para proporcionar un depósito de quelante para unirse a radiometales liberados y facilitar la excreción de radioisótopos libres en la orina.

En otras realizaciones adicionales, los anticuerpos se acoplan a un sumatorio de boro, tal como un carborano. Por ejemplo, los carboranos pueden prepararse con funciones de carboxilo en cadenas laterales pedantes, como se conoce en la técnica. La unión de dichos carboranos a péptidos de amina puede lograrse mediante la activación de los grupos carboxilo de los carboranos y condensación con el grupo amina para producir el conjugado. Dichos anticuerpos modificados pueden usarse para terapia de captura de neutrones.

La presente invención también contempla la modificación de los antagonistas objeto con tintes, por ejemplo, útiles en terapia, y usarse en conjunción con radiación no ionizante adecuada. El uso de luz y porfirinas en los métodos de la presente invención también está contemplado y su uso en la terapia contra el cáncer se ha revisado por van den Bergh, *Chemistry in Britain*, 22: 430-437 (1986).

Una realización de la presente invención incluye antagonistas marcados con un marcador fluorescente. Los marcadores fluorescentes comunes incluyen, por ejemplo, FITC, PE, rojo Texas, citocromo c, etc. Las técnicas para marcar polipéptidos y fragmentos de los mismos, tales como aquellos proporcionados en el presente documento, se conocen bien en la técnica.

La expresión "agente anticáncer" también incluye los agentes quimioterapéuticos descritos a continuación. La expresión agente anticáncer también incluye el tratamiento con una sustancia que reduce la hipoxia en una célula, cuando dicho agente se combina con la inhibición de LOX. Dicha sustancia puede incluir, por ejemplo, p53. Véase, por ejemplo, Matoba et al., "p53 Regulates Mitochondrial Respiration," *Science* 16 June 2006 312: 1650-1653; publicado en línea el 24 de mayo de 2006, y las referencias citadas ahí. Se usará ventajosamente una sustancia que conduzca a las células cancerosas hacia la vía respiratoria y fuera de la vía glucolítica con un inhibidor de LOX siempre que no se regule positivamente a LOX en este caso.

Los agentes quimioterapéuticos útiles como restos activos que cuando están conjugados a antagonistas de los mismos de la presente invención se administran específicamente a células son normalmente entidades químicas pequeñas producidas mediante síntesis química. Los agentes quimioterapéuticos incluyen fármacos citotóxicos y citostáticos. Los agentes quimioterapéuticos pueden incluir aquellos que tienen otros efectos en las células, tales como la reversión del estado transformado a un estado diferenciado o aquellos que inhiben la replicación celular. Los ejemplos de agentes citotóxicos conocidos útiles en la presente invención se listan, por ejemplo, en Goodman et al., "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Sexta Edición, A.B. Gilman et al., eds./Macmillan Publishing Co. Nueva York, 1980. Estos incluyen taxanos, tales como paclitaxel y docetaxel; nitrógeno, tal como mecloretamina, melfalano, mostaza de uracilo y clorambucilo; derivados de etilenimina, tales como tiotepa; sulfonatos de alquilo, tales como busulfán; nitrosoureas, tales como lomustina, semustina y estreptozocina; tiazenos, tales como dacarbazina; análogos de ácido fólico, tales como metotrexato; análogos de pirimidina, tales como fluorouracilo, citarabina y azaribina; análogos de purina, tales como mercaptopurina y tioguanina; alcaloides de la vinca, tales como vinblastina y vincristina; antibióticos, tales como dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, y mitomicina; enzimas, tales como complejos de coordinación con platino, tales como cisplatino; urea sustituida, tal como hidroxiaurea; derivados de metil hidrazina, tales como procarbazona; supresores adrenocorticales, tales como mitotano; hormonas y antagonistas, tales como adrenocorticoesteroides (prednisona), progestinas (caproato de hidroxiprogesterona, acetato y acetato de megestrol), estrógenos (dietilestilbestrol y etinil estradiol), y andrógenos (propionato de testosterona y fluoximesterona).

También pueden usarse fármacos que interfieren con la síntesis de proteínas; dichos fármacos son conocidos para los expertos en la materia e incluyen puromicina, cicloheximida, y ribonucleasa.

La mayoría de los agentes quimioterapéuticos usados actualmente en el tratamiento del cáncer poseen grupos funcionales que son susceptibles de reticulación química directamente con un grupo amina o carbonilo de un agente de la presente invención. Por ejemplo, los grupo amino están disponibles en metotrexato, doxorubicina,

daunorrubicina, citosinarabinósido, bleomicina, fludarabina, y cladribina mientras que los grupos de ácido carboxílico libres están disponibles en metotrexato, melfalano y clorambucilo.

5 Estos grupos funcionales, que son aminos libres y ácidos carboxílicos, son dianas para una variedad agentes reticulantes homobifuncionales y heterobifuncionales que pueden reticular estos fármacos directamente a un grupo amino libre de un antagonista.

10 Los agentes quimioterapéuticos contemplados por la presente invención también incluyen otros fármacos quimioterapéuticos que están disponibles comercialmente. Solo a modo de ilustración, el agente quimioterapéutico puede ser un inhibidor de la función de la cromatina, un inhibidor, un fármaco inhibidor, un agente que dañe al ADN, un antimetabolito (tal como antagonistas de folato, análogos de pirimidina, análogos de purina, y análogos de azúcares modificados), un inhibidor de la síntesis de ADN, un agente que interactúa con ADN (tal como un agente intercalante), un inhibidor de la reparación de ADN.

15 Los agentes quimioterapéuticos pueden clasificarse según su mecanismo de acción en, por ejemplo, los siguientes grupos: agentes antimetabolitos/anticáncer, tales como los análogos de pirimidina floxuridina, capecitabina, y citarabina) y análogos de purina, antagonistas de folato e inhibidores relacionados, agentes antiproliferativos/antimitóticos que incluyen productos naturales, tales como alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina, y de microtúbulos, tales como taxanos (paclitaxel, docetaxel), vinblastina, nocodazol, epotilonas y navelbina, epidipodofilotoxinas (etopósido, tenipósido), agentes que dañan al ADN (actinomicina, amsacrina, busulfán, carboplatino, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, citoxano, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, ifosfamida, melfalano, mercloretamina, mitomicina, mitoxantrona, nitrosourea, procarbazona, taxol, taxotere, tenipósido, trietilenoifosforamida y etopósido; antibióticos, tales como dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina, doxorubicina (adriamicina), idarrubicina, antraciclinas, mitoxantrona, bleomicinas, plicamicina (mitramicina) y mitomicina; enzimas (L-asparaginasa que metaboliza sistémicamente L-asparaginasa y priva a las células que no tienen la capacidad de sintetizar su propia asparagina); agentes antiplaquetarios; agentes alquilantes antiproliferativos/antimitóticos, tales como las mostazas de nitrógeno ciclofosfamida y análogos, melfalano, clorambucilo), y (hexametilmelamina y tiotepa), nitrosoureas de alquilo (BCNU) y análogos, estreptozocina), trazenos-dacarbazona (DTIC); antimetabolitos antiproliferativos/antimitóticos tales como análogos de ácido fólico (metotrexato); complejos de coordinación con platino (cisplatino, oxaliplatino, carboplatino), procarbazona, hidroxiaurea, mitotano, aminoglutetimida; hormonas, análogos de hormonas (estrógeno, tamoxifeno, goserelina, bicalutamida, nilutamida) e inhibidores de aromatasa (letrozol, anastrozol); anticoagulantes (heparina, sales sintéticas de heparina y otros inhibidores de trombina); agentes fibrinolíticos (tales como activador de plasminógeno tisular, estreptocinasa y urocinasa), aspirina, dipiridamol, ticlopidina, clopidogrel; agentes antimigratorios; agentes antiseoretos (breveldina); inmunosupresores, tales como tacrolimus, sirolimus, azatioprina, micofenolato; compuestos (TNP-470, genisteína) e inhibidores de factor de crecimiento (inhibidores de factor de crecimiento endotelial vascular, inhibidores de factor de crecimiento de fibroblastos); bloqueante del receptor de angiotensina, donantes de óxido nítrico; oligonucleótidos antisentido; anticuerpos (trastuzumab, rituximab); inhibidores del ciclo celular e inductores de la diferenciación (tretinoína); inhibidores, inhibidores de topoisomerasa (doxorubicina (adriamicina), daunorrubicina, dactinomicina, eniposida, epirubicina, etopósido, idarrubicina, irinotecán y mitoxantrona, topotecán, Irinotecán), corticoesteroides (cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona, y prednisolona); inhibidores de la cinasa de transducción de la señal de factores de crecimiento; inductores de disfunción, toxinas, tales como la toxina colérica, ricina, exotoxina de pseudomonas, toxina adenilato ciclasas de *Bordetella pertussis*, o toxina diftérica, y activadores de caspasa; y cromatina. Las dosificaciones preferidas de los agentes quimioterapéuticos son coherentes con las dosificaciones prescritas en la actualidad.

50 Adicionalmente, otros marcadores, tales como biotina seguida de estreptavidina-fosfatasa alcalina (AP), peroxidasa de rábano picante, están contemplados por la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "tratamiento que daña a ácidos nucleicos" y "agente que daña a ácidos nucleicos" se refiere a cualquier pauta de tratamiento que daña de manera directa o indirecta a los ácidos nucleicos (por ejemplo, DNA, ADNc, ADN genómico, ARNm, ARNt o ARNr). Los ejemplos de dichos agentes incluyen agentes alquilantes, nitrosoureas, antimetabolitos, alcaloides de plantas, extractos de plantas y radioisótopos. Los ejemplos de agentes también incluyen fármacos que dañan a los ácidos nucleicos, por ejemplo, 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, S-1 (Tegafur, 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina y ácido oxónico), 5-etiluracilo, arabinosil citosina (ara-C), 5-azacitidina (5-AC), 2',2'-difluoro-2'-desoxicidina (dFdC), antimetabolitos de purina (mercaptopurina, azatiopurina, tioguanina), clorhidrato de gemcitabina (Gemzar), pentostatina, alopurinol, 2-fluoro-arabinosil-adenina (2F-ara-A), hidroxiaurea, mostaza de azufre (biscloroetilsulfuro), mecloretamina, melfalano, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, tiotepa, AZQ, mitomicina C, dianhidrogalactitol, dibromoducitol, sulfonato de alquilo (busulfán), nitrosoureas (BCNU, CCNU, 4-metil CCNU o ACNU), procarbazona, dacarbazona, rebecamicina, antraciclinas tales como doxorubicina (adriamicina; ADR), daunorrubicina (cerrubicina), idarrubicina (idamicina) y epirubicina (Ellence), análogos de antraciclinas tales como mitoxantrona, actinomicina D, inhibidores de topoisomerasa no intercalantes, tales como epidipodofilotoxinas (etopósido = VP16, tenipósido = VM-26), podofilotoxina, bleomicina (Bleo), pepleomicina, compuestos que forman aductos con ácido nucleico incluyendo derivados de platino (por ejemplo, cisplatino (CDDP), análogo trans de cisplatino, carboplatino, iproplatino,

tetraplatino y oxaliplatino), camptotecina, topotecán, irinotecán (CPT-11), y SN-38. Los ejemplos específicos de tratamientos que dañan a los ácidos nucleicos incluyen radiación (por ejemplo, microondas enfocadas, radiación ultravioleta (UV), infrarroja (IR), o alfa, beta o gamma) y choque ambiental (por ejemplo, hipertermia).

5 Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "tratamiento antiproliferativo" y "agente antiproliferativo" significa cualquier pauta de tratamiento que inhiba directa o indirectamente la proliferación de una célula, virus, bacteria u otro organismo unicelular o pluricelular independientemente de si el tratamiento o agente dañe al ácido nucleico o no. Los ejemplos particulares de agentes antiproliferativos son fármacos antitumorales y antivirales, que inhiben la proliferación celular o proliferación o replicación viral. Los ejemplos incluyen, entre otras cosas, 10 ciclofosfamida, azatioprina, ciclosporina A, prednisolona, melfalano, clorambucilo, mecloretamina, busulfán, metotrexato, 6-mercaptopurina, tioguanina, arabinósido de citosina, taxol, vinblastina, vincristina, doxorubicina, actinomicina D, mitramicina, carmustina, lomustina, semustina, estreptozotocina, hidroxurea, cisplatino, mitotano, procarbazona, dacarbazina y dibromomanitol. Los agentes antiproliferativos que producen errores de replicación de 15 ácidos nucleicos o inhiben la replicación de ácidos nucleicos son aquellos tales como análogos de nucleósidos y nucleótidos (por ejemplo, AZT o 5-AZC).

En otra realización, el anticuerpo anti-LOX puede conjugarse a un "receptor" (tal como estreptavidina) para su uso en el direccionamiento previo al tumor en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente eliminador y la administración de un 20 "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga al agente citotóxico (por ejemplo, un radionúclido).

La metodología para marcar polipéptidos y fragmentos de los mismos incluyendo, pero sin limitación, aquellos proporcionados en el presente documento se conoce bien en la materia. Cuando los anticuerpos de la presente invención se marcan con un radiomarcador o toxina, los anticuerpos pueden prepararse como composiciones 25 farmacéuticas que son útiles para el tratamiento terapéutico de pacientes donde las composiciones farmacéuticas se administran al paciente en una cantidad eficaz. Cuando los anticuerpos de la presente invención están marcados con un marcador que puede visualizarse, los anticuerpos pueden prepararse como composiciones farmacéuticas que son útiles para el diagnóstico de pacientes, donde las composiciones farmacéuticas se administran al paciente en una cantidad eficaz para la obtención de imágenes *in vivo* o donde las composiciones farmacéuticas se ensayan 30 en un ensayo *in vitro*.

V. Composiciones

Cada uno de los anticuerpos de la presente invención puede usarse como una composición cuando se combina con 35 un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones farmacéuticas son útiles para su administración a un sujeto *in vivo* o *ex vivo*, y para diagnosticar y/o tratar a un sujeto con los anticuerpos divulgados, por ejemplo.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables son fisiológicamente aceptables para el paciente al que se administran 40 y mantienen las propiedades terapéuticas de los anticuerpos o péptidos con los que se administra. Los vehículos farmacéuticamente aceptables y sus formulaciones se describen de manera general en, por ejemplo, Remington's pharmaceutical Sciences (18ª Edición, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA 1990). Un vehículo farmacéutico ilustrativo es suero salino fisiológico. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como 45 una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación, implicado en portar o transportar los anticuerpos o péptidos objeto desde el sitio de administración de un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo. Cada vehículo tiene que ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no lesivo para el paciente. Un vehículo farmacéuticamente aceptable tampoco debe alterar la actividad específica de los antagonistas. Los vehículos y excipientes ilustrativos se han proporcionado 50 en otras partes del presente documento.

En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables que incluyen disolventes (acuosos o no acuosos), soluciones, emulsiones, medios de dispersión, 55 recubrimientos, agentes isotónicos o promotores o retardantes de la absorción, compatibles con su administración farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas o formulaciones farmacéuticas por lo tanto se refieren a composiciones adecuadas para su uso farmacológico en un sujeto. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas incluyen una cantidad de un compuesto de la invención, por ejemplo, una cantidad eficaz de un antagonista de la invención, y un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable.

60 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para ser compatibles con una vía de administración particular, sistémica o local. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas incluyen vehículos, diluyentes, o excipientes adecuados para su administración mediante diversas vías.

En una realización adicional, las composiciones de la presente invención comprenden además un aditivo 65 farmacéuticamente aceptable para mejorar la estabilidad del antagonista en la composición y/o para controlar la velocidad de liberación de la composición. Los aditivos farmacéuticamente aceptables de la presente invención no

- alteran la actividad específica del antagonista objeto. Un aditivo farmacéuticamente aceptable preferido es un azúcar, tal como manitol, sorbitol, glucosa, xilitol, trehalosa, sorbosa, sacarosa, galactosa, dextrano, dextrosa, fructosa, lactosa y mezclas de los mismos. Los aditivos farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden combinarse con vehículos farmacéuticamente aceptables y/o excipientes, tales como dextrosa. Como
- 5 alternativa, un aditivo farmacéuticamente aceptable preferido es un tensioactivo, tal como polisorbato 20 o polisorbato 80 para aumentar la estabilidad del péptido y disminuir la gelificación de la solución farmacéutica. El tensioactivo puede añadirse a la composición en una cantidad del 0,01 % al 5 % de la solución. La adición de dichos aditivos farmacéuticamente aceptables aumenta la estabilidad y la semivida de la composición en almacenamiento.
- 10 Los métodos de formulación y administración se adaptarán generalmente según el sitio y la enfermedad que se va a tratar. Las formulaciones ilustrativas incluyen, pero sin limitación, aquellas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo, administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, o subcutánea, incluyendo formulaciones encapsuladas en micelas, liposomas o cápsulas de liberación de fármaco (agentes activos incorporados dentro de un recubrimiento biocompatible diseñado para una liberación lenta); formulaciones ingeribles;
- 15 formulaciones para uso tópico, tales como cremas, pomadas y geles; y otras formulaciones tales como inhalantes, aerosoles y pulverizadores. La dosificación de los compuestos de la invención variará según el alcance y gravedad de la necesidad de tratamiento, de la actividad de la composición administrada, del estado de salud general del sujeto, y otras consideraciones bien conocidas para el experto en la materia.
- 20 Las formulaciones para administración entérica (oral) pueden estar contenidas en un comprimido (recubierto o no recubierto), cápsula (dura o blanda), microesfera, emulsión, polvo, gránulo, cristal, suspensión, jarabe o elixir. Los vehículos no tóxicos convencionales que incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, pueden usarse para preparar formulaciones sólidas. Los compuestos activos suplementarios (por ejemplo,
- 25 conservantes, agentes antibacterianos, antivirales y antifúngicos) también pueden incorporarse en las formulaciones. También puede usarse una formulación líquida para administración enteral. El vehículo puede seleccionarse entre diversos aceites que incluyen petróleo, animal, vegetal o sintética, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen, por ejemplo, almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de magnesio,
- 30 estearato sódico, monoestearato de glicerol, cloruro sódico, leche desnatada deshidratada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol.
- Las composiciones farmacéuticas para administración enteral, parenteral, o transmucosal incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución de Hank, solución de Ringer, dextrosa/suero
- 35 salino, y soluciones de glucosa. Las formulaciones pueden contener sustancias auxiliares para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes tamponadores, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares. Los aditivos pueden incluir también principios activos adicionales, tales como agentes bactericidas, o estabilizantes. Por ejemplo, la solución puede contener acetato de sodio, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán u oleato de trietanolamina. Se describen formulaciones parenterales y métodos adicionales en Bai (1997) J. Neuroimmunol. 80:65 75; Warren (1997) J. Neurol. Sci. 152:31 38; y Tonegawa (1997) J. Exp. Med. 186:507 515. La preparación parenteral puede estar encerrada en ampollas, jeringas desechables o viales multidosis hechos de vidrio o plástico.
- 40 Las composiciones farmacéuticas para administración intradérmica o subcutánea pueden incluir un diluyente estéril, tal como agua, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol y otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico, glutatión o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa.
- 45
- 50 Las composiciones farmacéuticas para inyección incluyen soluciones acuosas (en los casos en los que sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen suero salino fisiológico, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o suero salino tamponado con fosfato (PBS). El transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, polioliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez, por ejemplo, usando un recubrimiento como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. Los agentes antibacterianos y antifúngicos incluyen, por ejemplo, parabenos, clorobutano, fenol, ácido ascórbico y timerosal. Los agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, y cloruro de sodio pueden incluirse en la composición. Las soluciones resultantes pueden envasarse para su uso tal cual, o liofilizarse; la preparación liofilizada puede combinarse posteriormente con una solución estéril antes de la administración.
- 60
- 65 Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden contener un compuesto que estabiliza, aumenta o retrasa la absorción o eliminación. Dichos compuestos incluyen, por ejemplo, hidratos de carbono, tales como glucosa, sacarosa, o dextranos; proteínas de bajo peso molecular; composiciones que reducen la eliminación o hidrólisis de

- los péptidos; o excipientes u otros estabilizantes y/o tampones. Los agentes que retrasan la absorción incluyen, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. También pueden usarse detergentes para estabilizar o para aumentar o disminuir la absorción de la composición farmacéutica, incluyendo vehículos liposomales. Para proteger al compuesto de la digestión, se puede complejar con una composición para hacerlo resistente a ha hidrólisis ácida y enzimática, o puede complejarse el compuesto en un vehículo adecuadamente resistente, tal como un liposoma. Se conocen en la técnica medios para proteger a los compuestos de la digestión (véase, por ejemplo, Fix (1996) Pharm Res. 13:1760 1764; Samanen (1996) J. Pharm. Pharmacol. 48:119 135; y la Patente de los Estados Unidos N° 5.391.377, que describe composiciones para administración oral de agentes terapéuticos).
- Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración nasal puede ser mediante pulverizadores nasales o supositorios (véase, por ejemplo, Sayani (1996) "Systemic delivery of peptides and proteins across absorptive mucosae" Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 13:85 184). Para la administración transdérmica, el principio activo puede formularse en pomadas, salvas, geles, o cremas como se sabe generalmente en la materia. También pueden lograrse sistemas de administración transdérmica usando parches.
- Para la administración por inhalación, la formulación farmacéutica puede administrarse en forma de un aerosol o niebla. Para la administración en aerosol, la formulación puede proporcionarse en forma finamente dividida junto con un tensioactivo y un propelente. En otra realización, el dispositivo para administrar la formulación al tejido respiratorio está en una forma en la que la formulación se vaporiza. Otros sistemas de administración conocidos en la materia incluyen aerosoles de polvo seco, sistemas de administración de líquidos, inhaladores, nebulizadores de aire a presión y sistemas propulsores (véase, por ejemplo, Patton (1998) Biotechniques 16:141 143; Dura Pharmaceuticals, San Diego, Calif.; Aradigm, Hayward, Calif.; Aerogen, Santa Clara, Calif.; e Inhale Therapeutic Systems, San Carlos, Calif.).
- Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como vinilacetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones son conocidos para los expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente a través de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células o tejidos usando anticuerpos o proteínas de la envuelta viral) también pueden usarse como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos en la materia, por ejemplo, tal como se describe en las Patentes de los Estados Unidos N° 4.235.871; 4.501.728; 4.522.811; 4.837.028; 6.110.490; 6.096.716; 5.283.185; 5.279.833; Akimaru (1995) Cytokines Mol. Ther. 1:197 210; Alving (1995) Immunol. Rev. 145: 5 31; y Szoka (1980) Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467). Las microesferas biodegradables o cápsulas u otras configuraciones de polímero biodegradable capaces de administración sostenida de moléculas pequeñas que incluyen péptidos se conocen en la materia (véase, por ejemplo, Putney (1998) Nat. Biotechnol. 16:153 157). Los compuestos de la invención pueden incorporarse en micelas (véase, por ejemplo, Suntres (1994) J. Pharm. Pharmacol. 46:23 28; Woodle (1992) Pharm. Res. 9:260 265). Los antagonistas pueden acoplarse a la superficie de la monocapa o bicapa lipídica. Por ejemplo, los antagonistas pueden acoplarse a liposomas que contienen hidrazida-PEG-(diestearoil-fosfatidil)etanolamina (véase, por ejemplo, Zalipsky (1995) Bioconj. Chem. 6: 705 708). Como alternativa, cualquier forma de membrana lipídica, tal como una membrana lipídica planar o la membrana celular de una célula intacta, por ejemplo, un glóbulo rojo, puede usarse. Las formulaciones liposomales y que contienen lípidos pueden administrarse por cualquier medio, incluyendo, por ejemplo, administración intravenosa, transdérmica (véase, por ejemplo, Vutla (1996) J. Pharm. Sci. 85:5 8), transmucosal, u oral.
- Las composiciones de la presente invención pueden combinarse con otros restos terapéuticos o restos de obtención de imágenes/diagnósticos tal como se proporcionan en el presente documento. Los restos terapéuticos y/o de obtención de imágenes pueden proporcionarse como una composición separada, o como un resto conjugado. Pueden incluirse enlazantes para restos conjugados según sea necesario y se han descrito en otra parte en el presente documento.
- Los anticuerpos divulgados en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Se preparan liposomas que contienen al anticuerpo mediante métodos conocidos en la materia, tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y las Patentes de los Estados Unidos Nos 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se divulgan en la Patente de los Estados Unidos N° 5.013.556.
- Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación en fase reversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse a los liposomas, tal como se describe en Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286 288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico (tal como doxorubicina) está opcionalmente contenido en el liposoma. Véase

Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989).

También pueden usarse lipofecciones de liposomas para administrar el anticuerpo anti-LOX, o un fragmento de anticuerpo, a las células. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpo, puede usarse el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas de péptido que retienen la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología del ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889 7893 (1993). La formulación en el presente documento también puede contener más de un principio activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, incluyendo, por ejemplo, aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Como alternativa, o además, la composición puede comprender un agente que potencia su función, tales como, por ejemplo, un agente citotóxico, citocinas, agentes quimioterapéuticos, o agentes inhibidores del crecimiento. Dichas moléculas están presentes en combinación de manera adecuada en cantidades que son eficaces para el fin previsto. Los principios activos también pueden atrapararse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco en forma coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, anteriormente citado.

Las formulaciones para administración *in vivo* son estériles. La esterilización puede lograrse fácilmente mediante filtración a través de membranas de esterilización por filtración.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación continua incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que tienen la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación continua incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol de vinilo)), polilácticas (Patente de los Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ -etilo, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-glicólico tales como LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Mientras que los polímeros tales como acetato de etileno-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un periodo largo de tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, puede lograrse la estabilización modificando restos de sulfhidrilo, **liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados, y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.**

Los expertos en la materia conocerán varias otras composiciones farmacéuticas y técnicas para su preparación y uso a la vista de la presente divulgación. Para un listado detallado de composiciones farmacológicas adecuadas y técnicas de administración asociadas se puede acudir a las enseñanzas detalladas en el presente documento, que pueden suplementarse además con textos tales como Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20^a Ed. (Lippincott, Williams & Wilkins 2003).

Las composiciones farmacéuticas contempladas por la presente invención se han descrito anteriormente. En una realización de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se formulan para estar libres de pirógenos de tal forma que son aceptables para su administración a pacientes humanos. El ensayo de composiciones farmacéuticas para pirógenos y la preparación de composiciones farmacéuticas libres de pirógenos se entienden bien para un experto habitual en la materia.

Una realización de la presente invención contempla el uso de cualquiera de las composiciones farmacéuticas de la presente invención para producir un medicamento para tratar un trastorno de la presente invención. Pueden formularse medicamentos basándose en las características físicas del paciente/sujeto que necesite tratamiento, y pueden formularse en formulaciones simples o múltiples basándose en el estado del tejido canceroso. Los medicamentos de la presente invención pueden envasarse en un envase farmacéutico adecuado con etiquetas adecuadas para la distribución a hospitales y clínicas en los que la etiqueta es para la indicación de tratar un trastorno tal como se define en el presente documento en un sujeto. Los medicamentos pueden envasarse como unidades individuales o múltiples. Pueden incluirse instrucciones para la dosificación de las composiciones farmacéuticas de la presente invención con los envases farmacéuticos y kits descritos a continuación.

VI. Purificación por afinidad

Los anticuerpos anti-LOXL2 descritos en el presente documento son útiles para la purificación por afinidad de LOXL2 a partir de un cultivo de células recombinantes, fuentes naturales o muestras de biopsias de tejidos (tejido y/o suero).

5 En este proceso, se inmovilizan los anticuerpos contra LOXL2 sobre un soporte adecuado, tal como una resina Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. Después se pone en contacto al anticuerpo inmovilizado con una muestra que contiene a la LOXL2 a purificar, y a continuación se lava el soporte con un disolvente adecuado que retire sustancialmente todo el material de la muestra a excepción de la LOXL2, que se encuentra unida al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, se lava el soporte con otro disolvente adecuado que liberará a la LOXL2 del anticuerpo.

VII. Envases y kits

15 Una realización de la presente solicitud incluye un envase farmacéutico o kit útil para los métodos proporcionados en el presente documento. Una realización de dichos envases farmacéuticos o kits incluye preparaciones (composiciones) de los antagonistas tal como se proporcionan en el presente documento.

20 Un aspecto de la presente invención se refiere a kits para llevar a cabo la administración de un inhibidor de LOXL2. Otro aspecto de la presente invención se refiere a kits para llevar a cabo la administración combinada del inhibidor de LOXL2 con otros uno o más agentes terapéuticos. En una realización, el kit comprende un inhibidor de LOXL2 formulado en un vehículo o excipiente farmacéutico, y al menos un agente terapéutico que no es dicho inhibidor de LOXL2, formulado según sea necesario, en una o más preparaciones farmacéuticas separadas.

25 Los paquetes farmacéuticos o kits pueden incluir adicionalmente un excipiente, un vehículo, un agente tamponador, un conservante o un agente estabilizante en una formulación farmacéutica. Cada componente del kit puede estar atrapado dentro de un contenedor individual y todos los contenedores individuales pueden encontrarse dentro de un solo paquete. Los kits de la invención pueden diseñarse para almacenamiento a temperatura ambiente o fría.

30 **Adicionalmente, las preparaciones pueden contener estabilizantes para aumentar la vida útil de los kits e incluyen, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA) u otros estabilizantes convencionales conocidos. En los casos las composiciones se** liofilizan, el kit puede contener preparaciones adicionales de soluciones para reconstituir las preparaciones. Las soluciones adecuadas se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, suero salino tamponado con fosfato (PBS) farmacéuticamente aceptable.

35 Adicionalmente, los paquetes farmacéuticos o kits proporcionados en el presente documento pueden además incluir cualquiera de los otros restos proporcionados en el presente documento, tales como, por ejemplo, un agente quimioterapéutico tal como se describe en otras partes en más detalle.

40 Los paquetes farmacéuticos y kits de la presente invención pueden además incluir los componentes para un ensayo proporcionado en el presente documento, tales como, por ejemplo, un ensayo ELISA. Como alternativa, las preparaciones de los kits se usan en inmunoensayos, tales como de inmunohistoquímica para ensayar secciones de biopsia de tejidos del paciente. Los paquetes farmacéuticos y kits de la presente invención pueden además incluir los componentes para la recogida de una muestra.

45 Los paquetes farmacéuticos y kits de la presente invención pueden además incluir una etiqueta especificando, por ejemplo, una descripción de producto, modo de administración e indicación del tratamiento. Los paquetes farmacéuticos proporcionados en el presente documento pueden incluir cualquiera de las composiciones tal como se han descrito en el presente documento. El paquete farmacéutico puede incluir además una etiqueta para prevenir, reducir el riesgo de, o tratar cualquiera de las indicaciones de enfermedad descritas en el presente documento.

50 La expresión "material de envasado" se refiere a una estructura física que aloja los componentes del kit. El material de envasado puede mantener a los compuestos de manera estéril, y puede producirse de un material usado comúnmente para dichos fines (por ejemplo, papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, película, ampollas, etc.). La etiqueta o prospecto puede incluir instrucciones escritas adecuadas. Los kits de la invención por lo tanto pueden incluir además etiquetas o instrucciones para usar los componentes del kit en cualquier método de la invención. Un kit puede incluir un compuesto de la invención en un paquete, o dispensador junto con instrucciones para administrar el compuesto en un método de la invención.

60 Las instrucciones pueden incluir instrucciones para la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de la invención descritos en el presente documento incluyendo métodos de tratamiento, detección, control o diagnósticos. Las instrucciones pueden incluir además indicaciones de un fin clínico satisfactorio o de cualquier síntoma adverso que pueda suceder, o información adicional requerida por agencias reguladoras, tales como la Food and Drug Administration para su uso en un sujeto humano.

65 Las instrucciones pueden estar en un "material impreso", por ejemplo, en papel o cartón en o fijado al kit, o sobre una etiqueta fijada al kit o material de envasado, o unidas a un vial o tubo que contiene un componente del kit. Las

instrucciones pueden además incluirse en un medio que pueda leerse en un ordenador, tal como un disco (disco flexible o disco duro), CD óptico, tal como un CD o un DCD ROM/RAM, cinta magnética, medio eléctrico de almacenamiento tal como una RAM o ROM, puntas 1C e híbridos de estos, tales como medios magneto-ópticos.

- 5 Las composiciones del kit de la presente invención pueden formularse en unidades simples o múltiples para bien una sola prueba o múltiples pruebas.

10 En realizaciones preferidas, las preparaciones del kit están libres de pirógenos. Los métodos para ensayar la presencia de, y/o los niveles específicos de, pirógenos son rutinarios en la técnica y hay kits comercialmente disponibles para dicho fin.

15 En el presente documento se proporciona un kit para tratar una afección asociada a LOXL2, que contiene una composición de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Una afección asociada a LOXL2 puede ser, por ejemplo, un tumor, una metástasis, angiogénesis, o fibrosis. En una realización, los anticuerpos en dichos kits pueden comprender un marcador detectable, un marcador terapéutico o ambos. En otra realización, los anticuerpos en dichos kits pueden estar liofilizados.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a kits para llevar a cabo la administración combinada del inhibidor de LOXL2 con otros compuestos terapéuticos. En una realización, el kit comprende un inhibidor de LOXL2 formulado en un vehículo farmacéutico, y al menos un agente citotóxico, formulado según sea necesario, en una o más preparaciones farmacéuticas separadas.

25 VIII. Métodos diagnósticos

La presente invención también proporciona métodos para diagnosticar, controlar, estadificar o detectar las enfermedades descritas anteriormente usando agentes que reconocen diferentes formas de LOXL2. Por ejemplo, tal como se describe anteriormente, pueden usarse anticuerpos contra diferentes formas de LOXL2, la preproteína, la forma secretada, madura o activa, para estos fines. Los métodos para diagnosticar, controlar, estadificar o detectar las enfermedades descritas anteriormente usando agentes que reconocen diferentes formas de LOXL2 se pretende que abarquen todas las enfermedades e indicaciones descritas en el presente documento.

35 Tal como se ha descrito anteriormente, LOXL2 activa se escinde y puede detectarse por virtud de su cambio en peso molecular (inmunotransferencia) o usando anticuerpos que detectan la forma no escindida frente a la escindida de LOXL2 junto con la localización celular o usando varios métodos de detección, tales como inmunohistoquímica (IHC).

40 Se cree que la matriz extracelular y el medio condicionado deben contener LOXL2 procesado proteolíticamente activa mientras que LOXL2 no escindida inactiva debe localizarse intracelularmente. También puede detectarse parte de LOXL2 dentro de la célula como consecuencia de la captación desde el espacio extracelular.

45 Pueden recogerse y analizarse muestras de individuos determinando los niveles de LOX activa o inactiva. Este análisis puede efectuarse antes de iniciar el tratamiento usando terapia específica para lisil oxidasa o para identificar tumores que tienen expresión o actividad elevada de LOXL2. Dichos ensayos diagnósticos pueden llevarse a cabo usando cualquier muestra, incluyendo, pero sin limitación, células, extractos de proteínas o membranas de células, fluidos biológicos, tales como esputo, sangre, suero, plasma, u orina, o muestras biológicas, tales como muestras de tejido, secciones de tejido fijadas en formalina o congeladas.

50 Puede emplearse cualquier método adecuado para la detección y análisis de LOXL2 activa y/o inactiva. Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra" se refiere a una muestra de un ser humano, animal, o a una muestra de investigación, por ejemplo, una célula, tejido, órgano, fluido, gas, aerosol, lechada, coloide, o material coagulado. Las muestras también incluyen, pero sin limitación, extractos de proteínas o membranas de células, fluidos biológicos, tales como esputo, sangre, suero, plasma, u orina, o muestras biológicas, tales como secciones de tejido fijadas en formalina o congeladas empleando anticuerpos descritos en el presente documento. El término "muestra" también se refiere a una célula, tejido, órgano, o fluido que esté recién recogido de un ser humano o animal, o a una célula, tejido, órgano, o fluido que está procesado o almacenado. La muestra puede ensayarse *in vivo*, por ejemplo, sin retirada del ser humano o animal, o puede ensayarse *in vitro*. La muestra puede ensayarse después del procesamiento, por ejemplo, mediante métodos histológicos.

60 Pueden usarse varias técnicas de ensayo diagnóstico conocidas en la materia, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos en sándwich directos o indirectos y ensayos de inmunoprecipitación llevados a cabo en fases bien homogéneas o heterogéneas (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) págs. 147-158). Los anticuerpos usados en los ensayos diagnósticos pueden estar marcados con un resto detectable. El resto detectable produce directa o indirectamente una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser cualquiera de aquellos descritos en el presente documento tales como, por ejemplo, un radioisótopo, tal como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, o ¹²⁵I, un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como

isotiocianato de fluoresceína (FITC), rojo Texas, cianina, fotocianina, rodamina, o luciferina, o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Puede emplearse cualquier método conocido en la materia para conjugar el anticuerpo al resto detectable, incluyendo aquellos métodos descritos por Hunter et al., Nature, 144:945 (1962); David et al., Biochemistry, 13:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40:219 (1981); y Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407 (1982).

En el presente documento se proporciona un método para diagnosticar una afección asociada con LOX o LOXL2 que comprende determinar un nivel de LOXL2 en una muestra de un sujeto, en el que un cambio en el nivel de LOXL2 en la muestra en comparación con una muestra de referencia indica la presencia o aumento de un tumor o metástasis. En un aspecto, la afección asociada con LOXL2 es un tumor, una metástasis, angiogénesis, o fibrosis. Un aumento en los niveles de LOXL2 en la muestra en comparación con una muestra de referencia puede indicar la presencia de un tumor o metástasis o un aumento en el crecimiento metastásico. La muestra de referencia puede ser una muestra tomada del sujeto en un punto temporal anterior o una muestra de otro individuo. El nivel de los niveles de LOXL2 en la muestra puede detectarse poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está marcado de manera detectable.

En una realización, se proporciona un método para diagnosticar la metástasis de un cáncer en un sujeto, que comprende: determinar los niveles de LOXL2 activa o la actividad en la sangre, mediante el cual un cambio en los niveles o actividad de LOXL2 activa (por ejemplo, en la expresión génica, actividad enzimática, etc.) en la sangre en comparación con una muestra de referencia, indica la presencia de crecimiento de tumor metastásico. En algunos casos, los niveles o actividades de LOXL2 activa en la sangre pueden ser menores que aquellos medidos con anterioridad, lo que puede indicar que el sujeto está en mayor riesgo de metástasis del cáncer; que el cáncer ha metastatizado; o que la metástasis del cáncer ha aumentado. La muestra de referencia puede derivarse del mismo sujeto, tomada del mismo tumor en un momento distinto o de otra parte del cuerpo, o de otro individuo.

En otra realización, se proporciona un método para diagnosticar la metástasis de un cáncer en un sujeto que tiene un tumor, que comprende: determinar los niveles de LOXL2 activa o la actividad en el tumor, mediante el cual un cambio en los niveles o actividad de LOXL2 activa en el tumor en comparación con una muestra de referencia indica la presencia de crecimiento de tumor metastásico. En algunos casos, los niveles de LOXL2 activa en el tumor pueden ser mayores que aquellos medidos con anterioridad, lo que puede indicar que el sujeto está en mayor riesgo de metástasis del cáncer; que el cáncer ha metastatizado; o que la metástasis del cáncer ha aumentado. La muestra de referencia puede derivarse del mismo sujeto, tomada del mismo tumor en un momento distinto o de otra parte del cuerpo, o de otro individuo.

También se proporciona en el presente documento un método para estadificar el crecimiento tumoral o metástasis en un sujeto, que comprende determinar niveles de LOXL2 (por ejemplo, hLOXL2) en un tumor del sujeto, mediante el cual un cambio en el nivel de LOXL2 (por ejemplo, en la expresión génica o actividad enzimática) en el tumor en comparación con una muestra de referencia, indica la presencia de crecimiento de tumor metastásico. En algunos casos, los niveles o actividades de LOXL2 en el tumor pueden ser mayores que aquellos medidos anteriormente para el mismo sujeto, o mayores que aquellos en una muestra de referencia tomada de un tejido normal, que puede indicar que el paciente tiene un riesgo mayor de metástasis tumoral; que el tumor ha metastatizado; o que la metástasis del tumor ha aumentado.

Se conoce bien la estadificación de cánceres de tumores sólidos. El sistema TNM es uno de los sistemas de estadificación usados de manera más común. Este sistema se ha aceptado por la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC) y el American Joint Committee on Cancer (AJCC). La mayoría de los centros médicos usan el sistema TNM como principal método para la emisión de informes referentes al cáncer. PDQ®, la base de datos integral acerca del cáncer del NCI, también usa el sistema TNM. El sistema TNM, citado en el presente documento como "estadificación", se basa en el alcance del tumor, el alcance de la expansión hasta los nódulos linfáticos, y en la presencia de metástasis.

También se proporciona en el presente documento un método para controlar la respuesta de un sujeto a la terapia que incluye un modulador de LOXL2 como tratamiento para el cáncer, tumores, y enfermedades fibróticas. El método comprende detectar un cambio en el nivel de una proteína C-reactiva en el sujeto después de la administración de un modulador de LOXL2 al **sujeto, en el que el cambio indica que el modulador de LOX o de LOXL2 tiene un efecto terapéutico en el sujeto**. Una proteína C-reactiva es un marcador farmacodinámico importante para la inflamación sistémica. Se cree que un nivel reducido de proteína C-reactiva (por ejemplo, en la muestra de sangre del sujeto) en comparación con aquel antes de la administración del inhibidor de LOXL2 es indicativo de la respuesta del sujeto a la terapia usando un inhibidor de LOXL2.

La medida de los niveles de LOXL2 activa puede tomar la forma de un ensayo inmunológico, que detecta la presencia de una proteína LOXL2 activa con un anticuerpo para la proteína, preferentemente un anticuerpo que se une específicamente a LOXL2 activa. También pueden usarse fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos anti LOXL2.

Los inmunoensayos también pueden usarse en conjunción con fluorescencia inducida por láser (véase, por ejemplo, Schmalzing y Nashabeh, *Electrophoresis* 18:2184-93 (1997); y Bao, J. *Chromatogr. B. Biomed. Sci.* 699:463-80 (1997). Los inmunoensayos con liposomas, tales como inmunoensayos de inyección de flujo de liposomas e inmunosensores de liposomas también pueden usarse para determinar los niveles de LOX o LOXL activa de acuerdo con un método de la invención (Rongen et al., *J. Immunol. Methods* 204:105-133 (1997). Los inmunoensayos, tales como ensayos inmunoabsorbentes acoplados a enzimas (ELISA), pueden ser particularmente útiles en un método de la invención. También puede usarse un radioinmunoensayo para determinar si una muestra es positiva para LOXL2 activa o para determinar el nivel de LOXL2 activa. Puede usarse, por ejemplo, un radioinmunoensayo que usa, por ejemplo, un anticuerpo secundario marcado con yodo-125.

Además, se puede medir la actividad de LOXL2 activa, de este modo ignorando la cantidad de enzima inactiva. La actividad enzimática de LOXL2 activa puede medirse de diversos modos, usando una elastina soluble o colágeno soluble con lisina marcada como sustrato. Los detalles de un ensayo de actividad se proporcionan en Royce et al., "Copper metabolism in mottled mouse mutants. The effect of copper therapy on lysyl oxidase activity in brindled (Mobr) mice," *Biochem J.* 1982 February 15; 202(2): 369-371. Un ensayo ilustrativo es un ensayo cromogénico, tal como el descrito por Palamakumbura, et al. "A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples," *Anal Biochem.* 15 de enero de 2002; 300(2):245-51.

Además de medir el nivel de LOXL2 en sangre (u orina), se pueden medir productos secundarios de la actividad de LOXL2. Por ejemplo, se forma desoxipiridinolina (Dpd) mediante la acción enzimática de la lisil oxidasa en restos de lisina. Dpd se libera a la circulación como resultado de la degradación osteoclástica del hueso. No puede reutilizarse, se elimina por el riñón y se excreta sin cambios en la orina. Por lo tanto, puede usarse un ensayo basado en el ensayo de Dpd Gamma BCT de Immunodiagnostic Systems (IDS), usando un RIA en tubo recubierto usando un anticuerpo monoclonal anti-Dpd para medir la actividad enzimática.

También pueden usarse anticuerpos anti-LOXL2 descritos en el presente documento en el diagnóstico de enfermedades o afecciones asociadas con el metabolismo aberrante del colágeno, tales como varias afecciones fibróticas, por ejemplo, fibrosis pulmonar, así como en la retinopatía vítrea proliferativa, cicatrices quirúrgicas, esclerosis sistémica, escleroderma, contracción de heridas, cicatrices hipertróficas, fibromatosis (especialmente enfermedad de Dupuytren), y queloides.

IX. Métodos terapéuticos

Las formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden usarse para tratar una amplia variedad de enfermedades y trastornos tales como, por ejemplo, cáncer, metástasis, fibrosis y angiogénesis aberrante.

En el presente documento se proporciona un método par inhibir a LOXL2 poniendo en contacto una muestra o un cultivo tisular con cualquiera de los anticuerpos anti-LOXL2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento. La unión de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a LOXL2 inhibe la acción enzimática de LOXL2.

En cualquiera de dichos métodos, el contacto puede suceder *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

La inhibición de LOXL2 puede tener uno o más efectos en un sujeto, tales como, por ejemplo, la reducción del crecimiento tumoral, la reducción de la angiogénesis, la reducción de una enfermedad fibrótica, y/o la disminución de la formación de matriz extracelular. Las enfermedades fibróticas incluyen, pero sin limitación a fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis cardíaca, y escleroderma.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos de LOXL2 para su uso en métodos de tratamiento de enfermedades y trastornos con expresión aberrante de LOXL2. Las enfermedades y trastornos incluyen, pero sin limitación a tumores (por ejemplo, primarios o metastásicos), afecciones relacionadas con la angiogénesis y afecciones fibróticas.

Tal como se usa en el presente documento, "prevención" se refiere a la profilaxis, prevención de la aparición de síntomas, prevención de la progresión de una enfermedad o trastorno asociado con la fibrosis o correlacionada con la actividad de LOXL2. Tal como se usa en el presente documento, "tratar" o "tratamiento" significa la estasis o aplazamiento del desarrollo de los síntomas asociados con una enfermedad o trastorno descrito en el presente documento. El término incluye además mejorar síntomas no controlados o no deseados existentes, evitar síntomas adicionales, y mejorar o prevenir las causas metabólicas subyacentes de los síntomas. Por lo tanto, los términos indican que se ha conferido un resultado beneficioso a un sujeto mamífero con una enfermedad o síntoma, o con el potencial para desarrollar dicha enfermedad o síntoma. Se logra una respuesta cuando el paciente experimenta un alivio parcial o total, o una reducción de signos o síntomas de enfermedad, e incluye específicamente, sin limitación, la prolongación de la supervivencia. Los tiempos de supervivencia libres de progresión pueden medirse en desde meses hasta años, dependiendo de factores pronósticos incluyendo el número de recaídas, etapa de la enfermedad, y otros factores. La prolongación de la supervivencia incluye, sin limitación, tiempos de al menos un 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. También puede medirse la supervivencia general en desde meses hasta años. Los síntomas del paciente pueden permanecer estáticos o pueden disminuir.

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran en cantidades terapéuticamente eficaces que son efectivas para producir algún efecto terapéutico deseado con una relación beneficio/riesgo razonable para cualquier tratamiento médico. Para la administración de las presentes composiciones farmacéuticas a pacientes
10 humanos, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse mediante metodologías conocidas para un experto en la materia para que estén sustancialmente libres de pirógenos de tal forma que no induzcan una respuesta inflamatoria.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico que cuando se administra sola o en combinación con otro agente
15 terapéutico a una célula, tejido, o sujeto es eficaz para prevenir o mejorar el estado de enfermedad o la progresión de la enfermedad. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere además a aquella cantidad del compuesto suficiente para dar como resultado una mejora de los síntomas, por ejemplo, tratamiento, curación, prevención o mejora de la afección médica relevante, o un aumento en la velocidad del tratamiento, curación, prevención o mejora de dichas afecciones. Cuando se aplica a un principio activo individual administrado solo, una dosis terapéuticamente eficaz se
20 refiera a aquel ingrediente solo. 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, cuando se administran en combinación, en serie o simultáneamente. Por ejemplo, cuando se emplea administración *in vivo* de un anticuerpo anti-LOXL2, las cantidades de dosificación normales pueden variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal del mamífero o más por día, preferentemente aproximadamente 1 µg/kg hasta
25 50 mg/kg día, opcionalmente aproximadamente 100 µg/kg hasta 20 mg/kg día, 500 µg/kg/día hasta 10 mg/kg/día, o de 1 mg/kg/día hasta 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración.

Se logra una respuesta eficaz de la presente invención cuando el paciente experimenta un alivio total o parcial o una reducción de los signos o síntomas de enfermedad, e incluye específicamente, sin limitación, la prolongación de la
30 supervivencia. Los tiempos de supervivencia libres de progresión pueden medirse en desde meses hasta años, dependiendo de factores pronósticos incluyendo el número de recaídas, etapa de la enfermedad, y otros factores. La prolongación de la supervivencia incluye, sin limitación, tiempos de al menos un 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,
35 o más. También se mide la supervivencia general en desde meses hasta años. Los síntomas del paciente pueden permanecer estáticos, y la carga tumoral puede no aumentar.

Un médico o veterinario experto en la materia puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz (DE₅₀) de la composición farmacéutica necesaria. Por ejemplo, el médico o veterinario puede comenzar con dosis de los
40 compuestos de la invención en la composición farmacéutica a niveles menores de los necesarios para lograr el efecto terapéutico deseado y gradualmente aumentar la dosis hasta que se logre el efecto deseado.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" significa sujetos mamíferos. Los sujetos ilustrativos incluyen, pero sin limitación a seres humanos, monos, perros, gatos, ratones, ratas, vacas, caballos, cabras y ovejas.
45 En algunas realizaciones, el sujeto tiene cáncer y puede tratarse con el agente de la presente invención tal como se describe más adelante.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que se usan en una forma hidratada de manera adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención se
50 formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables tal como se describen más adelante o mediante otros métodos convencionales conocidos para aquellos expertos en la materia.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que se modifica para lograr la respuesta terapéutica
55 deseada para un paciente particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente.

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de varios factores incluyendo la actividad del compuesto particular de la presente invención empleado, de la vía de administración, del tiempo de administración, de la velocidad de excreción del compuesto particular que se esté empleando, de la duración del tratamiento, otros fármacos,
60 compuestos y/o materiales usados en combinación con la composición particular empleada, la edad, sexo, peso, afección, salud general e historial médico previo del paciente que se esté tratando, y factores similares bien conocidos en la práctica médica.

En un aspecto proporcionado en el presente documento, la administración de los anticuerpos da como resultado una mejora en el estado del paciente. En otro aspecto, la administración de los anticuerpos previene el empeoramiento
65 de la afección del sujeto y/o prolonga la supervivencia del paciente.

El paciente puede ser un mamífero, tal como un ser humano o un no humano. Dicho paciente puede ser sintomático o asintomático.

5 Las composiciones pueden administrarse localmente, regional o sistémicamente mediante cualquier vía adecuada proporcionada en el presente documento.

10 En un aspecto, los síntomas del paciente se mejoran. La mejora puede manifestarse como, por ejemplo, una reducción del dolor, tamaño del tumor reducido, eliminación de tumores, prevención de aumentos en el tamaño tumoral o progresión de la enfermedad, prevención de la formación de metástasis, o la inhibición del crecimiento metastásico, inhibición de la fibrosis, inhibición de la angiogénesis, o una combinación de los mismos.

15 Si se necesita, para los tratamientos para el cáncer, los métodos también pueden incluir la extirpación quirúrgica del cáncer y/o la administración de un agente o tratamiento anticáncer. La administración de dicho agente o tratamiento anticáncer puede ser concurrente con la administración de las composiciones divulgadas en el presente documento. Los agentes anticáncer se han proporcionado en otras partes del presente documento.

20 En un aspecto, la administración de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento reduce o elimina la necesidad de que el paciente se someta a cirugía o tratamiento con uno o más agentes o tratamientos anticáncer.

25 Las indicaciones que pueden tratarse usando las formulaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen aquellas que implican una proliferación celular no deseada o descontrolada. Dichas indicaciones incluyen tumores benignos, varios tipos de cánceres, tales como tumores primarios y tumores metastásicos, restenosis (por ejemplo, coronaria, carotídea, y lesiones cerebrales), trastornos hematológicos, estimulación anormal de células endoteliales (ateroesclerosis), lesiones en tejidos corporales debidos a cirugía, curación anormal de heridas, angiogénesis anormal, enfermedades que producen fibrosis de tejidos, degeneración macular, glaucoma; degeneración macular asociada a la edad (AMD húmeda y AMD seca), aterosclerosis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, escleroderma, aterosclerosis, y enfermedad de Alzheimer, trastornos motores repetitivos, trastornos de tejidos que no están elevadamente vascularizados, y respuestas proliferativas asociadas a trasplantes de órganos.

35 La fibrosis hepática incluye, pero sin limitación, cirrosis, y afecciones asociadas tales como hepatitis viral crónica, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis alcohólica (ASH), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis biliar primaria (PBC), cirrosis biliar, y hepatitis autoinmune.

40 La fibrosis pulmonar incluye, pero sin limitación, fibrosis pulmonar idiopática (IPF) o alveolitis fibrosante criptogénica, neumonía intersticial fibrosante crónica, enfermedad pulmonar intersticial (ILD), enfermedad pulmonar parenquimal difusa (DPLD), enfisema y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), y asma crónica.

45 La fibrosis cardíaca incluye, pero sin limitación, insuficiencia cardíaca congestiva, cardiomiopatía, y defectos en la función cardíaca después de infarto de miocardio.

La fibrosis renal incluye, pero sin limitación, nefropatía diabética, reflujo vesiculoureteral, fibrosis renal tubulointersticial; glomerulonefritis o nefritis glomerular, incluyendo glomeruloesclerosis segmental focal y glomerulonefritis membranosa, y nefritis glomerular mesangiocapilar.

50 En general, las células en un tumor benigno mantienen sus características diferenciadas y no se dividen de una manera completamente incontrolada. Un tumor benigno está normalmente localizado y no es metastásico. Los tipos específicos de tumores benignos que pueden tratarse usando la presente invención incluyen 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, granulomas pirogénicos, lunares, fibroides uterinos, adenomas tiroideos, adenomas adrenocorticales, y adenomas pituitarios.

55 En un tumor maligno las células se hacen indiferenciadas, no responden a las señales de control del crecimiento del organismo, y se multiplican de manera incontrolada. El tumor maligno es invasivo y capaz de extenderse a sitios distantes (metastatizar). Los tumores malignos se dividen generalmente en dos categorías: primarios y secundarios. 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 otra parte del cuerpo que se ha extendido a un órgano distante. Las vías comunes de la metástasis son el crecimiento directo en estructuras adyacentes, dispersión a través de los sistemas vascular y linfático, y el seguimiento a lo largo de los planos tisulares y espacios corporales (fluido peritoneal, fluido cefalorraquídeo, etc.).

65 Los tipos específicos de cánceres o tumores malignos, ya sean primarios o secundarios, que pueden tratarse usando esta invención incluyen, pero sin limitación, cáncer de pulmón (incluyendo adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, carcinoma bronquioalveolar, carcinoma no

microcítico, carcinoma microcítico, mesotelioma), cáncer de mama (incluyendo carcinoma ductal, carcinoma lobular, cáncer inflamatorio de mama, carcinoma de células claras, carcinoma mucinoso); cáncer colorrectal (cáncer de colon, cáncer rectal); cáncer anal; cáncer pancreático (incluyendo adenocarcinoma pancreático, carcinoma de células de islote, tumores neuroendocrinos); cáncer de próstata; carcinoma de ovarios (carcinoma epitelial ovárico o tumor epitelial-estromal superficial incluyendo tumor grave, tumor endometroide y cistadenocarcinoma mucinoso, tumor estromal de los cordones sexuales); carcinoma hepático y del conducto biliar (incluyendo carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, hemangioma); carcinoma esofágico (incluyendo adenocarcinoma esofágico y carcinoma de células escamosas); linfoma no de Hodgkin; carcinoma de vejiga; carcinoma del útero (incluyendo adenocarcinoma endometrial, carcinoma seroso papilar uterino, carcinoma uterino de células claras, sarcomas uterinos y leiomiomas, tumores mullerianos mixtos); glioma, glioblastoma, meduloblastoma, y otros tumores del cerebro; cánceres de riñón (incluyendo carcinoma de células renales, carcinoma de células claras, tumor de Wilm); cáncer de la cabeza y cuello (incluyendo carcinomas de células escamosas); cáncer de estómago (adenocarcinoma de estómago, tumor estromal gastrointestinal); mieloma múltiple; cáncer testicular; tumor de células germinales; tumor neuroendocrino; cáncer de cuello de útero; carcinoides del tracto gastrointestinal, mama, y otros órganos; carcinoma de células en anillo de sello; tumores mesenquimales incluyendo sarcomas, fibrosarcomas, hemangioma, angiomas, hemangiopericitoma, hiperplasia estromal pseudoangiomas, miofibroblastoma, fibromatosis, tumor miofibroblástico inflamatorio, lipoma, angiolioma, tumor de células granulares, neurofibroma, schwannoma, angiosarcoma, liposarcoma, rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, leiomioma o un leiomiomasarcoma.

El término "metástasis" significa la capacidad de las células tumorales para invadir tejidos hospedadores y metastatizar a sitios de órganos distantes, a menudo específicos. Como es sabido, esta es la característica destacada de los crecimientos tumorales letales. La formación de metástasis sucede a través de una serie compleja de interacciones únicas entre células tumorales y tejidos y células hospedadoras normales. En el contexto de la presente invención, la actividad de la lisil oxidasa es crítica en el crecimiento metastásico de tumores, es decir, el crecimiento de las metástasis, particularmente en condiciones de hipoxia. Ya que los tumores hipóxicos son los más agresivos y resistentes a la quimioterapia tradicional, los agentes que modulan la expresión y/o función de la lisil oxidasa proporcionan una nueva terapia contra tumores metastásicos, particularmente tumores quimiorresistentes. La "metástasis" se distingue de la invasión. Tal como se describe en "Understanding Cancer Series: Cancer", en el sitio *web*: cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/cancer; la invasión se refiere a la migración y penetración directa de las células cancerosas en los tejidos vecinos.

Los trastornos hematológicos incluyen crecimiento anormal de células sanguíneas que puede dar lugar a cambios displásicos en las células sanguíneas y a neoplasias malignas hematológicas, tales como varias leucemias. Los ejemplos de trastornos hematológicos incluyen, pero sin limitación, leucemia mieloide aguda, leucemia promielótica aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena crónica, los síndromes mielodisplásicos, y la anemia de células falciformes.

La leucemia mieloide aguda (AML) es el tipo más común de leucemia aguda que sucede en adultos. Varios trastornos genéticos hereditarios y estados de inmunodeficiencia se asocian con un riesgo aumentado de AML. Estos incluyen trastornos con defectos en la estabilidad del ADN, que dan lugar a la rotura cromosómica al azar, tal como el síndrome de Bloom, la anemia de Fanconi, linajes Li-Fraumeni, ataxia-telangiectasia, y amaglobulinemia asociada a X.

La leucemia promielótica aguda (APML) representa un subgrupo distinto de AML. Este subtipo está caracterizado por blastos promielóticos que contienen la traslocación cromosomal 15:17. Esta traslocación conduce a la generación del transcrito de fusión compuesto del receptor de ácido retinoico y una secuencia PML.

La leucemia linfoblástica aguda (ALL) es una enfermedad heterogénea con distintas características clínicas mostradas por varios subtipos. Se han demostrado anomalías citogenéticas recurrentes en la ALL. La anomalía citogenética más común es la traslocación 9:22. El cromosoma Philadelphia resultante representa un mal pronóstico para el paciente.

La leucemia mielógena crónica (CML) es un trastorno mieloproliferativo clonal de una célula madre pluripotente. La CML está caracterizada por una anomalía cromosómica específica que implica la traslocación de los cromosomas 9 y 22, creando el cromosoma Philadelphia. La radiación ionizante está asociada con el desarrollo de la CML.

Los síndromes mielodisplásicos (MDS) son trastornos heterogéneos de células madre hematopoyéticas clonales agrupadas juntas debido a la presencia de cambios displásicos en uno o más de los linajes hematopoyéticos incluyendo cambios displásicos en las series mieloides, eritroides, y megacariocíticas. Estos cambios dan como resultado citopenias en uno o más de los tres linajes. Los pacientes afectados de MDS desarrollan normalmente complicaciones relacionadas con la anemia, neutropenia (infecciones), o trombocitopenia (sangrado). En general, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 70 % de los pacientes con MDS desarrollan leucemia aguda.

Se ha descubierto que la administración de inhibidores de LOX2 reduce el tamaño de los tumores existentes, para prevenir metástasis, y para reducir el tamaño (o incluso eliminar) metástasis existentes (véase, por ejemplo, Molnar et al. (2003) *Biochim Biophys. Acta.* 1647:220-224).

En el presente documento se proporciona un método para reducir el crecimiento tumoral en un sujeto, administrando cualquiera de los anticuerpos anti-LOX o anti-LOXL2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento. En una realización, un tumor es un tumor primario. En otra realización, un tumor es un tumor metastásico. La carga de tumor metastásico de un sujeto puede estabilizarse administrando anticuerpos tal como se describen en el presente documento. El tumor en un sujeto puede reducirse en al menos un 10%, 25 %, 50 %, 70 %, 90 %, 95 %, o más en comparación con el tumor en el sujeto antes del tratamiento.

Cuando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a LOXL2, los ejemplos de tumores incluyen, pero sin limitación, un tumor de colon, un tumor esofágico, un tumor de mama, un tumor de próstata, un carcinoma escamoso o un carcinoma de células fusiformes.

Cuando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a LOX, los ejemplos de tumores incluyen, pero sin limitación, un tumor de mama, un tumor de pulmón, un tumor de riñón, un tumor uterino, un tumor hepático, o un tumor de cabeza y cuello.

En el presente documento se proporciona un método para prevenir o reducir el crecimiento tumoral, el crecimiento de tumor metastásico, en un sujeto *in vivo*, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un inhibidor de la actividad de LOX o LOXL2; y opcionalmente, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, de este modo previniendo o reduciendo el crecimiento tumoral, por ejemplo, en al menos un 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, o 95 %, en el sujeto tratado. Se proporciona anteriormente una descripción detallada de composiciones adecuadas para su uso en los presentes métodos de tratamiento. Dichos métodos son útiles, por ejemplo, cuando el tumor es hipóxico. Los tumores hipóxicos pueden identificarse fácilmente usando métodos rutinarios en la materia. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.674.693.

También, se proporciona en el presente documento un método para tratar metástasis en un sujeto con cáncer *in vivo*, que comprende administrara a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un inhibidor de LOXL2, de este modo inhibiendo la metástasis, por ejemplo, en al menos un 25%, 50%, 75%, 90%, o 95%, en el sujeto tratado. En una realización, los inhibidores inhiben específicamente a LOXL2 humana. Los anticuerpos a usar en estos métodos se han descrito anteriormente. El anticuerpo puede ser deseable para minimizar las reacciones cruzadas con otros miembros de las familias de LOXL2 y, por lo tanto, reducir los potenciales efectos adversos debidos a complicaciones y a toxicidad tisular normal.

También se proporciona en el presente documento un método para aumentar o potenciar las probabilidades de supervivencia de un sujeto con un tumor metastásico, que comprende administrar al un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-LOXL2, de este modo aumentando o potenciando las probabilidades de supervivencia del sujeto tratado durante un periodo determinado de tiempo, por ejemplo, durante 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, 10 años, o más. El aumento en la supervivencia de un sujeto puede definirse, por ejemplo, como el aumento en la supervivencia de un modelo animal preclínico de cáncer metastásico (por ejemplo, un ratón con cáncer metastásico), durante un determinado periodo de tiempo, por ejemplo, durante al menos 10 días, 1 mes, 3 meses, 6 meses, o 1 año, o al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, o 10 veces más que un modelo de animal de control (que tiene el mismo tipo de cáncer metastásico) sin el tratamiento con el método de la invención. Como alternativa, el aumento en la supervivencia de un mamífero también puede definirse, por ejemplo, como el aumento en la supervivencia de un paciente con cáncer metastásico durante un determinado periodo de tiempo, por ejemplo, durante 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, 10 años o más que un paciente con el mismo tipo de cáncer metastásico pero sin el tratamiento con el método de la invención. El paciente de control puede tomar placebo o tratarse con cuidado estándar de soporte, tal como quimioterapia, agentes biológicos y/o radiación que no incluye el método de la invención como parte de la terapia.

También se proporciona en el presente documento un método para estabilizar la carga de tumor metastásico en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-LOX o un anticuerpo anti-LOXL2, estabilizando de este modo la carga de tumor metastásico de un sujeto durante un determinado periodo de tiempo, por ejemplo, durante 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, 10 años o más. La estabilización de la carga tumoral metastásica de un sujeto puede definirse como la estabilización de la carga tumoral metastásica de un modelo animal preclínico con carga tumoral metastásica (por ejemplo, un ratón con tumor metastásico) durante un determinado periodo de tiempo, por ejemplo, durante al menos 10 días, 1 mes, 3 meses, 6 meses, o 1 año más que un modelo de animal de control (que tiene el mismo tipo de tumor metastásico) sin el tratamiento con el método de la invención.

Los presentes métodos de tratamiento también incluyen un método para aumentar la eficacia de agentes quimioterapéuticos, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-LOXL2; y opcionalmente, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, de este modo aumentando la eficacia de los agentes quimioterapéuticos (que se describen en más detalle anteriormente). También se contemplan métodos que implican la administración de formulaciones inhibidoras de LOX en combinación con radioterapia. La radioterapia puede usarse para tratar prácticamente todos los tipos de tumores sólidos, incluyendo cánceres del cerebro, mama, cuello de útero, laringe, pulmón, páncreas, próstata, piel, columna, estómago, útero, o sarcomas de

tejidos blandos. La radiación también puede usarse para tratar leucemias y linfomas (cánceres de las células formadoras de la sangre y sistema linfático, respectivamente). La dosis de radiación para cada sitio depende de varios factores, incluyendo el tipo de cáncer y de si hay tejidos y órganos cercanos que puedan verse dañados por la radiación. La radiación se administrará generalmente como rayos X, donde la dosificación depende del tejido que se
 5 esté tratando. Los agentes radiofarmacéuticos, también conocidos como radionucleótidos, también pueden usarse para tratar el cáncer, incluyendo el cáncer de tiroides, cáncer recurrente en la pared torácica, y el dolor causado por la dispersión del cáncer al hueso (metástasis ósea). Los radionúclidos se han descrito en más detalle anteriormente.

El sujeto a tratar o diagnosticar mediante los presentes métodos incluye un sujeto que tiene o está en riesgo de tener
 10 un crecimiento tumoral metastásico. En un aspecto, un tumor es, por ejemplo, cáncer de pulmón (incluyendo adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, carcinoma bronquioalveolar, carcinoma no microcítico, carcinoma microcítico, mesotelioma), cáncer de mama (incluyendo carcinoma ductal, carcinoma lobular, cáncer inflamatorio de mama, carcinoma de células claras, carcinoma mucinoso); cáncer colorrectal (cáncer de colon, cáncer rectal); cáncer anal; cáncer pancreático (incluyendo adenocarcinoma pancreático, carcinoma de células de islote, tumores neuroendocrinos); cáncer de próstata;
 15 carcinoma de ovarios (carcinoma epitelial ovárico o tumor epitelial-estromal superficial incluyendo tumor grave, tumor endometroide y cistadenocarcinoma mucinoso, tumor estromal de los cordones sexuales); carcinoma hepático y del conducto biliar (incluyendo carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, hemangioma); carcinoma esofágico (incluyendo adenocarcinoma esofágico y carcinoma de células escamosas); linfoma no de Hodgkin; carcinoma de vejiga; carcinoma del útero (incluyendo adenocarcinoma endometrial, carcinoma seroso papilar uterino, carcinoma uterino de células claras, sarcomas uterinos y leiomiomas, tumores mullerianos mixtos); glioma, glioblastoma, meduloblastoma, y otros tumores del cerebro; cánceres de riñón (incluyendo carcinoma de células renales, carcinoma de células claras, tumor de Wilm); cáncer de la cabeza y cuello (incluyendo carcinomas de células escamosas); cáncer de estómago (adenocarcinoma de estómago, tumor estromal gastrointestinal); mieloma múltiple;
 20 cáncer testicular; tumor de células germinales; tumor neuroendocrino; cáncer de cuello de útero; carcinoides del tracto gastrointestinal, mama, y otros órganos; carcinoma de células en anillo de sello; tumores mesenquimales incluyendo sarcomas, fibrosarcomas, hemangioma, angiomas, hemangiopericitoma, hiperplasia estromal pseudoangiomatosa, miofibroblastoma, fibromatosis, tumor miofibroblástico inflamatorio, lipoma, angioliopoma, tumor de células granulares, neurofibroma, schwannoma, angiosarcoma, liposarcoma, rabdiomiosarcoma, osteosarcoma, leiomioma o un leiomiomasarcoma. En una realización no limitante, el tumor es un tumor de mama, un tumor pancreático, un tumor de pulmón, un tumor de cuello de útero, un tumor de colon o un tumor de cabeza y cuello.

La presente invención también proporciona anticuerpos de LOXL2 para su uso en un método para prevenir o reducir
 35 el riesgo de una metástasis tumoral en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-LOXL2; y opcionalmente, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, de este modo previniendo o reduciendo el riesgo de metástasis tumoral. El inhibidor puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El sujeto que necesita dicho profiláctico puede ser un individuo que está predispuesto genéticamente al cáncer o que esté en alto riesgo de desarrollar un cáncer debido a varias razones, tales como antecedentes familiares de cáncer y un ambiente carcinógeno.

Los ejemplos del gen humano que está implicado en la aparición o desarrollo del cáncer incluyen, pero sin limitación,
 40 VHL (el gen de Von Hippo Landau implicado en el carcinoma de células renales); P16/INK4A (implicado en linfoma); E-cadherina (implicado en la metástasis del cáncer de mama, tiroides, gástrico); hMLH1 (implicado en la reparación de ADN en el cáncer de colon, gástrico y endometrial); BRCA1 (implicado en la reparación de ADN en cáncer de mama y ovarios); LKB1 (implicado en el cáncer de colon y mama); P15/INK4B (implicado en leucemia, tal como AML y ALL); ER (receptor de estrógenos, implicado en cáncer de mama, colon y leucemia); O6-MGMT (implicado en la reparación de ADN en el cáncer cerebral, de colon, pulmón y linfoma); GST-pi (implicado en cáncer de mama, próstata, y renal); TIMP-3 (metaloproteasa tisular, implicado en la metástasis del cáncer de colon, renal, y cerebro); DAPK1 (DAP cinasa, implicado en la apoptosis de células de linfoma de células B); P73 (implicado en la apoptosis de células de linfoma); AR (receptor de andrógenos, implicado en el cáncer de próstata); RAR-beta (receptor beta de ácido retinoico, implicado en el cáncer de próstata); receptor de endotelina B (implicado en cáncer de próstata); Rb (implicado en la regulación del ciclo celular del retinoblastoma); p53 (un importante gen supresor tumoral); P14ARF (implicado en la regulación del ciclo celular); RASSF1 (implicado en la transducción de señales); APC (implicado en la transducción de señales); caspasa-8 (implicado en la apoptosis); TERT (implicado en la senescencia); TERC (implicado en la senescencia); TMS-1 (implicado en la apoptosis); SOCS-1 (implicado en la respuesta a factor de crecimiento del hepatocarcinoma); PITX2 (hepatocarcinoma y cáncer de mama); MINT1; MINT2; GPR37; SDC4; MY0D1; MDR1; THBS1; PTC1; y pMDR1, tal como se describe en Santini et al. (2001) Ann.
 55 of Intern. Med. 134:573-586. Las secuencias de nucleótidos de estos genes pueden obtenerse a través de la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Cabe destacar que, aunque la leucemia es un cáncer de la sangre, puede afectar a otros órganos, o, de hecho, metastatizar. En las leucemias agudas, las células anormales pueden recogerse en el sistema nervioso central, los testículos, la piel y cualquier otro órgano del cuerpo. Debido a que la leucemia implica toda la médula ósea en el cuerpo, y en muchos casos, se ha diseminado a otros órganos, tales como el hígado, bazo, y nódulos linfáticos, la
 65 estimulación de la leucemia depende de otra información que refleje expectativa de supervivencia del paciente. Las leucemias incluyen, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia

mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML) y leucemia de células pilosas (HCL). Se usan diferentes sistemas de estadificación para diferentes tipos de leucemia crónica. Algunos tipos no tienen un sistema de estadificación. Los métodos para la estadificación se describen en más detalle a continuación.

5 El tratamiento de la proliferación celular anormal debido a lesiones en el tejido corporal durante la cirugía puede ser posible para varios procedimientos quirúrgicos, incluyendo cirugía de las articulaciones, cirugía intestinal, y cicatrices de queloides. Las enfermedades que producen tejido fibrótico incluyen enfisema. Los trastornos motores repetitivos que pueden tratarse usando la presente invención incluyen síndrome del túnel carpiano. Un ejemplo de trastornos proliferativos de células que pueden tratarse usando la invención es un tumor óseo. En el presente documento se
10 proporcionan anticuerpos de LOXL2 para su uso en un método para prevenir o reducir el riesgo de proliferación celular anormal debido a lesiones en tejidos corporales durante la cirugía de una enfermedad que producen tejido fibrótico en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-LOX o un anticuerpo anti-LOXL2; y opcionalmente, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, de este modo previniendo o reduciendo la proliferación celular anormal debida a lesiones a tejidos corporales debidas a cirugía. El inhibidor puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El sujeto que necesita dicho profiláctico puede ser un individuo que está predispuesto genéticamente al cáncer o que esté en alto riesgo de desarrollar un cáncer debido a varias razones, tales como antecedentes familiares de cáncer y un ambiente carcinógeno. En una realización, la enfermedad puede ser, por ejemplo, cirugía articular, cirugía intestinal, cicatrices de queloides, una enfermedad que produce tejido fibrótico, trastornos motores repetitivos de un tumor óseo.

20 Las respuestas proliferativas asociadas con el trasplante de órganos que pueden tratarse usando esta invención incluyen aquellas respuestas proliferativas que contribuyen a potenciales rechazos de órganos o complicaciones asociadas. Específicamente, estas respuestas proliferativas pueden suceder durante el trasplante del corazón, pulmón, hígado, riñón, y otros órganos corporales u sistemas de órganos. En el presente documento se proporcionan anticuerpos de LOXL2 para su uso en un método para tratar una respuesta proliferativa anormal asociada con el trasplante de órganos, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-LOXL2; y opcionalmente, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, de este modo previniendo o reduciendo la proliferación celular anormal debida al trasplante de órganos. El trasplante puede incluir, por ejemplo, trasplante de corazón, pulmón, hígado, riñón, y otros órganos corporales u sistemas de órganos.

30 La indicación de la composición de la invención también incluye fibrosis. La fibrosis es el resultado de la acumulación anormal de tejido fibrótico que puede suceder como parte del proceso de curación de heridas en el tejido dañado. Dicho daño tisular puede ser el resultado de una lesión física, inflamación, infección, exposición a toxinas, y otras causas. Los ejemplos de fibrosis incluyen fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis cardíaca y escleroderma. Los compuestos y agentes de la invención descrita también se contemplan para el tratamiento, prevención, y/o mejora de afecciones fibróticas.

40 Los tejidos fibróticos se acumulan en el corazón y los vasos sanguíneos a causa de la hipertensión, de la enfermedad cardíaca hipertensiva, aterosclerosis, e infarto de miocardio. La presión sanguínea elevada, o hipertensión, puede estar causada por varios factores y a menudo da lugar al desarrollo de la enfermedad coronaria hipertensiva (HHD) con progresión a paro cardíaco e infarto de miocardio. De manera similar, la aterosclerosis y otras enfermedades cardíacas isquémicas también dan a menudo como resultado paro cardíaco. Todas estas enfermedades cardiovasculares muestran una acumulación de matriz extracelular o deposición fibrótica que da como resultado el endurecimiento de la vasculatura y el endurecimiento del tejido cardíaco en sí. Esta deposición de
45 material fibrótico es una respuesta al daño inducido por el estado hipertenso y/o esclerótico, pero los efectos de esta respuesta también dan como resultado los efectos negativos del endurecimiento vascular y cardíaco así como dilatación ventricular. Adicionalmente, se cree que la fibrosis cardíaca aumentada observada en la enfermedad cardiovascular interrumpe o altera las señales transmitidas a los cardiomiocitos a través del andamiaje tisular del corazón, dando lugar adicionalmente a la interrupción de la función cardíaca eficiente y a la promoción del paro cardíaco y al infarto de miocardio. Dado el papel identificado de la deposición aumentada de matriz extracelular en las fibrosis cardíacas, los compuestos de la presente invención son útiles para la prevención, tratamiento, y/o mejora de las fibrosis cardíacas mediante la inhibición de LOXL2.

55 La presente invención también proporciona composiciones, métodos, sistemas, dispositivos médicos o kits para el tratamiento o prevención de las fibrosis cardíacas asociadas con enfermedades cardiovasculares, tales como enfermedad hipertensiva del corazón (HHD), infarto de miocardio (IM), aterosclerosis, restenosis (por ejemplo, coronaria, carotídea, y lesiones cerebrales), y lesiones cardíacas asociadas con sucesos isquémicos cardíacos.

60 La respuesta de curación después de IM puede inducir la expresión de LOXL2 pero si este proceso continúa descontrolado, la reticulación excesiva da lugar al remodelado de la matriz extracelular o fibrosis que da como resultado disfunción cardíaca. Las enzimas que rompen las matrices y el colágeno o elastina reticulada parecen funcionar más lentamente o de manera menos eficiente y se ven superadas por los sucesos de reticulación. Ya que LOXL2 también juega un papel en la transición epitelial-mesenquimal (EMT), esto contribuye además al remodelado de cardiomiocitos y a la hipertrofia de cardiomiocitos, además del remodelado de la matriz.

65 La fibrosis reparativa inicial inducida por el IM puede ser de ayuda (por ejemplo, previene el aneurisma y daño relacionado) y se pueden dejar proceder sin impedirla. Sin embargo, aunque no se desea quedar ligados a una

teoría o mecanismo de acción particular, los inventores creen que el tratamiento anti-LOXL2 iniciado después de esta fase de fibrosis reparativa pueden atenuar la fibrosis reactiva (de mala adaptación) que da lugar a disfunción cardíaca. Por ejemplo, el tratamiento anti-LOXL2 puede iniciarse 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 16, 20, 22, 24, 36, o 48 horas después del IM, incluyendo todos los enteros intermedios. Adicionalmente, el tratamiento anti-LOXL2 puede iniciarse 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 días después del IM. De manera similar, los aumentos en la presión sanguínea (hipertensión) dan como resultado una deposición de colágeno aumentada y una degradación de proteínas reducida en el tejido cardíaco. (Berk et al., J. Clin. Invest., 117(3): 568-575 (2007)). El tratamiento anti-LOXL2 iniciado después del diagnóstico o establecimiento de la enfermedad cardíaca hipertensiva o hipertensión pueden prevenir, reducir, o mejorar la fibrosis asociada con la hipertensión. Dicho tratamiento anti-LOXL2 se inicia 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días después de que se diagnostiquen o detecten aumentos en la hipertensión o presión sanguínea sistémica.

Como otro ejemplo, pueden usarse biomarcadores para determinar cuándo puede estar sucediendo un nivel inadecuado de reticulación: por ejemplo, se ha demostrado que los niveles de LOX están correlacionados con la proteína C reactiva (CRP), un biomarcador usado de manera común, y el tratamiento puede comenzar cuando los niveles de CRP están elevados por encima de los niveles normales adecuados. Más directamente, existen métodos y kits de ensayo para medir la liberación de telopéptidos de colágeno reticulado en la orina o sangre. Los niveles elevados de estos fragmentos de colágeno pueden indicar una transición de fibrosis reparativa a fibrosis reactiva (de mala adaptación). Además, pueden efectuarse medidas de función y gasto cardíaco, incluyendo aquellas asociadas con la contracción eficaz del ventrículo.

Puede administrarse un inhibidor de LOXL2 a un sujeto antes de, de manera concurrente con, o después de una afección o enfermedad cardíaca, tal como hipertensión, enfermedad cardíaca hipertensiva (HHD), infarto de miocardio (IM), aterosclerosis, y restenosis, para prevenir la aparición de, para reducir el riesgo de, o para tratar la fibrosis patológica asociada con dicha afección o enfermedad cardíaca. Por ejemplo, puede administrarse un inhibidor de LOX/LOXL2 al menos 1 hora, 2 horas, 3 horas, 5 horas, o 10 horas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 días después de la aparición de dicha afección o enfermedad cardíaca patológica.

Adicionalmente, se prevé una duración limitada del tratamiento. El tratamiento debe mantenerse solo durante el tiempo suficiente para prevenir o atenuar la fibrosis reactiva para prevenir o reducir la disfunción cardíaca. Por ejemplo, se usan fragmentos Fab de vida corta cuando se desean duraciones de tratamiento más cortas. Como alternativa, pueden usarse anticuerpos completos que tienen una semivida en suero más larga, con una dosificación limitada durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 semanas, incluyendo todos los días intermedios. Pueden usarse pruebas estándar de función cardíaca para controlar el progreso y ajustar la dosificación según sea necesario, junto con la determinación de biomarcadores relevantes discutidos anteriormente. La duración limitada del tratamiento se añade a la seguridad de esta estrategia.

La fibrosis del hígado está implicada en la patología de numerosas enfermedades hepáticas. Tal como se ha indicado anteriormente, la fibrosis sucede como una complicación de la hemocromatosis, la enfermedad de Wilson, el alcoholismo, la esquistosomiasis, la hepatitis vírica, la 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 la muerte. Las lesiones crónicas en el hígado de fuentes tales como parásitos e infección viral (por ejemplo, VHB, HCV, HIV, esquistosomiasis) o el estrés a largo plazo del consumo de alcohol dan como resultado inevitable el remodelado del hígado, presumiblemente para encapsular el área dañada y proteger del daño al tejido hepático restante. (Li y Friedman, Gastroenterol. Hepatol. 14:618-633, 1999). La fibrosis hepática da como resultado cambios en la matriz extracelular, incluyendo aumentos de 3-10 veces en el contenido de colágeno y la sustitución de la membrana basal de baja densidad con matriz de alta densidad, que deterioran la función metabólica y de síntesis de los hepatocitos, células estrelladas hepáticas y células endoteliales. (Girogescu, M., Non-invasive Biochemical Markers of Liver Fibrosis, J. Gastrointestin. Liver Dis., 15(2): 149-159 (2006)). Los compuestos de la presente invención son por lo tanto útiles para la prevención, tratamiento, y/o mejora de enfermedades fibróticas hepáticas, y dicho uso está contemplado en el presente documento mediante la inhibición de LOXL2.

Al igual que en la fibrosis hepática, la fibrosis renal puede ser el resultado de varias enfermedades y lesiones en los riñones. Los ejemplos de dichas enfermedades y lesiones incluyen enfermedad renal crónica, síndrome metabólico, diabetes y la nefritis glomerular resultante. Se ha reconocido que el síndrome metabólico es un grupo de anomalías que incluyen los signos de diabetes, tales como resistencia a la insulina así como la obesidad e hipertensión central o visceral. En prácticamente todos los casos, la desregulación de la glucosa da como resultado la estimulación de la liberación de citocinas y la regulación positiva de la deposición de matriz extracelular. Los factores adicionales que contribuyen a la enfermedad renal crónica, diabetes, síndrome metabólico, y nefritis glomerular incluyen hiperlipidemia, hipertensión, y proteinuria, todos los cuales dan como resultado un daño adicional a los riñones y estimulan adicionalmente la deposición de matriz extracelular. Por lo tanto, independientemente de la causa primaria, las lesiones en los riñones dan como resultado fibrosis renal y la pérdida concomitante de la función renal. (Schna, 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)). Los compuestos de la presente invención son por lo tanto útiles para la prevención,

tratamiento, y/o la mejora de enfermedades fibróticas renales (enfermedad renal crónica, nefropatía diabética, nefritis glomerular, síndrome metabólico), y dicho uso está contemplado en el presente documento.

La fibrosis del pulmón incluye muchos síndromes y enfermedades. Las enfermedades ilustrativas incluyen fibrosis pulmonar idiopática (IPF), neumonía intersticial idiopática, y síndrome del distrés respiratorio agudo (SRDA). La patogénesis de la mayoría de fibrosis pulmonares, incluyendo las enfermedades anteriormente mencionadas, no se entiende bien, sin embargo, todas están caracterizadas por un flujo de entrada de células inflamatorias y un aumento posterior de la síntesis y deposición de matriz celular rica en colágeno. (Chua et al., Am J. Respir. Cell. Mol. Biol., 33:9-13 (2005); Tzortzaki et al., J. Histochem. & Cytochem., 54(6): 693-700 (2006); Armstrong et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 160: 1910-1915 (1999)). Dado el papel identificado del aumento de colágeno y de deposición de matriz extracelular en la fibrosis pulmonar, los compuestos de la presente invención son útiles para la prevención, tratamiento, y/o mejora de las fibrosis pulmonares mediante la inhibición de LOXL2.

El escleroderma es un trastorno autoinmune, en el que hay una producción de colágeno anormal. Este exceso de colágeno se acumula a lo largo del cuerpo, causando endurecimiento (esclerosis), cicatrices (fibrosis), y otros daños. El daño puede afectar a la apariencia de la piel, o puede implicar solamente a los órganos internos. Los síntomas y gravedad del escleroderma varían de una persona a otra. Dado el papel identificado del aumento de colágeno en el escleroderma, los compuestos de la presente invención son útiles para la prevención, tratamiento, y/o mejora del escleroderma mediante la inhibición de LOXL2.

La angiogénesis anormal que puede tratarse o prevenirse usando esta invención incluye aquellas angiogénesis que acompañan a la artritis reumatoide, edema y lesión cerebral relacionada con isquemia-reperusión, isquemia cortical, hiperplasia ovárica e hipervascularidad, (síndrome del ovario policístico), endometriosis, psoriasis, retinopatía diabética, y otras enfermedades angiogénicas oculares, tales como retinopatía del prematuro (fibroplástica retrolental), degeneración muscular, rechazo de injerto de córnea, glaucoma neuroocular y síndrome de Oster Webber.

Las enfermedades asociadas con la angiogénesis anormal necesitan o inducen el crecimiento vascular. Por ejemplo, la angiogénesis corneal implica tres fases: un periodo latente prevascular, la neovascularización activa, y la maduración y regresión vascular. La identidad y mecanismo de varios factores angiogénicos, incluyendo elementos de la respuesta inflamatoria, tales como leucocitos, plaquetas, citocinas, y eicosanoides, o constituyentes del plasma no identificados están aún por revelar.

Los anticuerpos anti-LOXL2 descritos en el presente documento pueden usarse para tratar enfermedades asociadas con la angiogénesis anormal no deseada. El método comprende administrar a un paciente que padezca una angiogénesis no deseada o anormal un inhibidor de LOX en combinación con un agente antineoplásico o antiangiogénico que no es dicho inhibidor de LOX. La dosificación particular de estos agentes necesarios para inhibir (parcial o completamente) la angiogénesis y/o enfermedades angiogénicas dependerán de la gravedad de la afección, de la vía de administración, y factores relacionados que pueden decidirse por el médico tratante. En general, las dosificaciones diarias aceptadas y eficaces son la cantidad suficiente para inhibir de manera eficiente la angiogénesis y/o enfermedades angiogénicas.

De acuerdo con esta realización, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse para tratar varias enfermedades asociadas con la angiogénesis no deseada, tales como neovascularización retinal/coroidea y la neovascularización corneal. Los ejemplos de neovascularización retinal/coroidea incluyen, pero sin limitación, enfermedades de Bests, miopía, foveas papilares, enfermedad de Stargardt, enfermedad de Pagets, oclusión venosa, oclusión arterial, anemia de células falciformes, sarcoidosis, sífilis, pseudoxanthoma elasticum, enfermedades obstructivas carotídeas, uveitis/vitritis crónica, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus sistémico eritematoso, retinopatía del prematuro, enfermedad de Eale, retinopatía diabética, degeneración macular, enfermedades de Bechets, infecciones que causan una retinitis o coroiditis, presunta histoplasmosis ocular, pars planitis, desprendimiento de retina crónico, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, traumatismo y complicaciones tras cirugía láser, enfermedades asociadas con rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades causadas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso, incluyendo todas las formas de vitreorretinopatía proliferativa. Los ejemplos de neovascularización corneal incluyen, pero sin limitación, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de vitamina A, uso excesivo de lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, pterigión, queratitis seca, sjogrens, rosácea del acné, filectenulosis, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, rechazo de injerto de córnea, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratitis marginal, poliarteritis, sarcoidosis de Wegner, escleritis, queratotomía radial penfigoide, glaucoma neovascular y fibroplasia retrolental, sífilis, infecciones por micobacterias, degeneración lipídica, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por Herpes simplex, infecciones por Herpes zoster, infecciones por protozoos y sarcoma de Kaposi.

En otra realización más, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse para tratar enfermedades inflamatorias crónicas asociadas con la angiogénesis anormal. El método comprende administrar a un paciente que padece de una enfermedad inflamatoria crónica asociada con la angiogénesis normal un inhibidor de LOXL2 en combinación con un agente anti-neoplásico o un agente anti-angiogénico que no es dicho inhibidor de

LOXL2. La inflamación crónica depende de la formación continua de brotes capilares para mantener un flujo de entrada de células inflamatorias. El flujo de entrada y la presencia de las células inflamatorias producen granulomas, y por lo tanto, mantiene el estado inflamatorio crónico. La inhibición de la angiogénesis usando los compuestos descritos en el presente documento previene la formación de los granulomas, de este modo aliviando la enfermedad. Los ejemplos de enfermedades inflamatorias **crónicas incluyen, pero sin limitación, enfermedades inflamatorias del intestino, tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, sarcoidosis, y artritis reumatoide.**

Las enfermedades inflamatorias del intestino, tales como enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa están caracterizadas por la inflamación crónica y la angiogénesis en varios sitios del tracto gastrointestinal. Por ejemplo, La enfermedad de Crohn sucede como una enfermedad inflamatoria transmural que afecta más comúnmente al íleo distal y al colon pero también puede suceder en cualquier parte del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el ano y la zona perianal. Los pacientes con enfermedad de Crohn tienen generalmente diarrea crónica asociada a dolor abdominal, fiebre, anorexia, pérdida de peso e inflamación abdominal. La colitis ulcerosa también es una enfermedad crónica, no específica, inflamatoria y ulcerosa que surge en la mucosa colónica y está caracterizada por la presencia de diarrea sanguinolenta. Estas enfermedades inflamatorias del intestino están causadas generalmente por una inflamación granulomatosa a lo largo del tracto gastrointestinal, que implica nuevos brotes capilares rodeados por un cilindro de células inflamatorias. La inhibición de la angiogénesis mediante las formulaciones farmacéuticas de la presente invención debe inhibir la formación de los brotes y evitar la formación de granulomas. Las enfermedades inflamatorias del intestino también muestran manifestaciones intestinales extra, tales como lesiones cutáneas. Dichas lesiones están caracterizadas por la inflamación y la angiogénesis, y pueden suceder en muchos sitios distintos del tracto gastrointestinal. La inhibición de la angiogénesis mediante las formulaciones farmacéuticas de la presente invención debe reducir el flujo de entrada de células inflamatorias y evitar la formación de lesiones. Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan anticuerpos de LOXL2 para su uso en un método para tratar una enfermedad inflamatoria del intestino, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-LOXL2; y opcionalmente, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La sarcoidosis, otra enfermedad inflamatoria crónica, está caracterizada como un trastorno granulomatoso multisistémico. Los granulomas de esta enfermedad pueden formarse en cualquier parte del cuerpo y, por lo tanto, los síntomas dependen del sitio de los granulomas y de si la enfermedad está activa. Los granulomas se crean mediante los brotes capilares angiogénicos que proporcionan un suministro constante de células inflamatorias. Mediante el uso de las formulaciones farmacéuticas de la presente invención para inhibir la angiogénesis, dicha formación de granulomas puede inhibirse. La psoriasis, también una enfermedad inflamatoria crónica y recurrente, está caracterizada por pápulas y placas de diversos tamaños. El tratamiento usando las formulaciones farmacéuticas de la presente invención debe prevenir la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para mantener las lesiones características y proporcionar alivio de los síntomas al paciente. Por lo tanto, en el presente documento se proporciona un método para prevenir la formación de los nuevos vasos sanguíneos necesarios para mantener las lesiones características y proporcionar al paciente alivio de los síntomas, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-LOXL2; y opcionalmente, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La artritis reumatoide (AR) también es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la inflamación no específica de las articulaciones periféricas. Se cree que los vasos sanguíneos en el revestimiento sinovial de las articulaciones sufren angiogénesis. Además de formar nuevas redes vasculares, las células endoteliales liberan factores y especies reactivas de oxígeno que dan lugar al crecimiento de pannus y a la destrucción de cartílago. Los factores implicados en la angiogénesis pueden contribuir activamente a, y ayudar a mantener, el estado inflamado crónico de la artritis reumatoide. El tratamiento usando las formulaciones farmacéuticas de la presente invención solas o en conjunción con otros agentes anti-AR puede prevenir la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para mantener la inflamación crónica y proporcionar al paciente con AR alivio de los síntomas. Otros agentes anti-AR son convencionales y conocidos en la materia. Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan anticuerpos de LOXL2 para su uso en un método para prevenir o tratar la AR, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-LOX o un anticuerpo anti-LOXL2; y opcionalmente, otros uno o más agentes anti-AR.

Además del uso de los anticuerpos anti-LOXL2 solos en el tratamiento de las indicaciones descritas anteriormente, también se contempla en el presente documento la terapia combinada. Los métodos proporcionados en el presente documento pueden incluir además administrar un agente o tratamiento anticáncer al paciente.

En el presente documento se proporciona un método para tratar cualquiera de las indicaciones descritas anteriormente mediante la administración de un anticuerpo anti-LOX y un anticuerpo anti-LOXL2.

En un aspecto, esta invención muestra métodos para inhibir la invasividad y metástasis de células tumorales, poniendo en contacto las células con al menos un agente citotóxico y al menos un anticuerpo anti-LOXL2. En general, el método incluye una etapa de poner en contacto células de tumor metastásico con una cantidad de al menos un agente citotóxico y al menos un anticuerpo anti-LOXL2, que, en combinación, es efectiva para reducir o

inhibir la invasividad o potencial metastásico de la célula. Como alternativa, de acuerdo con la presente invención, puede combinarse un anticuerpo anti-LOXL2 con un agente quimioterapéutico para sensibilizar a las células tumorales (por ejemplo, la transición del estado EMT al estado MET) para ser eliminadas por el agente quimioterapéutico, previniendo o inhibiendo de este modo no solo la invasión tumoral y la metástasis, sino también

5

También puede usarse cualquier agente anticáncer adecuado en los presentes métodos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "agente quimioterapéutico" o "quimioterapéutico" (o "quimioterapia", en el caso de tratamiento con un agente quimioterapéutico) se pretende que abarque 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™); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocina, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilaminas incluyendo altretamina, trietilenamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sacrodictina; espongistatina, mostazas de nitrógeno, tales como clorambucil, clomopazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalano, 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, especialmente caliceamicina gamma 1 L 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 como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína de enediina relacionados), aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (Adramycin™) (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; 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, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, enocitabina, floxuridina, andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestanol, testolactona, antiadrenales como aminoglutimida, mitotano, trilostano; rellenador de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicouona; elfornitina; acetato de eliptinio, una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio, hidroxurea, lentinano; lonidamina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona, mitoxantrona, mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina, losoxantrona, ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbazona, PSK™; razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazonico; triazicouona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina, dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol, pipobroman, gacitosina; arabinosida ("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 topoisomerasa RFS2000 difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en la definición de "agente quimioterapéutico" agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo Nolvadex™), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston™); inhibidores de la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (Megace™), exemestano, formestano, fadrozol, vorozol (Rivisor™), letrozol (Femara™), y anastrozol (Arimidex™); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores.

60 En un ejemplo no limitativo, esta invención incluye métodos para inhibir de manera sinérgica la invasividad y metástasis de células tumorales, poniendo en contacto a las células con al menos cisplatino y al menos un anticuerpo anti-LOX (véase la Figura 18). Alguien que ponga en práctica los métodos descritos en el presente documento entenderá que un anticuerpo anti-LOX2 puede usarse en dichos métodos.

65 En una realización, el agente antineoplásico en combinación con el modulador de LOX/LOXL es un inhibidor de tirosina cinasa. Por ejemplo, ZD1839 (Iressa™ de AstraZeneca K.K.) muestra un efecto competitivo para el ATP en

un sitio de unión a ATP la tirosina cinasa del EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), e inhibe la actividad de tirosina cinasa inhibiendo la autofosforilación de la tirosina cinasa. Como resultado, el efecto anticáncer se expresa bloqueando un equipamiento de la transducción de señales de EGFR (los ligandos, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) se unen al dominio extracelular de EGFR, seguido de la activación de la tirosina cinasa de EGFR en el dominio intracelular, que causa no solo la autofosforilación de EGFR, sino también la fosforilación de varias proteínas diana intracelulares, después transduciendo una señal de proliferación desde la superficie celular al núcleo, después transduciendo las señales de proliferación desde la superficie de la célula cancerosa hasta el núcleo, y dando como resultado la proliferación, infiltración, metástasis, angiogénesis de células cancerosas) en asociación con la proliferación, infiltración, diferenciación y metástasis. IMC-C225 o cetuximab (Erbix™) que es un anticuerpo monoclonal que se dirige a EGFR) reconoce a la parte de receptor de EGFR en la superficie de una membrana celular e inhibe la autofosforilación de EGFR inhibiendo de este modo la actividad de tirosina cinasa. Herceptin es un anticuerpo monoclonal contra Her2/Neu que es homólogo a EGFR, y el mesilato de imatinib (GLEEVEC™, anteriormente STI-571) puede inhibir las actividades de tirosina cinasa tanto de BCR-Abl como de c-kit (documento no de patente N° 2). Sorafenib (Nevaxar™) es un inhibidor de molécula pequeña de Raf cinasa, PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), cinasas 2 y 3 de receptor de VEGF y c-Kit.

Tal como se usa en el presente documento, los anticuerpos monoclonales contra antígenos tumorales son anticuerpos provocados contra antígenos expresados por tumores y células leucémicas, preferentemente antígenos específicos de tumor. El anticuerpo monoclonal también incluye anticuerpo completamente humano y anticuerpo humanizado.

Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos para la terapia contra el cáncer incluyen Trastuzumab (HERCEPTIN™; la sobreexpresión de la proteína HER2 está asociada con una enfermedad más agresiva y un peor pronóstico clínico); Rituximab (RITUXAN™) que se provoca contra CD20 en células de linfoma y elimina selectivamente células pre-B y B maduras CD20+ normales y malignas; Alemtuzumab (CAMPATH™), un anticuerpo monoclonal que se dirige específicamente al antígeno CD52 que se encuentra en los linfocitos B y T y se usa para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (CLL) y el linfoma; y zogamicina de Gemtuzumab (MYLOTARG™), un conjugado de anticuerpo que combina un anticuerpo específico contra CD33 con un fármaco quimioterapéutico (zogamicina) y está indicado para el tratamiento de la leucemia mielocítica crónica recurrente en adultos.

En otra realización, se combina el agente anti-angiogénico con un inhibidor de LOXL2 para tratar el cáncer y otras enfermedades asociadas con la angiogénesis anormal o no deseada. Los ejemplos de agentes anti-angiogénicos incluyen, pero sin limitación, ácido retinoico y derivados del mismo, 2-metoxiestradiol, ANGIOSTATIN™, ENDOSTATIN™, suramina, escualamina, inhibidor tisular de metaloproteasa 1, inhibidor tisular de metaloproteasa 2, inhibidor del activador de plasminógeno 1, inhibidor del activador de plasminógeno 2, inhibidor derivado de cartílago, paclitaxel, factor de plaquetas 4, sulfato de protamina (clupeína), derivados de quitina sulfatada (preparado a partir de conchas de cangrejo de las nieves), complejo de peptidoglucano de polisacárido sulfatado (sp-pg), estaurosporina, moduladores del metabolismo de la matriz, incluyendo, por ejemplo, análogos de prolina ((ácido 1-azetidín-2-carboxílico (LACA), cishidroxiprolina, d, 1-3,4-deshidroprolina, tiaprolina, α-dipiridilo, fumarato de β-aminopropionitrilo, 4-propil-5-(5-piridinil)2(3h)-oxazolona; metotrexato, mitoxantrona, heparina, interferones, suero de 2-macroglobulina, chimp-3, quimostatina, tetradecasulfato de β-ciclodextrina, eponemicina; fumagilina, tiomalato de oro y sodio, d-penicilamina (CDPT), suero de beta-1-anticolagenasa, alfa-2-antiplasmina, bisantreno, lobezarit disodio, ácido n-2-carboxifenil-4-cloroantrónico disódico o "CCA", talidomida; esteroides angiostáticos, carboxinaminomidazol; inhibidores de metaloproteinas, tales como BB94. Otros agentes anti-angiogénesis incluyen anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales 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.

Los ejemplos de agentes anti-fibróticos incluyen, pero sin limitación a los compuestos tales como β-aminopropionitrilo (BAPN), así como los compuestos desvelados en la Patente de los Estados Unidos N° 4.965.288 de Palfreyman, et al., publicada el 23 de octubre de 1990, titulada "Inhibitors of lysyl oxidase", que se refiere a inhibidores de lisil oxidasa y su uso en el tratamiento de enfermedades y afecciones asociadas con la deposición anormal de colágeno; el documento US 4.997.854 de Kagan, et al., publicado el 5 de marzo de 1991, titulado "Anti-fibrotic agents and methods for inhibiting the activity of lysyl oxidase in situ using adjacently positioned diamine analogue substrate", que se refiere a compuestos que inhiben LOX para el tratamiento de varios estados fibróticos patológicos. Los inhibidores ejemplares adicionales se describen en el documento US 4.943.593 de Palfreyman, et al., publicado el 24 de julio de 1990, titulado "Inhibitors of lysyl oxidase," que se refiere a compuestos tales como 2-isobutil-3-fluoro-, cloro-, o bromo-alilamina; así como, por ejemplo, los documentos US 5.021.456, US 5.059.714, US 5.120.764, US 5.182.297, US 5.252.608 (que se refieren a 2-(1-naftiloximetil)-3-fluoroalilamina). Los agentes antifibróticos ejemplares también incluyen las aminas primarias que reaccionan con el grupo carbonilo del sitio activo de las lisil oxidasas, y más particularmente aquellos que producen, después de la unión con el carbonilo, un producto estabilizado por resonancia, tal como las siguientes aminas primarias: etilenidiamina, hidrazina, fenilhidrazina, y sus derivados, semicarbazida, y derivados de urea, aminotritiles, tales como beta-aminopropionitrilo (BAPN), o 2-nitroetilamina, haloamidas insaturadas o saturadas, tales como 2-bromo-etilamina, 2-cloroetilamina, 2-trifluoroetilamina, 3-bromopropilamina, p-halobencilaminas, lactona de selenohomocisteína. En otra realización, los agentes antifibróticos son agentes quelantes de cobre, que penetran o no penetran en las células. Los compuestos

ejemplares adicionales incluyen inhibidores indirectos, tales como compuestos que bloquean que los derivados de aldehído se originen a partir de la desaminación oxidativa de los restos de lisilo e hidroxilisilo por medio de las lisil oxidasas, tales como las tianolaminas, en particular D-penicilamina, o sus análogos, tales como ácido 2-amino-5-mercapto-5-metilhexanoico, ácido D-2-amino-3-metil-3((2-acetamidoetil)ditio)butanoico, ácido p-2-amino-3-metil((2-aminoetil)ditio)butanoico, sulfinato de sodio-4-((p-1-dimetil-2-amino-2-carboxietil)ditio)butano, sulfanato de 2-acetamidoetil-2-acetamidoetanotiol, trihidrato de sodio-2-mercaptobutanosulfinato.

Los presentes métodos pueden llevarse a cabo en células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*, o pueden efectuarse en células presentes en un sujeto, por ejemplo, como parte de un protocolo terapéutico *in vivo*. La pauta terapéutica puede llevarse a cabo en un ser humano o en otros sujetos animales. El anticuerpo anti-LOXL2 proporcionado en el presente documento puede administrarse en cualquier orden en relación al agente quimioterapéutico. En ocasiones, el anticuerpo anti-LOXL2 y el agente se administran de manera simultánea o secuencial. Pueden administrarse en diferentes sitios y con diferentes pautas de dosificación. La eficacia terapéutica potenciada de la terapia combinada de la presente invención representa una alternativa prometedora a las pautas elevadamente tóxicas convencionales de agentes anticáncer. Los agentes quimioterapéuticos a emplear en dichos métodos se han descrito anteriormente en más detalle.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Métodos para generar anticuerpos monoclonales murinos Anti-LOX y Anti-LOXL2

Se inyectó a ratones (BALB/c (00467)) por vía subcutánea (s.c.), 0,05 mg de antígeno (Ag) 5 veces en intervalos de 2-3 semanas en una formulación adyuvante. Para los Ags peptídicos, los péptidos se conjugaron a albúmina de suero bovino y se formulan en adyuvante de Freund (FA) antes de la inmunización. Para los Ags proteicos, la proteína se formuló en adyuvante de alhidrogel-muramil dipéptido (ALD/MDP).

Se inyectó a los ratones Ag formulado en PBS, cada día durante 3 días por medio de una combinación de vías s.c., intraperitoneal (i.p.) e intravenosa (i.v.), de 0,05 a 0,1 mg/vía.

Las células del bazo y los ganglios linfáticos del ratón se aislaron y fusionaron con células de mieloma P3X63-Ag8.653 usando polietilenglicol al 50 %.

Las células se cultivaron y se aisló una biblioteca de hibridomas de células HAT seleccionadas esencialmente como se describe en Kenney, et al. ("Production of monoclonal antibodies using a secretion capture report web." Biotechnology 13:787-790, 1995).

La biblioteca de hibridoma se clonó usando un clasificador celular de fluorescencia activada con una unidad de deposición celular automática.

Las células individuales viables se clasificaron en placas de 96 pocillos basándose en los criterios de análisis de dispersión frontal, dispersión lateral y fluorescencia de yoduro de propidio como se describe por Kenney et al.

Los sueros y los sobrenadantes se exploraron mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando placas de microtitulación recubiertas de Ag, que después se incubaron con plasma de ratón o sobrenadante del hibridoma, seguido de conjugado anticuerpo IgG de cabra anti-ratón (específico de Fc) -HRP, seguido de solución de sustrato TMB y reactivo de finalización.

Los pocillos de las placas se lavaron para eliminar el anticuerpo o antígeno no unido entre todas las incubaciones y se determinaron los resultados.

Las secuencias de aminoácidos de VH y VL de un anticuerpo anti-LOXL2 monoclonal murino que se identificaron usando los métodos descritos se proporcionan en la Figura 6A y la Figura 6B, respectivamente. Para cada región variable, los péptidos de señal se muestran en cursiva, las CDR están subrayadas y el comienzo de la región marco conservada constante se muestra en negrita.

Se proporciona en la figura una secuencia de aminoácidos de VH de un anticuerpo monoclonal murino anti-LOX identificada usando los métodos descritos. Se proporcionan en las Figuras 7B y 7C dos secuencias de aminoácidos de VL de anticuerpos monoclonales murinos anti-LOX identificadas usando los métodos descritos. Para cada región variable, los péptidos de señal se muestran en cursiva, las CDR están subrayadas.

EJEMPLO 2

Los anticuerpos anti-LOXL2 se exploraron usando una actualización de la exploración de proteínas B para determinar la actividad enzimática de LOXL2.

Los anticuerpos candidatos se eligieron inicialmente basándose en ensayos puntuales de ELISA. Se efectuaron ELISA con múltiples antígenos mediante soluciones de anticuerpos y los anticuerpos que mostraban una señal de ELISA fuerte en el antígeno de interés se seleccionaron para posterior caracterización en ensayos enzimáticos. LOXL2 produce peróxido de hidrógeno cuando se desamina el sustrato 1,5-diaminopentano y se regenera la enzima.

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos para inhibir la actividad enzimática usando un ensayo bioquímico que empareja la producción de peróxido (liberado por LOXL2) a HRP y que mide la conversión de rojo amplex a un producto fluorescente. Se añadió el sobrenadante del hibridoma del anticuerpo (10 μ l) a 40 μ l de mezcla enzimática (borato de sodio 62,5 mM a 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 de 96 pocillo negra de área completa. La reacción enzimática comenzó con la adición de 50 μ l de solución de sustrato (borato de sodio 50 mM, reactivo rojo amplex 100 μ M, 1,5-diaminopentano (DAP) 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 fluorescencia (ex = 544 nm, em = 590 nm) en modo cinético durante 1 hora. Los datos se registraron como la pendiente de la respuesta de fluorescencia con respecto del tiempo. Estas pendientes se compararon con un control en el que se añadió el medio de hibridoma a la mezcla enzimática. Las pendientes menores que el control se consideraron inhibitorias.

Los anticuerpos M1 (asc), M4, M11, M1, M13, M22, M16, M19, M20, M20 (asc) y M25 de ensayo se ensayaron frente a BAPN (un inhibidor competitivo de LOXL2) como control positivo y LOXL2 como control negativo (véase la Figura 8).

Un anticuerpo anti-LOXL2 se denominó AB0023. Los anticuerpos anti-LOXL2 mostraron actividad inhibitoria repetida observada en materiales de preparación de 10 ml en el ensayo enzimático. También se repitió la inhibición en ensayos basados en células (véase más adelante). El análisis de secuencias confirmó que las secuencias de aminoácidos de M01, M16, M19 y M20 son idénticas.

EJEMPLO 3**Anticuerpo anti-LOXL2 AB0023 y actividad enzimática**

Puede evaluarse la actividad enzimática de los anticuerpos anti-LOXL2 y puede determinarse la CI_{50} .

Se evaluaron M1, M1 (8asc), M20 y M20 (asc) en presencia de LOXL2 25 nM y 1,5 DAP 15 mM frente a concentraciones en aumento de anticuerpo.

Determinaciones de CI_{50}

Las respuestas a dosis en anticuerpos seleccionados se llevaron a cabo contra LOXL2 usando el ensayo enzimático acoplado descrito anteriormente. Se creó una dilución en serie de anticuerpo en PBST (tween-20 al 0,01 %) y 10 μ l de esta se añadieron a 40 μ l de mezcla de enzima (borato de sodio 62,5 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 de 96 pocillo negra de área completa. La reacción enzimática comenzó con la adición de 50 μ l de solución de sustrato (borato de sodio 50 mM, reactivo rojo amplex 100 μ M, 1,5-diaminopentano 20 mM, 10 ppm de antiespumante) y se leyeron en un lector de placas M5 usando las condiciones descritas anteriormente. Las pendientes de la respuesta a fluorescencia en función del tiempo se representaron frente a la concentración de anticuerpo y los datos se ajustaron a un ajuste de cuatro parámetros usando GraFit. El punto intermedio de esta gráfica es la CI_{50} aparente y es la concentración a la cual se inhibe el cincuenta por ciento de la respuesta total.

Se observó que AB0023 es un inhibidor parcial de la actividad enzimática de LOXL2 con una CI_{50} aparente de aproximadamente 30 nM (véase la Figura 9).

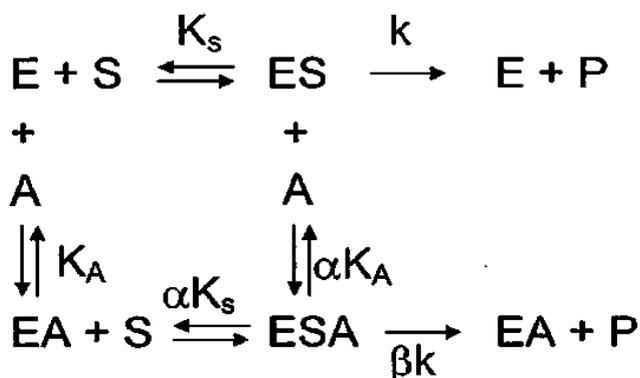
Basándose en el uso de un inhibidor parcial en la clínica para el tratamiento terapéutico (es decir, Nevirapina, un fármaco para el VIH-1 aprobado descrito por Spence et al., (1995) Science 267), también puede usarse un inhibidor parcial de LOXL2 en aplicaciones terapéuticas.

EJEMPLO 4**El anticuerpo AB0023 anti-LOXL2 es un inhibidor no competitivo**

Se evaluó la actividad del anticuerpo anti-LOXL2 AB0023 frente a concentraciones crecientes de 1,5 DAP y sobre concentraciones crecientes de anticuerpo (1 μ M, 0,005 μ M, 0,050 μ M, y 0,300 μ M).

Modo de inhibición

El modo de inhibición de los anticuerpos anti-LOXL2 se llevó a cabo usando el modelo descrito a continuación. En estos experimentos, la dependencia de la velocidad de estado estacionario en la concentración de 1,5-diaminopentano se controló con concentraciones crecientes de anticuerpo. El fin fue evaluar si la K_m para el sustrato, K_{cat} o ambas cambian en presencia de anticuerpo. Los datos recogidos se analizaron globalmente con GraFit usando el modelo mostrado en la figura a continuación. E representa enzima, S representa sustrato, A representa anticuerpo, y P representa producto. El parámetro α describe el efecto del compuesto en la afinidad del sustrato. Un valor de α igual a uno describe una situación en la cual el compuesto se une igualmente bien a la enzima libre y al complejo enzima-sustrato (similar a inhibición no competitiva). Los valores menores de uno describen una interacción en la cual el compuesto se une al complejo de enzima-sustrato (similar a inhibición de acompetitiva). Los valores mayores de uno corresponden al compuesto uniéndose a la enzima libre mejor que al complejo enzima-sustrato (similar a inhibición competitiva). El valor β describe el efecto del modulador en la velocidad de la enzima. Los inhibidores tienen valores menores de uno (para un inhibidor completo, $\beta = 0$) y los activadores tienen valores mayores de 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. Las velocidades de estado estacionario se determinaron a partir de la pendiente de la respuesta a fluorescencia en función del tiempo tal como se describe anteriormente (determinación de Cl_{50}). Los datos se representaron como la dependencia de la velocidad de estado estacionario en la concentración de sustrato (1,5-diaminopentano) a varias concentraciones fijas de anticuerpos y se analizaron con GraFit.



Se determinó que el anticuerpo anti-LOXL2 AB0023 es un inhibidor no competitivo basándose en los siguientes resultados: $\alpha = 1$, $K_i = 0,067$ y $\beta = 0,5$ (véase la Figura 10).

EJEMPLO 5**Medición cinética de la unión del anticuerpo AB0023 a LOXL2 mediante resonancia de plasmón superficial**

La afinidad de unión y la velocidad de disociación de AB0023 se determinaron mediante resonancia de plasmón superficial (SPR).

Las afinidades de unión se midieron usando un instrumento ProteOn de Bio-Rad con el termostato a 25 °C. Las afinidades de unión se determinaron usando dos métodos, usando acoplamiento de aminas; uno en el cual 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 sobre una microplaca GLC usando una proporción 1:1 de NHS a EDC proporcionada con el kit de inmovilización ProteOn. Primero se activó la microplaca con una mezcla de NHS/EDC y después se hizo fluir el antígeno o anticuerpo a 1 µg/ml en tampón acetato con pH 4,5 sobre la superficie activada para el acoplamiento. Este normalmente rindió un acoplamiento de aproximadamente 500 UR. Después se cubrió la superficie de la microplaca activada con la adición de etanolamina 1 M. Las microplacas acopladas se almacenaron a 4°C y se regeneraron con hidróxido de sodio 50 mM.

Las constantes de disociación se determinaron sondando la microplaca acoplada con una dilución en serie de anticuerpo o antígeno en PBST (Tween-20 al 0,05 %). Los datos se adquirieron en los seis canales disponibles del ProteOn usando un canal no acoplado como referencia. Se analizaron los datos recogidos usando el programa informático de control ProteOn de Bio-Rad.

Se descubrió que AB0023 se unía fuertemente a LOXL2 y se liberaba lentamente. Se estimó que la K_d era de 0,1 - 1,0 nM. Además, Se descubrió que AB0023 tenía las siguientes características: $k_{on} = 1,68 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{off} = 1,17 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $K_D = 0,69 \text{ nM}$ y $t_{1/2} = 98,7$ minutos. Véase la Figura 11.

EJEMPLO 6

Se llevó a cabo el mapeo de dominios y se descubrió que AB0023 se unía al dominio SRCR3-4.

5 *Materiales y métodos*

Todas las placas se obtuvieron a través de Corning. Los anticuerpos secundarios y el sustrato Pico se obtuvieron a través de Pierce. La peroxidasa de rábano picante (HRP) se obtuvo a través de Sigma. Todos los reactivos ProteOn se obtuvieron a través de Bio-Rad. LOXL2 se obtuvo a través de R&D systems. Los anticuerpos que se usaron en este estudio se produjeron en Antibody Solution o por medio de ascitis a través de Aragen Biosciences. Todos los demás reactivos fueron de la mayor calidad posible.

Unión por medio de ELISA

15 Se determinó la unión del anticuerpo a LOXL2 usando un ELISA basado en luminiscencia. Se recubrieron placas blancas de Corning con 0,1 µg/ml de LOXL2 o del antígeno de interés en tampón borato 50 mM (pH 8,0) durante toda la noche a 4 °C. Se lavaron las placas usando el lavaplaques de BioTek y se bloquearon con leche desnatada al 5 % en PBST (tween-20 al 0,05 %) durante una hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBST (tween-20 al 0,05 %) y se usaron inmediatamente después o se almacenaron a 4 °C en un desecador para el uso futuro. La parte principal del anticuerpo a ensayar se diluyó en serie en PBST (tween-20 al 0,01 %) y se añadieron 100 µl de cada dilución por cada pocillo. Se incubaron las placas con el artículo de ensayo durante 1 hora a temperatura ambiente y después se lavaron con PBST (tween-20 al 0,05 %). El anticuerpo de detección (conjugado de HRP anti-ratón) se diluyó 16.000 veces en leche desnatada al 5 % en (PBST tween-20 al 0,05 %) y se aplicaron 100 µl por cada pocillo. Se incubaron las placas durante 1 hora con anticuerpo de detección y después se lavaron con PBST (PBST tween-20 al 0,05 %). Se detectó la señal usando el sustrato quimioluminiscente de ELISA pico SuperSignal de Pierce siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la luminiscencia usando un lector de placas M5 de Molecular Devices con un tiempo de integración de 500 ms que captura todas las longitudes de onda. Se corrigió el fondo de los datos y se ajustó la dependencia de la señal de luminiscencia a la concentración de anticuerpo usando la ecuación isotérmica de Langmuir mediante el uso del programa GraFit. En los casos en los que la concentración del antígeno fue similar a la constante de disociación se usó la ecuación cuadrática de unión ajustada. Se obtuvieron los valores de disociación notificados de los ajustes a estas ecuaciones; en las que PL representa la señal del complejo unido, B_{máx} es la unión máxima, K_D es la constante de disociación y L es la concentración de ligando.

35 Ecuación isotérmica de Langmuir:

$$[PL] = \frac{B_{max} * [L]}{K_D + [L]}$$

Ecuación de unión estrecha:

$$[PL] = B_{max} * \frac{([P]_T + [L]_T + K_D) - \sqrt{([P]_T + [L]_T + K_D)^2 - 4[P]_T[L]_T}}{2[P]_T}$$

Se ensayó AB0023 contra MCD-LOXL2, LOXL2 (R&D), SRCR1-2 y SRCR 1-4. Se descubrió que AB0023 se unía al dominio SRCR3-4 (véase la Figura 12).

EJEMPLO 7

Inhibición de la migración / invasión en colágeno I y colágeno IV e inhibición del crecimiento celular

50 Se llevaron a cabo ensayos basados en células para evaluar la unión de AB0023 para unir sustrato (es decir, colágeno).

En resumen, Se amplió la escala del AB0023 de varias muestras antes del ensayo.

55 Se usaron kits de 96 pocillos de invasión celular de colágeno I y colágeno IV (Trevigen, Gaitersburgo, MD) para la exploración de los antisueros / sobrenadante del anticuerpo. Se privó de suero a las células MDA MB 231 24 horas antes para preparar el ensayo. En el día de la preparación, se hicieron placas recubiertas de colágeno I y colágeno IV al menos 4 horas de la preparación del ensayo (no más de 8 horas antes). Se recubrieron las placas de colágeno I y colágeno IV de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se sembraron las células a 20.000 células por cada pocillo en 95 µl de medio libre de suero en la cámara superior de la placa. Se hicieron alícuotas de ciento cincuenta (150) µl de los medios que contenían FBS al 1 % y se hicieron alícuotas de L-glutamina 1x en las cámaras inferiores de la placa. Usando una pipeta multicanal, se colocaron 5 µl de cada antisuero en las cámaras superiores de la

placa. Se mezclaron cuidadosamente de arriba a abajo los antisueros y la mezcla celular una vez con la pipeta. Se incubaron las placas a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 48 horas.

5 Después de 48 horas, las placas estaban listas para la lectura. Se hizo la solución de disociación celular que contenía calceína AM de acuerdo con las instrucciones del fabricante. También se lavaron y se desensamblaron las placas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadieron 125 µl de la solución de disociación celular que contenía calceína AM a los pocillos de la cámara inferior y se colocaron las placas a 37 °C durante 30 minutos. Después de 30 minutos los lados de las placas se golpearon para soltar las células, y se colocaron las placas en un incubador durante otros 30 minutos a 37 °C. Después se desensamblaron las placas y la placa inferior se colocó en el lector de placas (SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, Ca) con los ajustes: Fluorescencia, 485-520 nm de emisión, lectura superior, placa negra opaca, sensibilidad a 30.

10 Se observó una inhibición de la migración / invasión en colágeno I (Figura 13) y colágeno IV, de los sobrenadantes a 10 ml material de preparación y 100 ml preparados a mayor escala y ascitis.

15 *Ensayos de Adhesión celular*

Se sembraron las células MAD-MB231 en placas de 15 cm² y crecieron en DMEM que contenía 4,5 g/l de glucosa (FBS al 10 % y L-Glutamina 2 mM) de modo que estuvieran confluentes en el día del ensayo. Se aspiró el medio y las células se lavaron 2 veces con 10 ml de EDTA 1 mM por cada placa. Se recogieron las células de las placas incubando con otros 10 ml de EDTA PBS 1 mM durante 5 minutos a 37 °C de una cabina de bioseguridad y posteriormente se pipetearon las células fuera de la placa en la solución de EDTA PBS. Se determinó la concentración y se centrifugaron suficientes células para el ensayo (50k/pocillo más un extra para el pipeteo) en un tubo de fondo cónico de 15 ml. El precipitado de células se dispersó en DMEM libre de suero precalentado a 500 K células/ml y se añadió CuCl₂ a una concentración final 1 mM. Se pipetearon cien (100) ml/pocillo de suspensión celular en una placa de cultivos tisulares de 96 pocillos estilo fondo en U que contenía 10 ml de dilución del AcM apropiado. La suspensión celular/mezcla de AcM se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Después se transfirieron cien (100) µl/pocillo de mezcla de células resuspendidas/AcMo se transfirieron a placas de 96 pocillos recubiertas de colágeno IV (BD Biocoat, BD Biosciences). Las placas se incubaron a 37 °C en una cabina de bioseguridad durante 1 hora. Después se transfirieron las células y se aspiraron suavemente dos veces con 200 µl de DPBS (Mediatech) para eliminar las células que no se habían unido. Después de añadieron cien (100) µl de Calceína-AM (BD Biosciences) a una concentración final de 10 mM en DPBS a cada pocillo para teñir las células que quedaban. Las placas se incubaron a 37 °C en una cabina de bioseguridad durante 1 hora. Se leyeron las placas en un lector de placas M5 de Molecular Devices a 494/517 (excitación/emisión). El porcentaje (%) de emisión se calculó normalizando a los controles de PBS o anticuerpo no relacionado.

Usando este ensayo, se observó la inhibición parcial de la adhesión después de la exposición de las células al anticuerpo AB0023.

40 *Crecimiento celular*

Los anticuerpos anti-LOXL2 inhibieron el crecimiento celular de cuatro líneas celulares: 231 es una línea celular de cáncer de mama, BT549 es una línea celular de cáncer de mama, HT1080 es un fibrosarcoma, y BxPC3 es una línea celular de cáncer de próstata (Figura 17). Por lo tanto, el anticuerpo es efectivo en la inhibición del crecimiento de cánceres de distintos orígenes.

EJEMPLO 8

Inhibición mediante AB0023 del cambio similar a EMT

50 Los cambios de Epitelial a Mesenquimal se evaluaron usando inmunohistoquímica.

Para detectar si una célula esta en una EMT o estado de transición de mesenquimal a epitelial (MET), se tiñeron las células con anticuerpos específicos para marcadores específicos para marcadores celulares proteicos para los estados epiteliales o mesenquimales tales como E-cadherina, vimentina, fibronectina, y faloidina para detectar F-actina.

Protocolo de tinción con rodamina faloidina

60 Se sembraron las células 24 horas antes del día de la tinción; las células tuvieron aproximadamente un 80 % de confluencia 24 horas más tarde en un portaobjetos de 8 cámaras. Al día siguiente, se aspiraron los medios y se enjuagaron las cámaras con PBS 1X. Después de fijaron las células con paraformaldehído al 4 % (PFA) durante 20 minutos a temperatura ambiente y después de enjuagaron una vez con suero salino tamponado con fosfato (PBS). Para la permeabilización, se trataron las células con saponina al 0,5 % (JT Baker, Filipsburgo, NY) en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las cámaras se enjuagaron cuidadosamente una vez con PBS 1X, y una dilución 1:100 de rodamina faloidina (Invitrogen, Carlsbad, Ca) en PBS se añadió a las células y se incubó durante 15

minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las cámaras dos veces con PBS 1X y se montaron los portaobjetos con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Protocolo de tinción con E-Cadherina

5 Se sembraron las células 24 horas antes del día de la tinción; las células tuvieron aproximadamente un 80 % de confluencia 24 al día siguiente en un portaobjetos de 8 cámaras. Al día siguiente, se aspiraron los medios y se enjuagaron las cámaras con PBS 1X. Después de fijaron las células con metanol enfriado en hielo y después de
10 incubó durante 2 minutos a -20 °C. Las células se enjuagaron una vez con PBS 1X y 1 mg/ml de Ac de E-Cadherina (Calbiochem, Gibbstown, NY) se añadieron a las cámaras del portaobjetos. Después se incubaron las cámaras a 37 °C durante 1 hora. Después de lavar cuidadosamente las cámaras una vez con PBS 1X, el Ac secundario (IgG anti-ratón conjugada con cy3, Jackson Immuno Research, West Grove, Pa) se añadió y se incubó a temperatura ambiente durante 30-40 minutos. Se lavaron las cámaras dos veces con PBS 1X y se montaron los portaobjetos con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

15 Los medios condicionados de las células HS-578t (LOXL2 alto) se aplicaron a células MCF-7 (LOXL2 bajo/negativo). Las células se tiñeron con rodamina-faloidina (F-actina, rojo) y Dapi (núcleos, azul).

20 Se descubrió que AB0023 inhibía los cambios similares a EMT inducidos por los medios condicionados de las células tumorales que expresan LOXL2 (datos no mostrados).

EJEMPLO 9

25 El anticuerpo Anti-LOXL2 AB0023 se une al LOXL2 asociado a la matriz.

Estudios de internalización y captación de Ac en células Hs578t.

30 Las células Hs578t se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10 % y glutamina 1x. Se sembraron las células en un portaobjetos de 8 cámaras de vidrio (BD Falcon, Franklin Lakes, NY) y se les permitió unirse durante toda la noche. Para la baja confluencia, se sembraron las células a 30-40.000 células por portaobjetos. Se usó la baja confluencia para la detección de Lox en el citosol 24 horas más tarde. Para la alta confluencia, se sembraron las células a 100.000 células por portaobjetos. Se usó la alta confluencia para la detección del Lox asociado con la matriz y el colágeno aproximadamente de 48-72 horas después.

35 Al día siguiente se añadió 1 µg/ml (concentración final en medio de crecimiento regular) de Ac monoclonal (AcMo) anti-Lox M64 o anti-Lox M20 a las cámaras. Para la captación continua, se incubaron los AcMo con las células en distintos instantes: por ejemplo, 3 horas, 8 horas, o 24 horas (durante toda la noche). Después de una cantidad apropiada de captación continua, se recogieron los medios y se enjuagaron las cámaras con PBS 1X. Se fijaron las células en PFA (paraformaldehído) al 4 % a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de la fijación, se
40 lavaron las células con PBS 1X a temperatura ambiente durante 5 minutos y después se inactivaron en cloruro de amonio 50 mM a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se lavaron las células de nuevo con PBS 1X a temperatura ambiente durante 5 minutos.

45 Se permeabilizaron las células añadiendo tampón de saponina (saponina al 0,5 %/BSA al 1 % en PBS) a temperatura ambiente durante 20 minutos. El Ac secundario de detección (IgG Alexa Fluor 488 de asno anti-ratón, Invitrogen, Carlsbad, CA) se añadió a temperatura ambiente en tampón de saponina y se incubaron las células durante 30-45 minutos. Después se lavaron las células 3X en tampón de saponina. Se montaron los cubreobjetos con vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

50 Para la detección de la detección de colágeno, se incubaron las células con anticuerpo anti-colágeno (1:50, anti colágeno de tipo I policlonal de conejo de Calbiochem, Gibbstown, NJ), una hora antes de fijar las células con PFA al 4 %. El Ac secundario que se usa para el colágeno es Cy3 de asno anti-conejo (ImmunoJackson Labs, West Grove, PA).

55 Los análisis por inmunotransferencia e inmunofluorescencia (datos no mostrados) indicaron que LOXL2 fue predominantemente intracelular a baja densidad pero se secretaba a alta densidad celular (células confluentes). Se detectó LOXL2 en el medio de las células confluentes y también en la matriz extracelular. La inmunofluorescencia en células vivas indicó que el AB0023 se unía a LOXL2 asociado con la matriz de colágeno.

60 **EJEMPLO 10**

El anticuerpo anti-LOX M64 se une a LOX

65 Se evaluó la actividad del anticuerpo anti-LOX M64 sobre concentraciones crecientes de 1,5 DAP y sobre concentraciones crecientes de anticuerpo (véase la Figura 15).

Materiales y métodos

Todas las placas se obtuvieron a través de Corning. Los anticuerpos secundarios y el sustrato Pico fueron de Pierce. El reactivo rojo Amplex era de Invitrogen. La peroxidasa de rábano picante (HRP), el 1,5 diaminopentano, antiespumante fueron de Sigma. Todos los reactivos de ProteOn fueron de Bio-Rad. LOX se produjo de in situ en Arresto Biosciences. Los anticuerpos que se usaron en este estudio se produjeron en Antibody Solution o por medio de ascitis (asc) de Aragen Biosciences. Todos los demás reactivos fueron de la mayor calidad posible.

Unión por medio de ELISA

Se determinó la unión del anticuerpo a LOX usando un ELISA basado en luminiscencia. Se recubrieron placas blancas de Corning con 0,1 µg/ml de LOX o del antígeno de interés en tampón borato 50 mM (pH 8,0) durante toda la noche a 4 °C. Se lavaron las placas usando un lavaplacas de BioTek y se bloquearon con leche desnatada al 5 % en PBST (tween-20 al 0,05 %) durante una hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBST (tween-20 al 0,05 %) y se usaron inmediatamente después o se almacenaron a 4 °C en un desecador para el uso futuro. El anticuerpo a ensayar se diluyó en serie en PBST (tween-20 al 0,01 %) y se añadieron 100 µl de cada dilución por cada pocillo. Se incubaron las placas con el material de ensayo durante 1 hora a temperatura ambiente y después se lavaron con PBST (tween-20 al 0,05 %). El anticuerpo de detección (conjugado de HRP anti-ratón) se diluyó 16000 veces en leche desnatada al 5 % en PBST (tween-20 al 0,05 %) y se aplicaron 100 µl por cada pocillo. Se incubaron las placas durante 1 hora con anticuerpo de detección y después se lavaron con PBST (PBST tween-20 al 0,05 %). Se detectó la señal usando el sustrato quimioluminiscente de ELISA Pico SuperSignal de Pierce siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la luminiscencia usando un lector de placas M5 de Molecular Devices con un tiempo de integración de 500 ms que captura todas las longitudes de onda. Se corrigió el fondo de los datos y se ajustó la dependencia de la señal de luminiscencia a la concentración de anticuerpo usando la ecuación isotérmica de Langmuir mediante el uso del programa GraFit. En los casos en los que la concentración del antígeno fue similar a la constante de disociación se usó la ecuación cuadrática de unión ajustada. Se obtuvieron los valores de disociación notificados de los ajustes a estas ecuaciones; en las que PL representa la señal del complejo unido, B_{máx} es la unión máxima, K_D es la constante de disociación y L es la concentración de ligando.

Ecuación isotérmica de Langmuir

Ecuación isotérmica de Langmuir:

$$[PL] = \frac{B_{max} * [L]}{K_D + [L]}$$

Ecuación de unión estrecha:

$$[PL] = B_{max} * \frac{([P]_T + [L]_T + K_D) - \sqrt{([P]_T + [L]_T + K_D)^2 - 4[P]_T[L]_T}}{2[P]_T}$$

El anticuerpo Anti-LOX M64 se ensayó en tres lotes y se descubrió que tenía una KD de 6,6 nM, 5,0 nM y 5,7 nM para el Lote 3, Lote 4 y Lote 5, respectivamente (Figura 15).

EJEMPLO 11

Medición cinética de la unión del anticuerpo M64 a LOX mediante resonancia plasmón superficial

Se evaluó la afinidad de unión por medio de Resonancia de Plasmón Superficial (RPS).

Las afinidades de unión se midieron usando un instrumento ProteOn de Bio-Rad con el termostato a 25 °C. Las afinidades de unión se determinaron usando dos métodos, usando acoplamiento de aminos; uno en el que se inmovilizó el anticuerpo y se añadió el antígeno (LOX), y otro en el que se inmovilizó el antígeno (LOX) y se añadió el anticuerpo. El anticuerpo o el antígeno se inmovilizaron sobre una microplaca GLC usando una proporción 1:1 de NHS a EDC proporcionada con el kit de inmovilización ProteOn. Primero se activó la microplaca con una mezcla de NHS/EDC y después se hizo fluir el antígeno o anticuerpo a 1 µg/ml en tampón acetato con pH 4,5 sobre la superficie activada para el acoplamiento. Este normalmente rindió un acoplamiento de aproximadamente 500 UR. Después se cubrió la superficie de la microplaca activada con la adición de etanolamina 1 M. Las microplacas acopladas se almacenaron a 4°C y se regeneraron con hidróxido de sodio 50 mM.

Las constantes de disociación se determinaron sondando la microplaca acoplada con una dilución en serie de anticuerpo o antígeno en PBST (Tween-20 al 0,05 %). Los datos se adquirieron en los seis canales disponibles del ProteOn usando un canal no acoplado como referencia. Se analizaron los datos recogidos usando el programa informático de control ProteOn de Bio-Rad.

Se descubrió que M54 tenía una K_D de 7 nM (Figura 16).

EJEMPLO 12

5 A continuación se muestra un listado de las secuencias descritas a lo largo de la memoria descriptiva.

SEC ID N°	Secuencia
1.	MEWSRVFIFLLSVTAGVHSQVQLQSGAELVRPGTSVKVCKASGYAFTYXLIWVVKORPPGGGLEWIGVIN PGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSAYMQLSSLTSDSVAVFCARNWMMNFYWGQGTTLTVSS
2.	MRCLAEFLGLLVLWIPGAIGDIVMTQAAPSVSVTPGESVLSICRSSHSLHSNGNTYLYWFLQRPQGSPQF LIYRMSNLASGVDDRFSGSGSFTAFLRI SRVEAEDVGVYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIK
3.	MGWSWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQSGAELVKPGASVXLSCKASGYTFRSYDINWVRQRPQGLEWIGWIF PEDGSTKYNEKFKGKAILTTDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVFCARVYVYAMDYWGQTSVTVSS
4.	MKLFPVRLVWFVTPASSSDVLLTQTPLSLPVSGLDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI YKVSNRESGVDDRFGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGIYCFQSSHIPLTFGAGTKLELKRAD
5.	MKLFPVRLVWFVTPASSSDVLLTQTPLSLPVSGLDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI YKVSIRFESGVDDRFGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGIYCFQSSHIPLTFGAGTKLELKRAD
6.	VRLRGAYICEGRVIVLKNGEWGTVCDDKWDLVSAVVCRELFCGSAKEAVTGSRLGGIGPIHLNEIQCT GNEKSIIDCKFNABSQGCNHEEDAGVRCNLRNLNGRNPYEGRVEVLVERNGSLVWGMVCGQNWGI VEAMVV CRQLGLGFASNAFQETWYWRGDVNSNKVVMGVCSCGTELSLAHCRHGDGEDVACPOGGVQYAGAVACS
7.	MRFANTVLLGLPLQLCALVHCAPPAAGQQPPREPPAAPGAWRQIQWENNGQVFSLLSLGSQYQPQRRRD PGAAVPGAANASAOQFRTPILLIRDNRATAARTTAGSSGYTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRAREAGASRA ENQTAPGEVPALESLNLRPPSRVDGMVGDPPYNYFYKSDNPNYNYDTYERPRPGGRYRPGYGTGYFYGLP DLVADPVIQASTYVQKMSMYNLRCAAEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQVKNQGTSDFLPSRPRY SWEWHSCHQYHSMDEFSHYDILLDANTQRRVAEGHKASFCLEDTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGCYDTY GADIDCQWIDITDVKPGNYILKVSVNPSYLVPESDYTNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY
8.	ALVHCAPPAAGQQPPREPPAAPGAWRQIQWENNGQVFSLLSLGSQYQPQRRRDPGAAPGAANASAOQ RTPILLIRDNRATAARTTAGSSGYTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRAREAGASRAENQTAPEVPALSCLR PPSRVDGMVGDPPYNYFYKSDNPNYNYDTYERPRPGGRYRPGYGTGYFYGLPDLVADPVIQASTYVQ KMSMYNLRCAAEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQVKNQGTSDFLPSRPRYSWEWHSCHQYHSMDE FSHYDILLDANTQRRVAEGHKASFCLEDTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGCYDTYGADIDCQWIDITDVK GNYILKVSVNPSYLVPESDYTNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY
9.	DDPYNPYKSDNPNYNYDTYERPRPGGRYRPGYGTGYFYGLPDLVADPVIQASTYVQKMSMYNLRCA AEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQVKNQGTSDFLPSRPRYSWEWHSCHQYHSMDEFSHYDILLDAN TQRRVAEGHKASFCLEDTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGCYDTYGADIDCQWIDITDVKPGNYILKVSVN PSYLVPESDYTNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY

SEC ID Nº	Secuencia
10.	<p> gggcgtgattgagccccgtttttatbttgtagcccaagtcctcctcgaggggggtcaatctggccaaaa gtagtgatgctgctggaccgtgctcctgctcgggcccttgcagctctgcgctctgcgctgtagtgcactggc cctcccgcgccccggaacacagcagccccccggagccgccccggcctccggccgctccgcccagcaga tccaatgggagaaacacggcaggtttcagcttgctgagcctggctcacagtaccagcctcagcgcgc cgggaccgggcccctccctggtgcagcaaacgcctccgccagcagccccccactccgactcctgct gatccgcgacaaccgacccgcgcccgggagccggaacggcggagccggcctcatctggagtcacccgtggccgc ccaggccccccctcactggttccaaagctggctactcgacatctagagcccggaacggtggccctcg cgcgggagaaaccagacagcggccgggagaaagttcctcgctcagtaacctggccgcccagccggctgga cggcatggtgggagacccttaaacctcaagtaactctgacgacaaccttattacaactactag atactatgaaagcccagacctgggggaggtacccggcccggatagcggcactggcctcctccagtaagg ctcccagacctggtggccgaccctactacatccaggcgtccacgtagcgtgcagaagatgtccatgtacaa cctgegatgccccgggagaaactgtctggccagtagacatcacagggcagatgcagagattatgatc acagggctgctcagattccccaaagtagtaaaacacacagggacatcagatttcttaccagccgacca agatattcctgggaatggcacagttgtctcaacataccacagtaggatggatggattagccactatgacct gcttgatgccaacacccagaggaggtggcgtgactgcacacacacagggatttctgcttgaagacacatcct gtgactatggctaccacagggatttgcctgactgcacacacacagggatttctgcttgaagacacatcct acctatggtgcagacatagactgccagtggttccctgaaatctgactataccacaatggttgcgctgtgacatc ggtcagtgtaaacccagctacctggttccctgaaatctgactataccacaatggttgcgctgtgacatc gctacacaggacatcatcgtagctcagctgcacaaatccacctattagaaggcaaaagcaaaactcc caatggataaatcagtgctggttctgaaagggaataaaatagactaacctcagtaggatttatgtatt ttgaaaaagagaaacacaaaagaattttgtttggactgttttcaataacaaaagcacataactg gatbttgacgcttaagtcaatcattacttggaaatttntaatgtttattattttacatcaactttgtgaa taacacagtggttcaattctgtaatttcatttactcttt </p>
11.	<p> MRFAWTVLLGLQLCALVHCAPPAAAGQQPPREPPAAPGAWRQIQWENNGQVFLSLGSGYQPQRRRD PGARVPGAANASAOQPRTPILLIRDNRTAAARTKTAGSSGVTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRARERGASRA ENQTAPGEVPALESNLRPPSRVDGMVGDDEPNPKYSDDNPNYNYDYTYERPRPGGRYRPGYGTGYFYGLP DLVADPYIIQASTYVQKSMYNLRCAAEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQVRKNQGTSDFLPSRPY SWEWHSCHQHYHSMDEFSHYDLILDANTQRRVABGHKASFCLEDTSCDYGHRRFACTAHTQGLSPGCYDTY GADIDCQWIDITDVKPGNYILKVSVNPSYLVPESDYTNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY </p>

SEC ID N°	Secuencia
14.	<p>gggccaggactgagaaaaggggaaaggggaggggtgccacgtccgagcagccgcttgactggggaaggggtct gaatcccaccccttggcatlgtcttggtagactgagatcccgtgctccgctgctcccttggttgaagat tctccttccctcacgtattgagccccgttttattttctgtgagccacgtccctcctcgagcgggggtca atctggcaaaaaggagtgatggcttggctggaccgtgctcctcctcgggccccttgacgctctgagcgtctg gtgcactgcccctcccgcggcccaacagcagccccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc ggcagcagatccaatgggagaacaacggcgggtgtccagcttgcagcccaacggctccgcccagcagccccgda ctgagcgcggggaacccggccggccgctccctggtagcccaacggctccgcccagcagccccgda ccgatcctgctgatccgcacaacggcagccggcggggaacggcgggactgagcggggtcactctggagtca cgctggcccgggcccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcgg ctggcccctgcgcgggagaccagacagcgcgggagagttcctgctcagtaaccctgcggcccggccc agccgctggagcggcatggtgggagcagacccttacaaccctcaagtaacttgacgacaacccttatta caactactacgatacttatgaaaggcccagacctggggcaggtaccggcccggatcggcactggctact tccagtacggctcccagacctggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcgg tccatgtacaacctgagatgcgcggcggaggaacactgctggccagctacagatacagggcagatgtcag agattatgatcacaggggtgctgctcagattccccaaagagtgaacccccaaaggggacatcagatttcttac ccagccgaccaagatattcctgggaatggcacagttgtcatcaacttaccacagttatggatgagtttagc cacttgtaacctgctgatgccaacacccagagagatgggctgaaagggccacaagcaagttctgctcttga agacacatcctgtgactatggctaccacagggatttgcattgctgacacacacacagggattgagtcctg gctgttatgatacctatggtgcagacatagactgacagtgattgatatcacagatgtaaacctgggaaac tatacctaaaggctcagtgtaaaacccagctaccctggctcctgaaatctgactataccacaatgctgctg ctgtgacattcgtcacacagacatcagctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg agcaaaactcccattggataaatcagtgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg atttatgtatatttgaanaagagacagaaacacaaagaatttttggactgttttcaataacaaa gcacataactggattttgaaagccttaagtcattacttgggaaatttttaaattttatttatttacaatca ctttgtgaaattaacacagtgtttcaattctgtaatttactctttcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaa</p>
15.	<p>MRFAWTVLLGLPLQLCALVHCAPPAAGQQPPREPPAAPGAWRQQIQWENNGQVPSLLSLGSQYQPQRRRD PGAAVPGAANASAOQPRTPILLIRDNRTAAGRTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRAREAGPSRA ENQTAPGEVPALSNLRPPSRVDGMVGGDDPYNPKYSDDNPFYXNYDTERPRPGRYRPGYGTGYFQYGLP DLVADPYIQAQSTYVQKMSMNLRCABENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFQRVKNQCTSDFLPSRERY SWEHSHQHYHSMDEFSLYLLDANTQRRWAEHGKASFLEDTSCDYGHRRFACHTAHTQCLSPGICYDTY GADIDCQWIDIITDVKPGNYLLKVSVPYLVPESDYTNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY</p>

SEC ID N°	Secuencia
16.	<p>ccggccgctcccggttgccctccaggactgagaaaggggaaagggggtgccacgctccgagcagccgc cttgactgggaaaggggtctgaaatcccacccctggcattgcctgtggagactgagatacccgctccgct cgccctccttgggtgaaagattctcctccctcacgtgattgagcccgcttttatttctgtgagccacg tcctcctcagaggggtcaatctggcaaaaggagtatcgcttcgctgacccgtgacccgtcctgctcgggccc tttgagctctggcgttagtgactgcccctccggcccgccggccaaacagcagcccccggcggagccgc cggggctccgggcctgggcccagcagatccaatgggagaaacagggcagggtgttcagcttgctgagc ctgggctcacagttaccagcctcagcccgccgggccccgggcccggctccctggtgcagcccaacgccc cgccagcagcccgactccgatcctgctgatccggacaaaccgaccccgccggcggcgaacggcggacgg cggctcattctggagtcaaccgtggccggccccagggccccccggctcactgggtccaaagctggctactcg acatctagagcccggaagctggcgccctcgcgccggagaaaccagacagccgaggagaagtccctgcgct cagtaacctggggcccgccagccgctggacggcatggtgggagcagaccctacaaccctacaagtact ctgacgacaaccttataaactactacgatcttatgaaagccagacccagctggggccaggtaccggccc ggatacggctggctactccagtagcggctcctccagaccctggctggccggaccctactacatccaggcgtc cacgtacgtgcagaagatgtccatgtacaacctgagatcgccggggagaaacctgtctggccagttacag catacagggcagatgtcagagattatgatcacagggctgctcagattccccaaagagtgaaaaaccaa ggacatacagattcttaccagccgaccaagatactcctgggaatggcacagttgtcatcaacattacca cagtatggatgagtttagccactatgacctgctgatgccaaacccagagagagtggtggaagggccaca aagcaagttctgtcttgaaagacacatcctgtgactatggctaccacagggcattgcatgtactgacacac acacagggattgagtcctggctgttatgatacctatggtgcagacatagactgccagttgattgatattac agatgtaaaacctggaaactatacttaagggtcagtgtaaacccagctacctggctccctgaatctgact ataccaaactgttgcgctgtgacattcgtaacaggacatcatggctcaggtatgctcaggtgcacaact tcaaccgtattagaaggcaagcaaaactccccaatggataaaatcagtgccctgggtgtctcgaagtgggaaaaa atagactaaactcagtaggatttatgtatttgaaaaagagagacagaaaaacaaaaagaattttgtttg gactgttttcaataaacaagcacataactggattttgaaagcttaagtcacattacttgggaaaaatttta atgtttattattacatcaacttgtgaaataaacacaggttttcaattctgtaattacataatttgactcttt caaagaaatccaaaattctcatgttcttttgaaaattgtagtgcaaaatggtagtattatctaaaatgaat gagccaaaatgacttgaaactgaaactttctaaagtctggaaacttagtgaaacataataataatgggt ttatacgcagcaaacgga</p>
17.	<p>MRFAWTVLLGLQLCALVHCAPPAAGQQPPREPPAAPGAWRQIQWENNGVFSLLSLGSQYQFQRRRD PGAAVPGAANASAOQPRTPILLIRDNRATAARTTAGSSGVTAGRRPRTPAPHPFQAGYSTSRAREAGASRA ENQTAPGEVPALNSLRPPSRVDGMVGDDDPYNYKYSDDNFYNYDTYERPPGGRYRPGYGTGYFYGLP DLVADPYIQASTYVQKSMYNLRCAABENCLASTAYRADVRDYDRVLLRFPQRVKNQGTSDFLPSRPRY SWEHSCQHYHSMDEF SHYDLDANTQRRVAEGHKASFLEDTS CDYGVHRRFACTAHTQGLSPGCYDTY GADIDCQWIDI TDVKPGNYILKVSWNPSYLVPESDYTNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY</p>

SEC ID N°	Secuencia
18.	<p>ggccaatctggcaaaaaggagtgatgcgcttgcgctggaccgtgctctcgctcgggccccttgcagctctgcg cgctagtgcactggccctcccgccgcccggcacaacagcagcagcccccggcggcggcggcggcggcggcggc gcctggcggccagcagatccaatgggagaaacacggggcagggtgtcagcttgcctgagcctgggctcacagta ccagcctcagcggccgggacccgggcccggcctcctggcggcagcaacgcctccgcccagcagcccc gcactccgatcctgctgatccggcgaacacccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc gtcaaccgctggccggccaggcccaacggcctcactggctccaagctggcctactcggacatctagagcccg cgaagctgggcccctcgccgagagaaaccagacagcggcggggaagttcctgcctcagtaaacctgcggc cggcagccggcgtggacggcaatggcggggcagcagccctacaaccctacaagtaactcgcagacaaccct tattacaactactacgatcactatgaaaggcccagacctggggggagtaaccggcggcggcggcggcggc ctacttccagtaaggctccagacctggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc agatgtccatgtacaacctgagatgcgcccggggaggaactgtctggccagtaacagcacaacagggcagat gtcagagattatgatcacagggctgctcagattccccaaagagtgaaaaaaccaaggggacatcagattt cttaccagccgaccaaagatctcctgggaatggcacagtgtctcaacatcaccacagtatggatgagt ttaggccactatgacctgctgatgccaacaccagaggagagtggtggctgaaggccacaaagcaagtttctgt cttgaaagacacatcctgtgactatggctaccacagggcgtttggcagtgactgcacacacacagggattgag tcctggctgtatgatacctatggcgcagacatagactgcccagtggtgatattacagatgtaaaacctg gaaactatcctaaaggtcagtgtaaacccagctacctgggtccctgaaatcctgactataccaacaatgtt gtgcgctgtgacattcgctacacaggacatcatgcgtatgcctcaggctgcacaatttcaccgatttagaa ggcaaaagcaaaactccaatggataaaatcagtgctggtgtct</p>
19.	<p>MRFAWTVLLGLQLCALVHCAPPAAAGQQPPPREPPAAGANRQIQWENNGQVFLLSLGSQYQPORRRD PAAVPGAANASAOQPRTPILLIRDNRTAAARTTAGSSGVTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRAREAGASRA ENQTAPGEVPALENSLRPPSRVDMVGDDPNPKYSDDNFYNYDYTERPPRCGRYRPGYGFYQYGLP DLVADPYIQASTYVQKMSYMLRCAEENCLASTAYRADVRDYDRVLLRFPQRVKNQTSDFLPSRPRY SWEHSCHQHYHSNDEFSHYDLLDANTQRRVAEGHKASFLEDTSDDYGHRRFACTAHTQGLSPGCDTY GADIDCQWIDITDVKPGNYILKVSVPNSYLVPESDYTNNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY</p>

SEC ID Nº	Secuencia
23.	FSLLSLGSQYQFQRRRDPGAAPFGAANASAOQPRTPILLIRDNRTAAARTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWF QAGYSTSRAREAGASRAENQATAPGEFALSLSLNRPPSRVDMGVDDPYNPYKYSDDNPYYNYDYTYERPRPG GRYPGYGTGYFQYGLPDLV
24.	MEWSRVFIFLLSVTAGVHSQVQLQOSGAELVRPCTSVKUSCKASGYAFTYYLIEWVKQRPGQGLEWIGVIN <u>PGSGGTTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARNWMPDYWGQTTTVSS</u>
25.	QVQLVQSGAELKPKGASVKVSCKASGYAFTYYLIEWVKQAPQGLEWIGVINPQSGGTTNYNEKFKGRATLT ADKSTSTAYMELSSLRS _{ED} SAVYFCARNWMPDYWGQTTTVSS
26.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTYYLIEWVQAPQGLEWIGVINPQSGGTTNYNEKFKGRATLT ADKSTSTAYMELSSLRS _{ED} TAVYFCARNWMPDYWGQTTTVSS
27.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTYYLIEWVQAPQGLEWIGVINPQSGGTTNYNEKFKGRATLT ADKSTSTAYMELSSLRS _{ED} TAVYFCARNWMPDYWGQTTTVSS
28.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTYYLIEWVQAPQGLEWIGVINPQSGGTTNYNEKFKGRVTT ADKSTSTAYMELSSLRS _{ED} TAVYFCARNWMPDYWGQTTTVSS
29.	MRC _{LA} EFLGLLVLIWIPGAI _{CD} IVMTQAPSVSVTPGESVSI _{SCR} SSKSLHNSNGNTLYLWFLQRPQSQPQF LIIYRMSNLAGVDRFRFSGSGTFTLRISRVEAEDGVVYCMQHLEYPTFFGGTKLEIK
30.	DIVMTQTPLSLSVT _{PG} QPASIS _{CR} SSKSLHNSNGNTLYLWFLQKPGSQPFLIYRMSNLAGVDRFRFSGG SGTFTLKI _{SR} VEAEDGVVYCMQHLEYPTFFGGTKVEIK
31.	DIVMTQTPLSLSVT _{PG} QPASIS _{CR} SSKSLHNSNGNTLYLWFLQKPGSQPFLIYRMSNLAGVDRFRFSGG SGTDFTLKI _{SR} VEAEDGVVYCMQHLEYPTFFGGTKVEIK
32.	DIVMTQTPLSLSVT _{PG} QPASIS _{CR} SSKSLHNSNGNTLYLWVLIQKPGSQPFLIYRMSNLAGVDRFRFSGG SGTDFTLKI _{SR} VEAEDGVVYCMQHLEYPTFFGGTKVEIK
33.	MEWSRVFIFLLSVTAGVHSQVQLQOSGAELVRPGTSVKVSCKAS
34.	WVKQRPGGLEWIG
35.	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCAR
36.	WGQGTTTVSS
37.	QVQLVQSGAELKPKGASVKVSCKAS
38.	WVKQAPGQGLEWIG
39.	RATLTADKSTSTAYMELSSLRS _{ED} SAVYFCAR
40.	WGQGTTTVSS

SEC ID N°	Secuencia
41.	GYAFTY ¹ YLIE
42.	VINPGSGGTNYNEKFKG
43.	NWNMF ² DY
44.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS
45.	WVRQAPGGGLEWIG
46.	RATLTADKSITAYMELSSLRSEDTAVYFCAR
47.	RATITADKSITAYMELSSLRSEDTAVYFCAR
48.	RVTITADKSITAYMELSSLRSEDTAVYFCAR
49.	MRC ³ LAEFGLLVLPWIPGAIGDIVMTQAAPSVVTPGESVSISC
50.	WFLQRPQQSPQLIY
51.	GVPDRFSGSGGTAF ⁴ TLRISRVEAEDVGVYYC
52.	FGG ⁵ TKLEIK
53.	DIVMTQTP ⁶ LSLSVTPGQPASISC
54.	WFLQRPQQSPQLIY
55.	GVPDRFSGSGGTAF ⁷ TLKISRVEAEDVGVYYC
56.	FGG ⁸ TKVEIK
57.	RSSKSLH ⁹ SNGNTLY
58.	RMSNLAS
59.	MQHLEYPYT
60.	GVPDRFSGSGGTDF ¹⁰ TLKISRVEAEDVGVYYC
61.	WY ¹¹ LQRPQQSPQLIY
62.	Los sitios de escisión alternativos pueden encontrarse entre los aminoácidos 21 y 22 de la preproteína en comparación con SEC ID N°: 8

SEC ID N°	Secuencia
63.	<p> APPAAGQQPPPREPPAAPGAWRQQIQWENNGQVFSLLSLGSQYQPORRRDPGAAVPGAANASAAQQRTPIL LIRDNRTAARTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRAREAGASRAENQTAPEVPAALSNLRPPSRV DGMVDDPNPYKYSDDNPIYNYDYTYERPRPGGRYRPGYGTGYFYGLPDLVADPYIQASTYVQKMSMY NLRCAAEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRKQGTDFLPSRPFYSWEWHSCHQHYHSMDEFESHYD LLDANTQRRVAEGHKASFLEDTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGICYDTYGADIDCQWIDIITDVKPGNYIL KSVNPSYLVPESDYTNNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY </p> <p>Los sitios de escisión alternativos pueden encontrarse entre los aminoácidos 27 y 28 de la preproteína en comparación con SEC ID N°: 8</p> <p> QQQPPPREPPAAPGAWRQQIQWENNGQVFSLLSLGSQYQPORRRDPGAAVPGAANASAAQQRTPILIRDNR TAAARTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRAREAGASRAENQTAPEVPAALSNLRPPSRVDMVGD DPYNPYKYSDDNPIYNYDYTYERPRPGGRYRPGYGTGYFYGLPDLVADPYIQASTYVQKMSMYNLRCAA EENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRKQGTDFLPSRPFYSWEWHSCHQHYHSMDEFESHYDLDANT QRRVAEGHKASFLEDTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGICYDTYGADIDCQWIDIITDVKPGNYILKSVNPN SYLVPESDYTNNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY </p>
64.	<p>Secuencia de ARNm de LOX humana</p> <p> ATGGCGTTTCGCCGTGGACCGTGTCTCCTGCTCGGGCCTTTGCAGCTCTCGCGGCTAGTGCACTGGCGCCCTCC CGCCCGCGCCAAACAGCAGCCCCCGCGGAGCCCGCGGGCTCCGGGGCGCTGGCCAGCAGATCCAAAT GGGAGAACAAACGGGCAGGTGTTTCAGCTTGTGAGCCTGGCTCACAGTACCAGCCTCAGCGCCGCGGGGAC CCGGGCGCGCCTCCCTGGTGCAGCCAAACGCTCCCGCCAGCAGCCCGCCTCCGATCCTGCTGATCCG CGAACACCGCACCGCGCGGGGGAACGGGACGGCCGGCTCATCTGGAGTCAACCGTGGCGCCCGCCAGGC CCACCGCCGTCACCTGGTTCCAAGCTGGCTACTCGACATCTAGAGCCCGGAAGCTGGCGCTCGCGCGCG GAGAACACAGACAGCCCGGGGAGAAGTTCTGCGCTCAGTAACTCTGGCGCCCGCCAGCCCGTGGACGGCAT GGTGGCGACGACCCCTTACAACCCCTACAAGTACTTGACGACAAACCCCTTATTACAACACTACGATACCTT ATGAAAGGCCAGACCTGGGGCAGGTACCGGCCGGATACGGCACTGGCTACTCCAGTACGGTCTCCCA GACCTGGTGGCCGACCCCTACTACATCCAGCGGTCCACGTACGGTGCAGAAAGATGTCCATGTACAACCCTGAG ATGGCGCGCGAGGAAACTGTCTGGCCAGTACAGCATAACAGGGCAGATGTGAGAGATATGATCAGCAGGG TGCTGCTCAGATTTCCCAAGAGTGAATAACCAAGGGACATCAGATTTCTTACCAGCCGACCAAGATAT TCCTGGGAATGGCACAGTTGTCATCAACATTAACAAGTATGGATGAGTTTAGCCACTATGACCTGCTTGA TGCCAACACCCAGAGGAGTGGCTGAAGCCCAAAAGCAAGTTTCTGTCTTGAAGACACATCCTGTGACT ATGGCTACACAGCGGATTTGTCATGTACTGCACACACAGGGATGAGTCTGGCTGTTATGATACCTAT GGTGCAGACATAGACTGCCAGTGGATGATATTAACAGATGTAAACCTGGAAACTATATCCTAAAGGTGAG TGTAAACCCAGCTACCTGGTTCTGAACTGACTATACCAACAATGTTGTGGCTGTGACATTCGGCTACA CAGGACATCATGCGTATGCCCTCAGGCTGCACAATTTACCCGTAT </p> <p>Secuencia de proteína de LOX humana</p>

SEC ID N°	Secuencia
65.	<p>MRFAWTVLLGLQLCALVHCAPPAAGQQPPREPPAAPGAWRQQIQWENNGQVFSLLSLGSQYQPQRRRD PGAAVPGAANASAAQPPRTPIILLIRDNRTAAARTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRAREAGASRA ENQTAPGEVPALSNLRPPSRVDGMVGDPPYNPYKYSDDNPYNYDYTYERPPRGGRYRPGYGTGYFQYGLP DLVADPYIQASTYVQKMSMYNLRCAEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVKNQGTSDFLPSRPRY SWEHSCHQHYHSMDEFSHYDLLDANTQRRVAEGHKASFCELEDTSCDYGHRFACTAHTQGLSPGCCYDTY GADIDCQWIDIITDVKPGNYLLKYSVNPSPYLVPESDYTNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY</p>

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a una proteína similar a lisil oxidasa 2 (LOXL2), en donde dichos anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se unen específicamente a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6 e inhiben la actividad enzimática de la proteína LOXL2, en donde la inhibición es no competitiva.
2. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento comprenden una cadena pesada variable que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 1.
3. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo o el fragmento comprenden una cadena ligera variable que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 2.
4. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dichos anticuerpo o fragmento de unión a antígeno están humanizados o son humanos.
5. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo o el fragmento están humanizados y comprenden las CDR de cadena pesada variable que tienen las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de GYAFTYYLIE (SEC ID N°: 41), VINPGSGGTNYNEKFKG (SEC ID N°: 42) y NWMNFDY, respectivamente, y las CDR de cadena ligera variable que tienen las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de RSSKSLHNSNGNTYLY (SEC ID N°: 57), RMSNLAS (SEC ID N°: 58) y MQH-LEYPYT (SEC ID N°: 59), respectivamente.
6. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 4 o 5, en donde el anticuerpo o el fragmento están humanizados y tienen una cadena pesada variable que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 25, 26, 27 o 28.
7. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 6, en donde la cadena pesada variable comprende la SEC ID N°: 27.
8. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en donde el anticuerpo o el fragmento están humanizados y tienen una cadena ligera variable que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 30, 31 o 32.
9. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 8, en donde la cadena ligera variable comprende la SEC ID N°: 31.
10. Un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que compiten con un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprenden una cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 1 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 2 por la unión a LOXL2.
11. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el anticuerpo o el fragmento están marcados con un marcador terapéutico o un marcador diagnóstico.
12. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el anticuerpo o el fragmento están marcados con un marcador detectable.
13. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el anticuerpo o el fragmento son un Fv, un scFv, un Fab, un F(ab')₂, un anticuerpo diseñado por ingeniería genética, o un anticuerpo monoclonal.
14. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, para su uso en un método para reducir el crecimiento tumoral, reducir la metástasis, inhibir la angiogénesis, tratar la fibrosis o disminuir la formación de matriz extracelular.
15. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dichos anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se usan en combinación con un segundo agente terapéutico.
16. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el segundo agente terapéutico es un anticuerpo o un agente quimioterapéutico.

17. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicha fibrosis es una fibrosis hepática, una fibrosis pulmonar, una fibrosis renal, una fibrosis cardíaca o escleroderma.
- 5 18. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicha fibrosis pulmonar es fibrosis pulmonar idiopática (FPI), alveolitis fibrosante criptogénica, neumonía intersticial fibrosante crónica, enfermedad pulmonar intersticial (ILD), enfermedad pulmonar parenquimal difusa (DPLD), enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o asma crónica.
- 10 19. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicha fibrosis hepática es cirrosis, hepatitis viral crónica, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis alcohólica (ASH), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis biliar primaria (PBC), cirrosis biliar o hepatitis autoinmune.

FIGURA 1**Enzimología de lisil oxidasa**

Las enzimas LOX/L actúan por medio de un mecanismo de ping-pong que puede describirse mediante la cinética de Michaelis-Menten

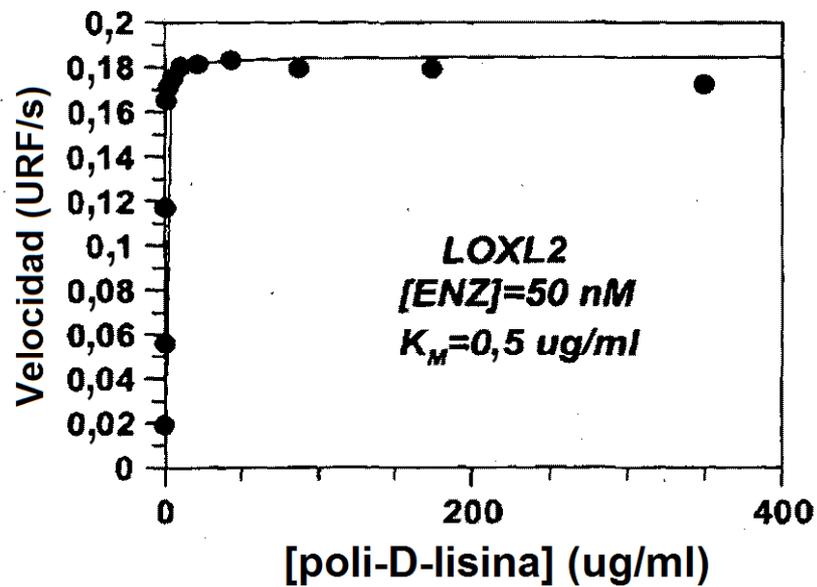


FIGURA 2
Modos comunes de inhibición enzimática

Inhibición competitiva

- El inhibidor normalmente tiene similitud estructural con respecto al sustrato.
- Inhibición perceptible a bajas concentraciones de sustrato pero pueden superarse a altas concentraciones de sustrato.

Inhibición a competitiva

- El inhibidor se une en el sitio que esté disponible después de que el sustrato se una al sitio activo
- Inhibición más perceptible a alta concentración de sustrato

Inhibición no competitiva

- El inhibidor se une a un sitio que está lejos del sitio de unión del sustrato
- La inhibición relativa es la misma a todas las concentraciones de sustrato.

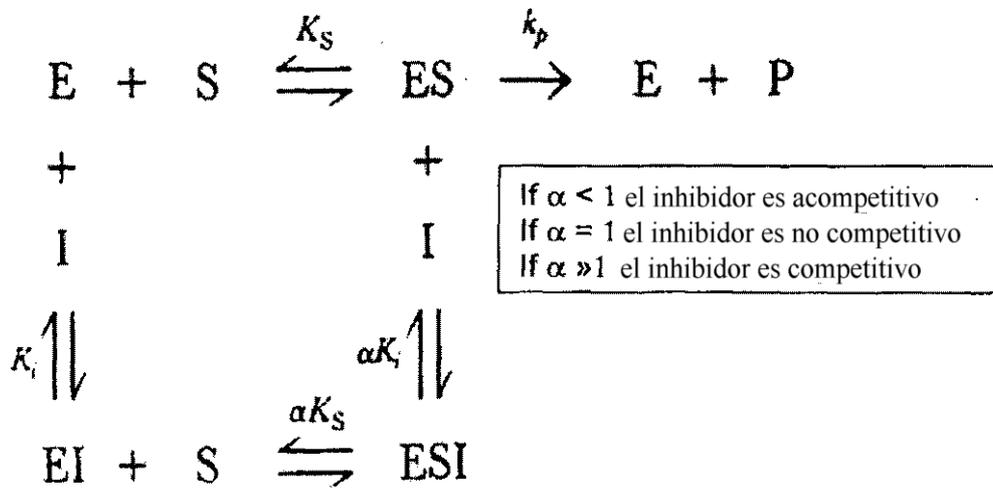


FIGURA 3
 β APN es un inhibidor no competitivo de LOXL2

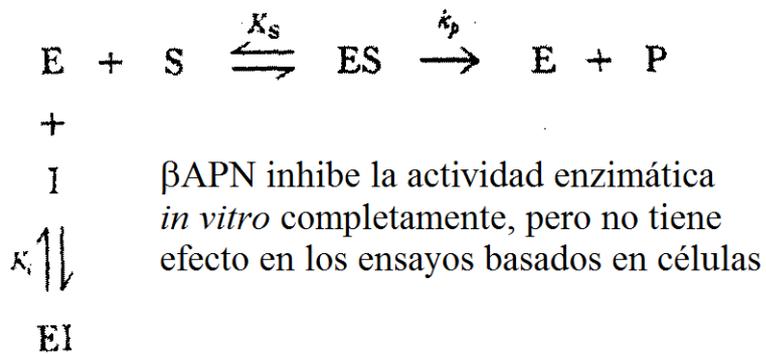
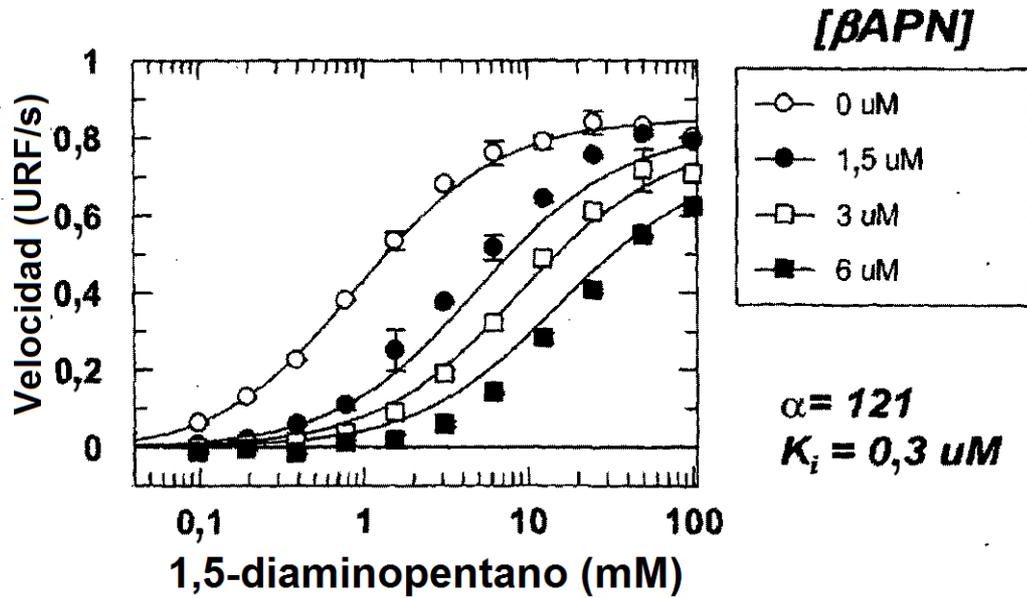


FIGURA 4
Modos inhibición enzimática: LOXL2

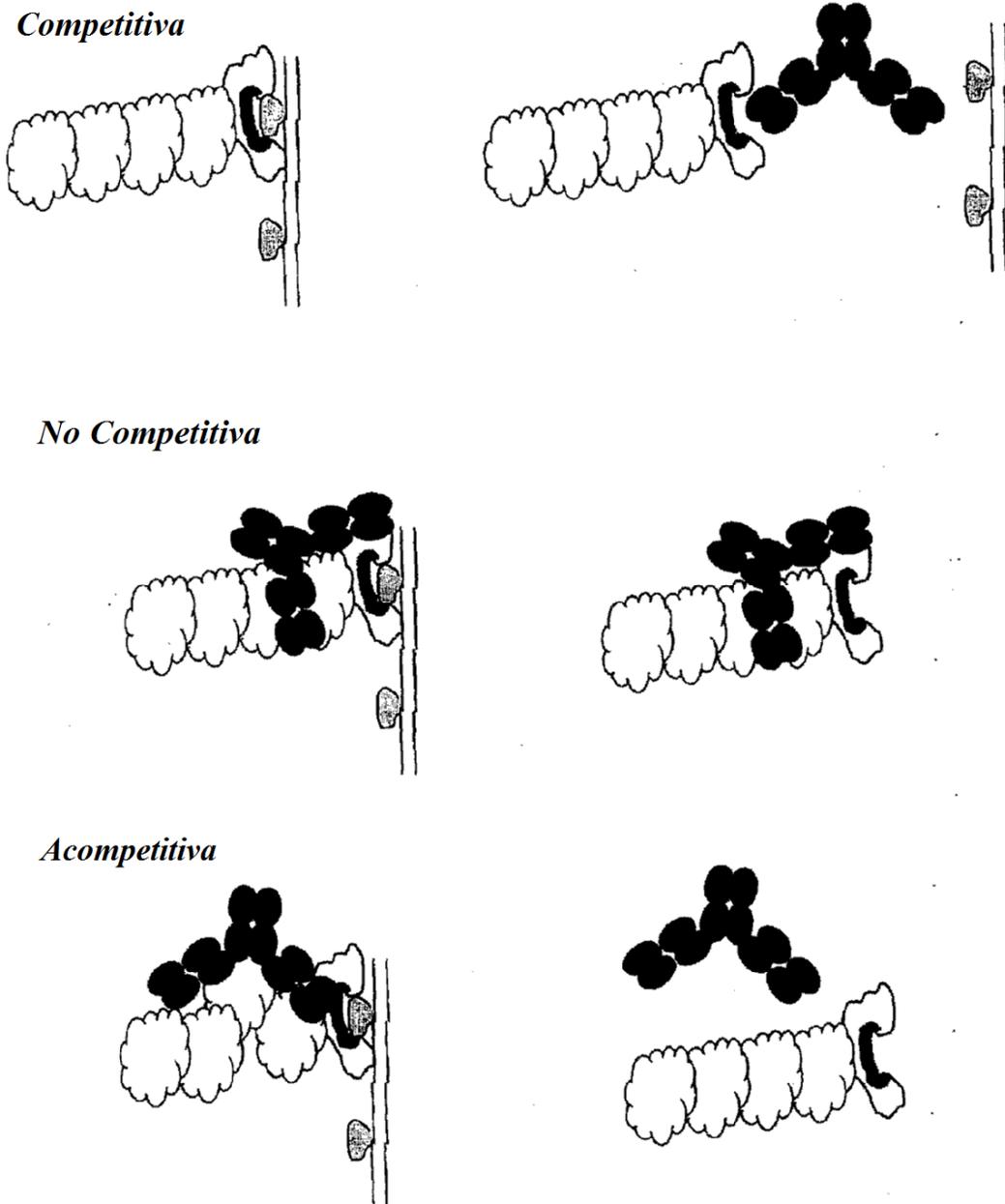


Figura 5
LOXL2 extracelular: Localización y Función

A alta densidad celular, LOXL2 se secreta y detecta unida a la matriz y, en medio condicionado, un anticuerpo bloqueante se unirá covalentemente a todos los estados e inhibirá todas las actividades

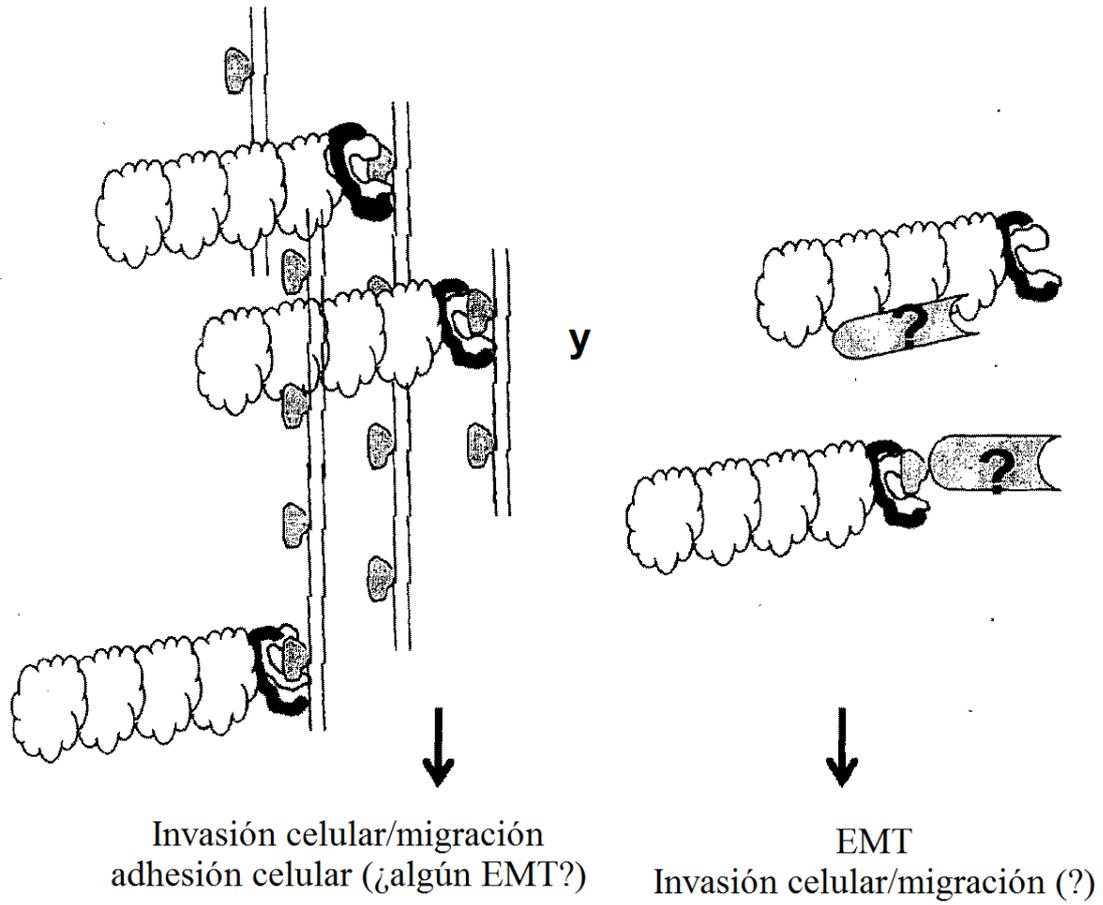


Figura 6
Anticuerpo anti-LOXL2 monoclonal murino

A. Cadena pesada variable

MEWSRVFIFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVRPGTS
VKVSCKASGYAFTYYLIEWVKQRPQGGLWIGVI
NPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSS
LTSDDSA VYFCARNWMNFDYWGQGTTLVSS
(SEC ID N°: 1)

B. Cadena ligera variable

MRCLAEFLGLLVLWIPGAIGDIVMTQAAPSVSVTPG
ESVSISCRSSKSLHLSNGNTYLYWFLQRPQSPQFL
IYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAED
GVVYYCMOHLEYPYTFGGGKLEIK
(SEC ID N°: 2)

Figura 7
Anticuerpo anti-LOX

A. Cadena pesada variable

MGWSWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVKPGASVKLSC
KASGYTFRSYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTKYNEK
FKGKAILTTDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARVYYAMD
YWGQGTSVTVSS..(SEC ID N°: 3)

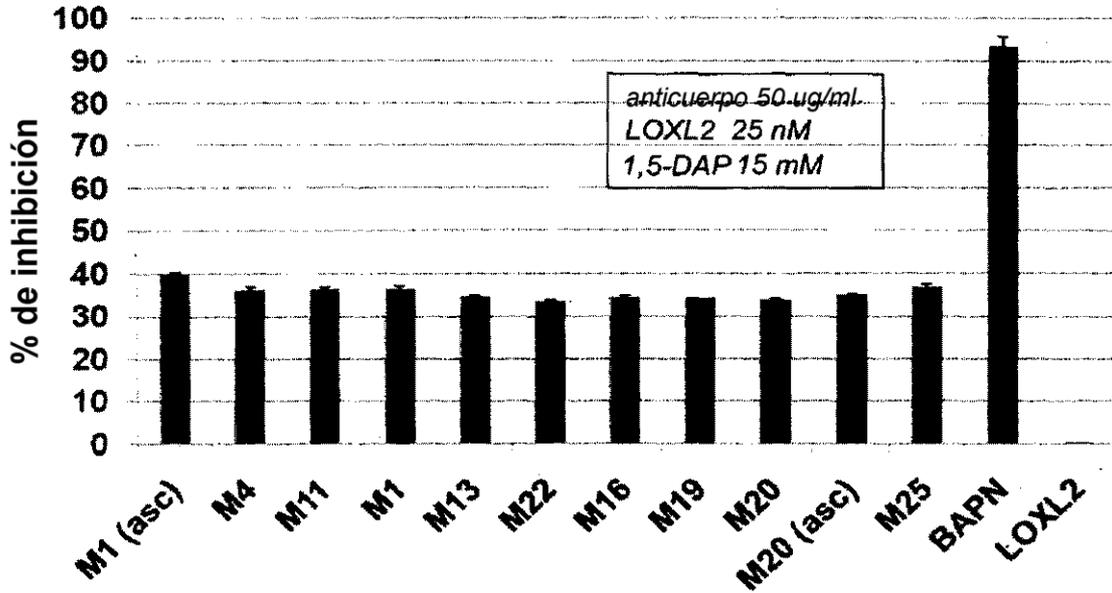
B. Cadena ligera variable 1

MKLPVRLLVMFVIPASSSDVLLTQTPLSLPVSLGDOASISCRSS
QSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSINRFSGVPDRF
GGSGGTDFTLKINRVEAEDLGIYYCFQSSHIPLTFGAGTKLE
LKRAD...(SEC ID N°: 4)

C. Cadena pesada variable 2

MKLPVRLLVMFVIPASSSDVLLTQTPLSLPVSLGDOASISCRSS
QSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSIRFSGVPDRFG
GGSGGTDFTLKINRVEAEDLGIYYCFQSSHIPLTFGAGTKLEL
KRAD... (SEC ID N°: 5)

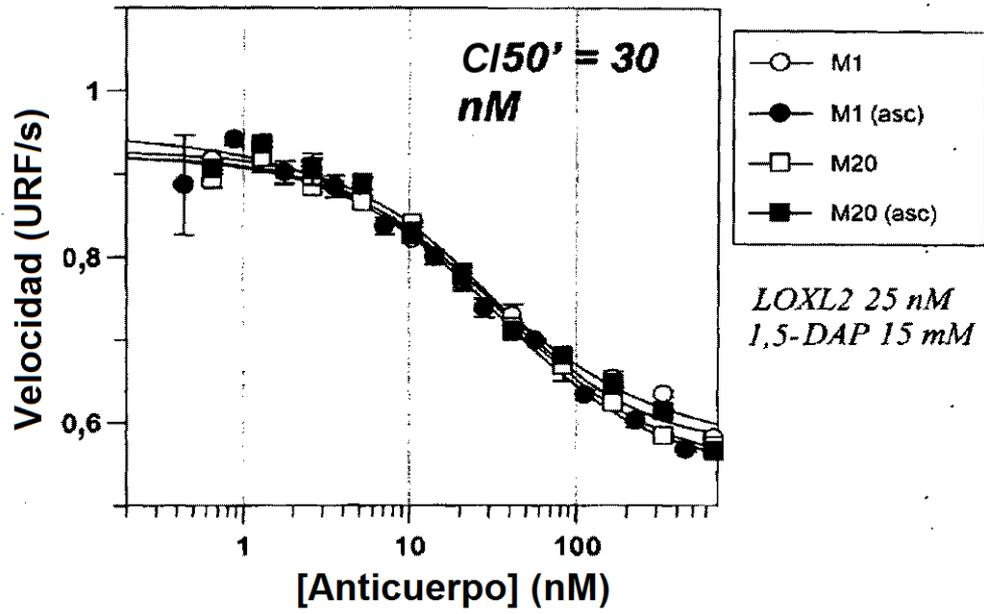
Figura 8
Anticuerpos anti-LOXL2: Actualización proteína Exploración B
Evaluación de la actividad enzimática de LOXL2



Anticuerpo anti-LOXL2 designado AB0023

- Actividad inhibidora observada en 10 ml del material de la proporción en el ensayo enzimático
- La inhibición también se repetirá en ensayos basados en células
- El análisis de secuencia confirma que M01, M16, M19, M20 son idénticos

Figura 9
Anticuerpo anti-LOXL2 AB0023 y actividad enzimática



AB0023 es un inhibidor parcial de la actividad enzimática de LOXL2 con una CI_{50} aparente de ~30nM

Figura 10
 Anticuerpo anti-LOXL2 AB0023: un inhibidor no competitivo

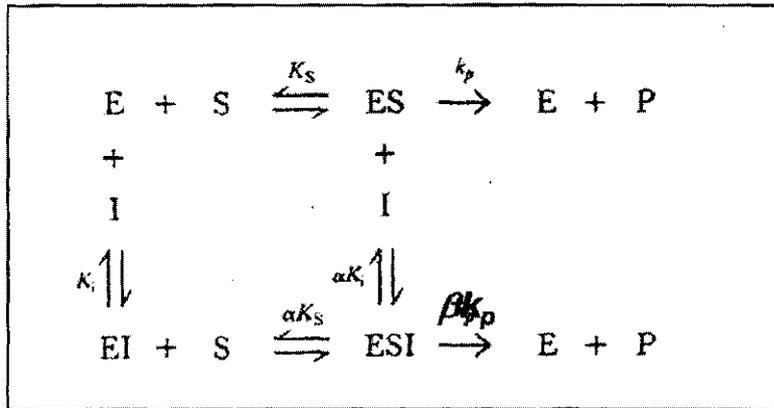
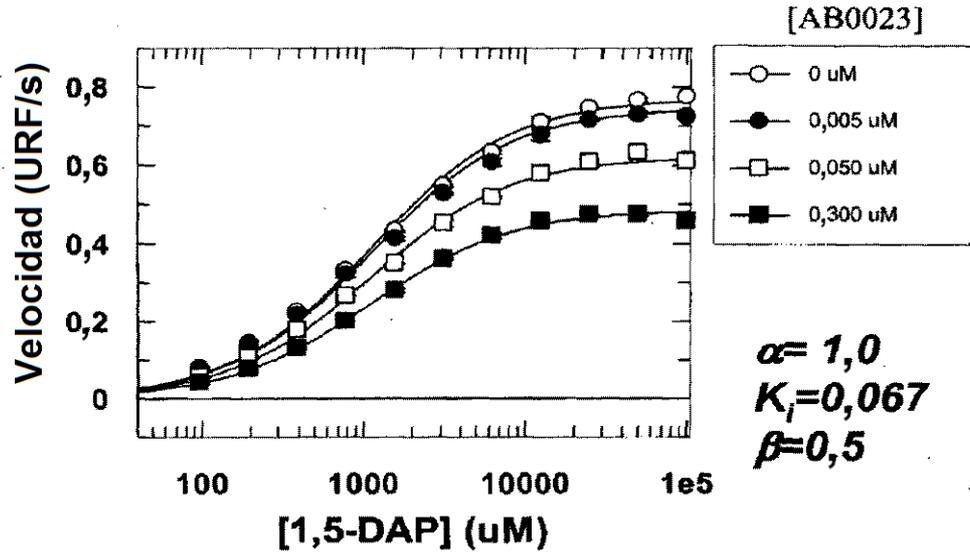
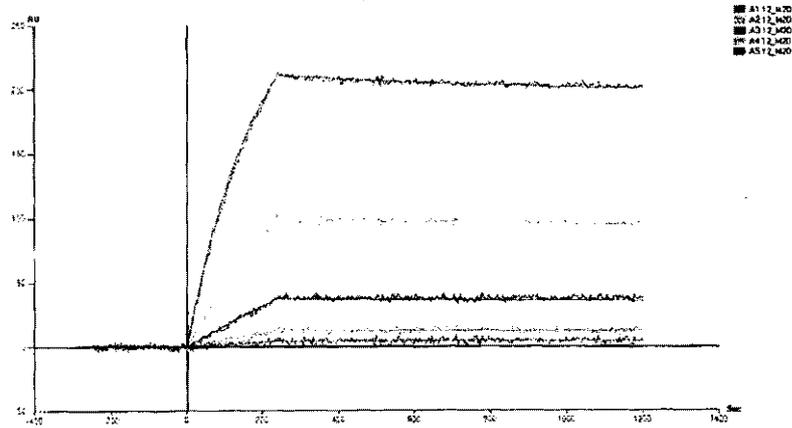


Figura 11

Anticuerpo anti-LOXL2 AB0023: Afinidad de unión y velocidad de disociación



Análisis usando el ProteOn

1 ug/ml de AB0023 (M20) inmovilizado en un chip

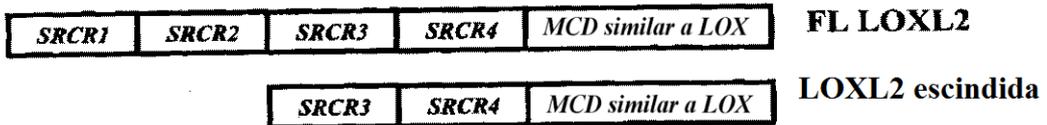
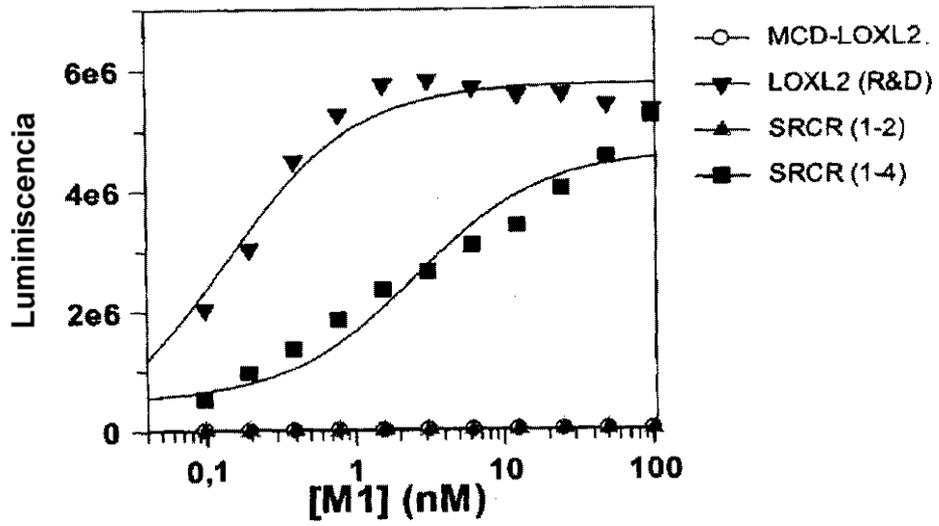
Se aplicó LOXL2 en concentraciones variables al chip

- $k_{on}=1,68 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$
- $k_{off}=1,17 \times 10^{-4} s^{-1}$
- $K_D=0,69 nM$
- $t_{1/2}=98,7 min$

**El anticuerpo se une muy fuertemente y se libera muy despacio
Kd estimada de diversos métodos 0,1 – 1,0 nM**

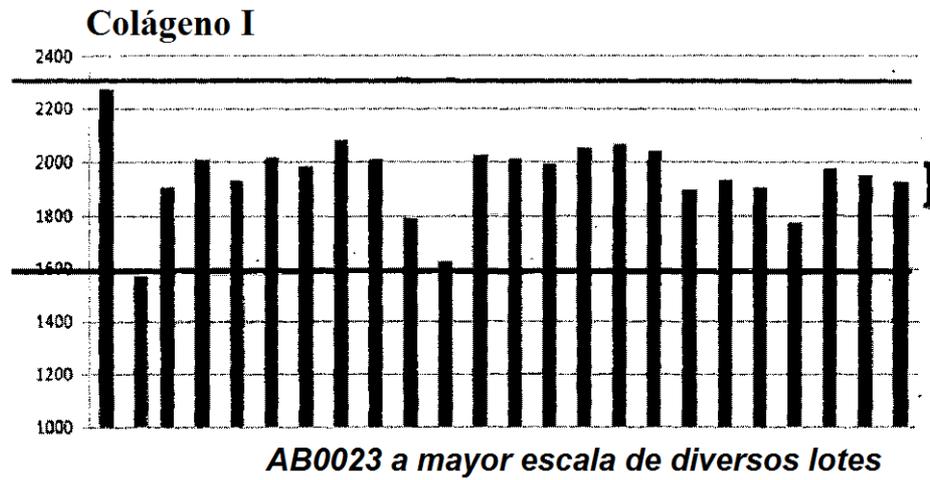
Figura 12

Mapeo de los dominios de anticuerpo anti-LOXL2 AB0023
 AB0023 se une al dominio SRCR 3-4



AB0023 se une al dominio SRCR 3-4

Figura 13
Anticuerpo anti-LOXL2 AB0023: Ensayos basados en células



- Inhibición consistente de la migración/invasión en colágeno I y colágeno IV, de sobrenadantes a través de 10 ml del material de la proporción y 100 ml de la proporción a mayor escala y material ascítico.
- También se observó inhibición parcial en el ensayo de adhesión celular

FIGURA 14

A. AB0023 (exploración de la proteína hLOXL2 B clon M20) VH frente a las variantes humanizadas 1-4

CDR1 GYAFTYYLIE
 CDR2 VINPFGSGGTNYNEKFKG
 CDR3 NWMNFDY

Restos en AB0023 humanizados que difieren del AcMo de ratón (en cursiva y subrayado):

M20 VH.pro	MEWSRVFIFLLSVTAGVHSQVQLQCSGAELVRPCTSVKVSCKASGYAFTYYLLEWVKQRPGQGLEWIGVI	70
VH variante 1.pro	-----QVQLVQSGAELKPKGASVKVSKASGYAFTYYLLEWVKQAPGQGLEWIGVI	51
VH variante 2.pro	-----QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYAFTYYLLEWVVRQAPGQGLEWIGVI	51
VH variante 3.pro	-----QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYAFTYYLLEWVVRQAPGQGLEWIGVI	51
VH variante 4.pro	-----QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYAFTYYLLEWVVRQAPGQGLEWIGVI	51
M20 VH.pro	NPFGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSPAYMQLSSLTSDSAVYFCARNWNNFDYWGQGTTLTVSS	135
VH variante 1.pro	NPFGSGGTNYNEKFKGRATLTADKSTPAYMELSSLRSEDSAVYFCARNWNNFDYWGQGTTLTVSS	116
VH variante 2.pro	NPFGSGGTNYNEKFKGRATLTADKSTPAYMELSSLRSEDTAVYFCARNWNNFDYWGQGTTLTVSS	116
VH variante 3.pro	NPFGSGGTNYNEKFKGRATLTADKSTPAYMELSSLRSEDTAVYFCARNWNNFDYWGQGTTLTVSS	116
VH variante 4.pro	NPFGSGGTNYNEKFKGRVITADKSTPAYMELSSLRSEDTAVYFCARNWNNFDYWGQGTTLTVSS	116

B. AB0023 (exploración de la proteína hLOXL2 B clon M20) VL (Vκ) frente a las variantes humanizadas 1-3

CDR1 RSKSLLHSNGNTYLY
 CDR2 RMSNLAS
 CDR3 MQHLEYPYT

Restos en AB0023 humanizados que difieren del AcMo de ratón (en cursiva y subrayado):

M20 VL.pro	MRCIAEFLGLLVLWIPQAIQDIVMTQAAPSVSVTPGESVSI CRSSKSLLSHSNGNTYLY WFLQRFQSPQ	70
Vκ variante 1.pro	-----DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSLLSHSNGNTYLYWFLQRFQSPQ	50
Vκ variante 2.pro	-----DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSLLSHSNGNTYLYWFLQRFQSPQ	50
Vκ variante 3.pro	-----DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSLLSHSNGNTYLYWFLQRFQSPQ	50
M20 VL.pro	FLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGGTAFTLRI SRVEAE DGVVYCYMQHLEYPYTFGGGTTKLEIK	132
Vκ variante 1.pro	FLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGGTAFTLKISRVEAE DGVVYCYMQHLEYPYTFGGGTTKVEIK	112
Vκ variante 2.pro	FLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAE DGVVYCYMQHLEYPYTFGGGTTKVEIK	112
Vκ variante 3.pro	FLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAE DGVVYCYMQHLEYPYTFGGGTTKVEIK	112

Figura 15
Unión de M64 a LOX

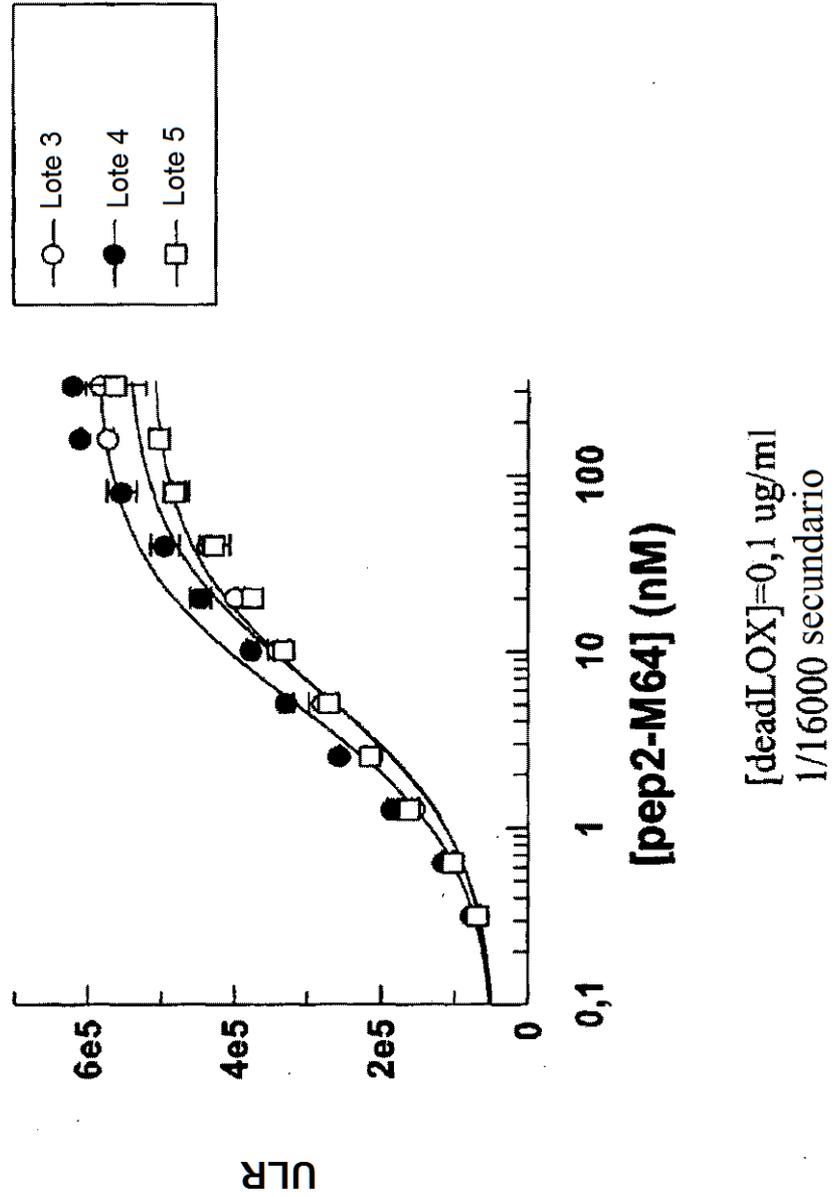
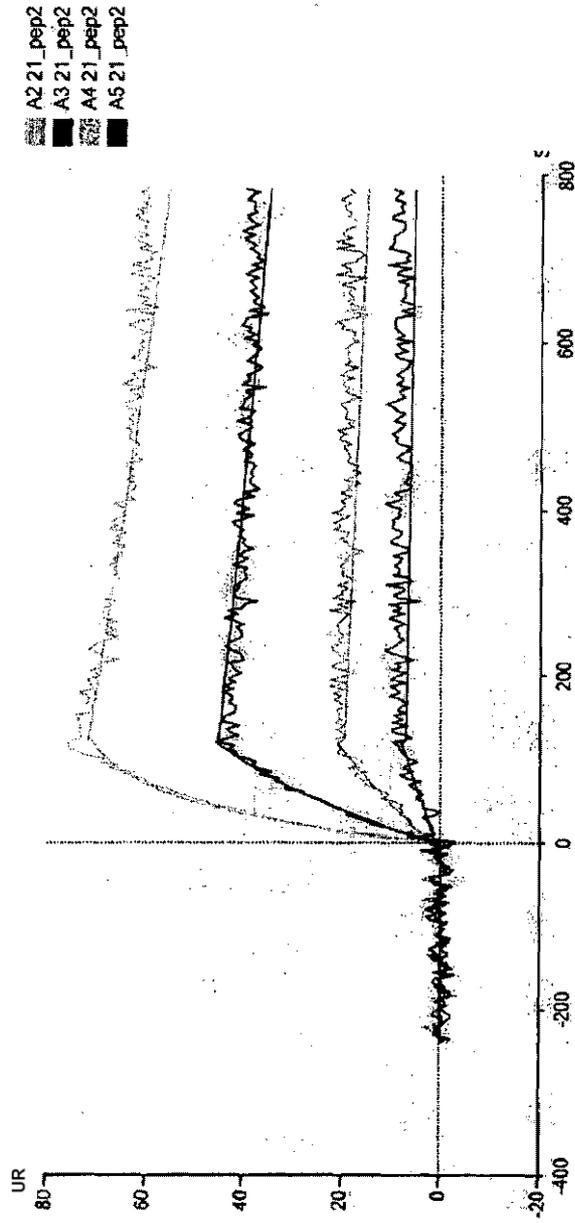


Figura 16
Unión de M64 para LOXFL por medio de SPR



$[LOXFL]=0,1 \text{ ug/ml}$
 $K_D=7 \text{ nM}$

Figura 17

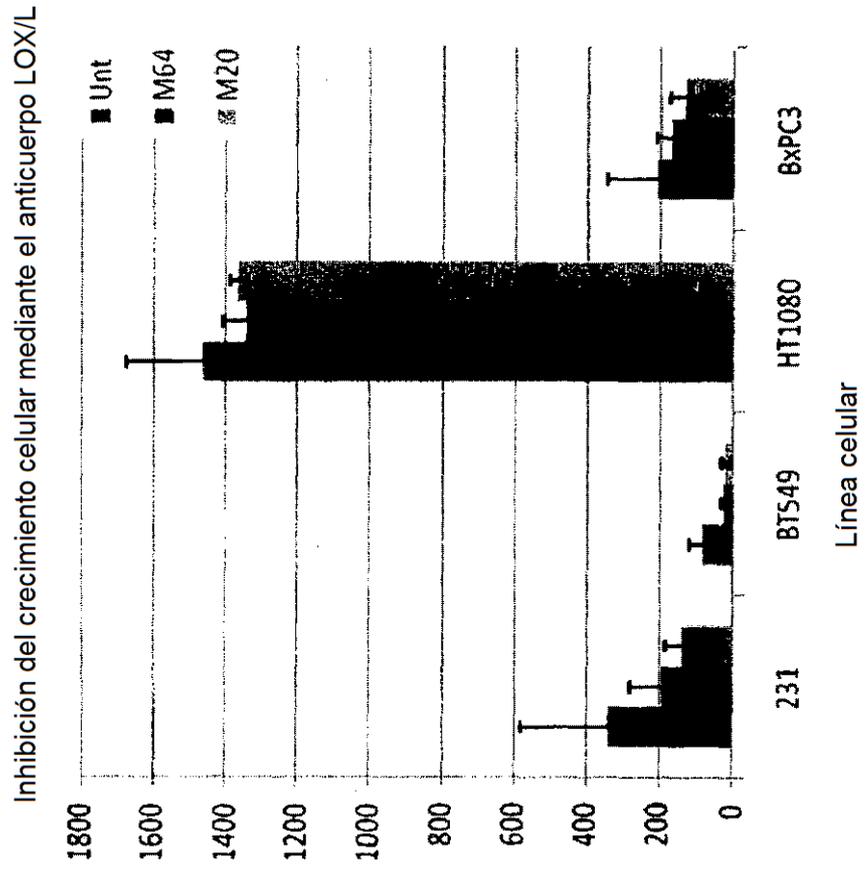
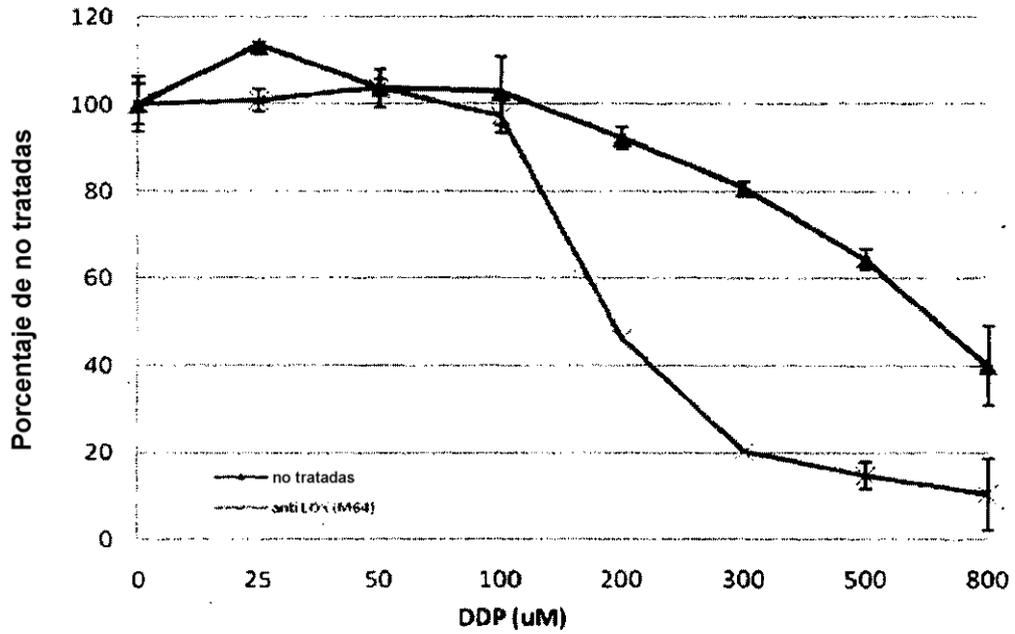


Figura 18 Sinergia entre cisplatino y anti-LOX

Sensibilidad a DDP en la línea celular MiaPaCa 2 en placas de CT tratadas



CI50

Línea celular	No tratado (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