

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 227**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2014 PCT/EP2014/057213**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14167030**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2014 E 14723729 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2984108**

54 Título: **Anticuerpos anti S100A7 para el tratamiento y diagnóstico de cáncer**

30 Prioridad:

09.04.2013 EP 13382128

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

25.10.2017

73 Titular/es:

LYKERA BIOMED S.A. (100.0%)

C/ de la Innovació 2

08225 Terrasa, Barcelona ES

72 Inventor/es:

HERNÁNDEZ MÍGUEZ, JOSÉ LUIS;

ADAN PLANA, JAUME;

MARTÍNEZ ESCOLÀ, JOSEP MARIA;

MASA ÀLVAREZ, MARC;

MESSEGUER PEYPOCH, RAMON;

MITJANS PRAT, FRANCESC;

DAKHEL PLAZA, SHEILA;

COLL MANZANO, ANTONIO;

HERVAS VILLEGAS, ROSA M^a;

CALVIS CALPE, CARME;

PADILLA GARCÍA, LAURA;

ROQUE NAVARRO, LOURDES TATIANA;

BARBERÀ FERRANDO, LAURA y

RIVAS CAÑAS, MANUEL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 639 227 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

Anticuerpos anti S100A7 para el tratamiento y diagnóstico de cáncer

Campo de la invención

5 La invención se refiere al uso de anticuerpos contra la proteína S100A7 para la prevención y/o tratamiento de cáncer o una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación; y a procedimientos y kits para diagnosticar y determinar el pronóstico de dichas enfermedades *in vitro* o *in vivo* por medio de detección de los niveles de S100A7 en un biofluido, preferentemente con un anticuerpo. La invención también se refiere a anticuerpos monoclonales anti S100A7 específicos, líneas celulares de hibridoma que los producen y un procedimiento para obtenerlos, así como composiciones farmacéuticas y conjugados que los contienen.

Antecedentes de la invención

Los cánceres son el tipo más frecuente de tumores malignos humanos, y la letalidad del cáncer resulta predominantemente de la diseminación de células tumorales primarias a sitios distantes y la formación posterior de metástasis.

15 La proteína S100A7 (psoriasina) es un miembro de la familia S100 de las proteínas de unión a calcio que se identificó inicialmente como una proteína sobreexpresada en la piel de pacientes con psoriasis. En células normales, los niveles de expresión de la proteína S100A7 son muy reducidos, sin embargo pueden encontrarse altos niveles de expresión de dicha proteína en células tumorales derivadas de por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer de vejiga y también cáncer de cabeza y cuello.

20 En cáncer de mama, los niveles de expresión de proteína S100A7 son muy altos en estadio de tumores preinvasivos tales como carcinoma ductal *in situ* y están reducidos en la adquisición de fenotipo invasivo. El nivel de expresión persistentemente alto de S100A7 en cáncer de mama invasivo es un factor de pronóstico negativo en pacientes con cáncer. Esta correlación también se ha demostrado en pacientes con cáncer de piel entre otros cánceres.

25 La localización intracelular y extracelular de S100A7 se ha demostrado y su expresión puede detectarse en el citoplasma y, en ocasiones, en el núcleo celular. El mecanismo completo de acción de dicha proteína aún es desconocido aunque la proteína Jab 1 se ha identificado como proteína de unión a S100A7.

La proteína S100A7 tiene una función proinflamatoria que actúa como agente quimiotáctico para reclutamiento de células inmunitarias. En este sentido, se ha descrito la correlación positiva entre alta expresión de S100A7 e infiltración de células inmunitarias en estroma tumoral y también con potencial metastásico.

30 S100A7 desempeña un papel importante en la progresión del cáncer de mama promoviendo la respuesta angiogénica. Cuando células epiteliales mamarias secretan S100A7, dicha proteína induce un aumento en la proliferación de células endoteliales que actúan mediante receptor RAGE (receptor para productos finales de glucosilación avanzada).

35 La proteína S100A7 también se sobreexpresa en un gran número de enfermedades cutáneas hiperproliferativas e inflamatorias incluyendo dermatitis atópica.

Se ha demostrado que la acción proinflamatoria de S100A7 se lleva a cabo por su interacción con el receptor RAGE. Dicha interacción está implicada en el reclutamiento de células inmunitarias y también induce producción de citocinas y quimiocinas por neutrófilos que contribuyen al proceso inflamatorio.

40 Se ha desvelado que el silenciamiento de S100A7 usando ARN en horquilla corto (ARNhp) estable en una línea celular tumoral humana aumenta el crecimiento independiente de anclaje, la movilidad celular e invasión *in vitro*, mientras que reduce la tumorigenicidad *in vivo* (Krop y col., Cancer Res., 2005; 65: 11326-11334). Sin embargo, estos efectos no se deben a la inhibición directa de la actividad de S100A7, sino más bien a la reducción de los niveles de VEGF y aumento de los niveles de MMP-13.

45 Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de proporcionar nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de cáncer, particularmente para el tratamiento del cáncer metastásico, que se dirijan a la proteína S100A7.

Además, en el ámbito del diagnóstico, S100A7 puede considerarse un buen marcador en el progreso de diferenciación de una célula normal hacia una célula tumoral, y por lo tanto es un buen biomarcador en el examen citológico de tumores (Barbieri MR. y col., BMC Res Notes, 2011; 4(1): 494). Sin embargo, la detección de la expresión de S100A7 en tejido canceroso presenta la desventaja de requerir una biopsia del paciente. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de proporcionar un procedimiento más sencillo y menos invasivo para el diagnóstico clínico de cáncer por medio de detección de los niveles de S100A7 en un sujeto.

Celis y col., The Journal of Urology, 1996, vol. 155, 2105-2112, desvelan que S100A7 (psoriasina) se externaliza en la orina por carcinoma de células escamosas de la vejiga.

Sumario de la invención

5 En un primer aspecto, la invención se refiere al uso de un anticuerpo que se une específicamente con la proteína S100A7 o de un fragmento de la misma con capacidad para unirse al antígeno para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de cáncer, una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada y una enfermedad asociada con inflamación.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal específico anti S100A7 producido por un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a una línea celular de hibridoma seleccionada de las líneas celulares depositadas con el número de acceso ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706.

15 En aspectos adicionales, la invención se refiere a un conjugado que comprende un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado del grupo de ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7, y un segundo componente seleccionado del grupo de:

- (a) un agente citotóxico
- (b) un agente antiangiogénico
- 20 (c) un agente antimetastásico
- (d) un agente antiproliferativo y
- (e) un agente antiinflamatorio

así como a los usos de los mismos para la prevención y/o el tratamiento del cáncer, una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación.

25 En otro aspecto más la invención se refiere a un procedimiento para obtener un anticuerpo monoclonal de la invención que comprende cultivar una línea celular de hibridoma de las líneas celulares depositadas con el número de acceso ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 en condiciones que permitan la producción de dicho anticuerpo.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado del grupo de ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para diagnosticar cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital o una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada, o una enfermedad asociada con inflamación en un sujeto que comprende:

- (a) detectar los niveles de la proteína S100A7 en un biofluido de dicho sujeto y
- (b) comparar dichos niveles con un valor de referencia

40 en el que mayores niveles de la proteína S100A7 o de una variante de la misma con respecto al valor de referencia son indicativos de que el sujeto padece cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital, una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para determinar el pronóstico o para supervisar la progresión de un cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital, una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación en un sujeto que comprende:

- 45 (a) detectar los niveles de la proteína S100A7 en un biofluido de dicho sujeto y
- (b) comparar dichos niveles con un valor de referencia para dicha proteína obtenido del mismo sujeto en un punto temporal anterior de la enfermedad

50 en el que una reducción de los niveles de la proteína S100A7 con respecto al valor de referencia es indicativa de que el carcinoma digestivo o genital, una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación muestra un buen pronóstico o

en el que un aumento de los niveles de la proteína S100A7 no cancerosa con respecto al valor de referencia es indicativo de que el carcinoma digestivo o genital o una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación muestra un mal pronóstico.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para diagnosticar o para determinar el pronóstico o supervisar la

progresión de cáncer, una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación en un biofluido que comprende al menos un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Expresión de proteína S100A7 determinada por análisis de transferencia de Western en extractos celulares de diferentes orígenes. Carril 1, HT29 (carcinoma colorrectal); Carril 2, MDA-MB-468 (carcinoma de mama); Carril 3, MCF-7 (carcinoma de mama); Carril 4, S100A7 recombinante humana.

Figura 2. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de S100A7 en tumores derivados de la línea celular de carcinoma colorrectal humano HT-29 y células de carcinoma genital humano A431. Anticuerpo monoclonal anti S100A7. Las flechas indican tinción de S100A7. Se usó un anticuerpo monoclonal de ratón no relacionado como un control negativo (Control).

Figura 3. Determinación por ELISA de los niveles de S100A7 en plasma en animales que portan tumores derivados de la línea celular de carcinoma genital humano A431. (A) Cuantificación de los niveles de S100A7 en plasma en comparación con el volumen tumoral para cada animal. (B) Comparación entre los niveles de S100A7 en plasma de cada animal el día antes (preoperatorio) y 4 días después de la resección del tumor (postoperatorio). La gráfica muestra la media \pm d.t. *Ensayo de U de Mann Whitney* * $p < 0,05$

Figura 4. El anticuerpo monoclonal 2D9 bloquea la fosforilación de ERK inducida por S100A7 en las líneas celulares de adenocarcinoma de mama tanto MDA-MB-231 como MDA-MB-468. Las imágenes muestran la inmunodetección de ERK fosforilada (Ph-ERK), ERK total y proteína actina analizada por transferencia de Western. Las gráficas muestran la cuantificación de la cantidad relativa de fosfo-ERK en comparación con el control (células no estimuladas).

Figura 5. Los anticuerpos monoclonales 2D9 y 2H3 bloquean la secreción de TNFalfa inducida por S100A7 en la línea celular de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231. La imagen muestra la inmunodetección por transferencia de western de proteína TNFalfa presente en el sobrenadante de células MDA-MB-231 después de 72 h de estimulación.

Figura 6. Efecto inhibitorio de los anticuerpos monoclonales 2D9 y 2H3 en la formación de esferas tumorales de tipo célula madre inducidas por S100A7 en la línea celular de carcinoma de colon humano HCT116. Las células se sembraron en placas adherentes de 24 pocillos y se expusieron a S100A7 con o sin anticuerpos. Se tomó una fotografía representativa de cada condición de cultivo después de 96 horas de incubación.

Figura 7. Los anticuerpos monoclonales 2D9, 2H3 y 9F3 bloquean la proliferación de células tumorales inducida por S100A7 en la línea celular de fibrosarcoma HT1080. Las células se expusieron a S100A7 con o sin anticuerpos y la viabilidad se evaluó después de 72 h de estimulación por ensayo de MTT. Las barras muestran la media \pm d.t. ** $p < 0,01$ (“*ensayo de U de Mann-Whitney*”).

Figura 8. Efecto inhibitorio de los anticuerpos monoclonales 2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3 en la migración de células tumorales inducida por S100A7 usando la línea celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 (A) y la línea celular de carcinoma genital humano A431 (B). Se usó S100A7 a 3 μ M y se usaron anticuerpos contra S100A7 a 9 μ M. Las gráficas muestran el porcentaje de células migradas con respecto a las células no estimuladas (Control). Las barras muestran la media \pm d.t. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (“*ensayo de U de Mann-Whitney*”).

Figura 9. Efecto inhibitorio del anticuerpo monoclonal 6F5 en la migración inducida por S100A7 de la línea celular HUVEC (Células de Vena Endotelial Humana). S100A7 se usó a 1 μ M y el anticuerpo contra S100A7 se usó a 3 μ M. La gráfica muestra el porcentaje de células migradas con respecto a las células no estimuladas (Control). Las barras muestran la media \pm d.t. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (“*ensayo de U de Mann-Whitney*”).

Figura 10. Los anticuerpos monoclonales 2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3 bloquean la secreción inducida por S100A7 de formas activas de MMP9 en la línea celular HUVEC (Células de Vena Endotelial Humana). (A) Efecto de respuesta a dosis de S100A7 en la secreción de formas activas de MMP9. (B) Bloqueo del efecto de S100A7. Se usó S100A7 a 3 μ M y los anticuerpos indicados se usaron a 9 μ M. Los sobrenadantes celulares se analizaron por zimografía de gelatina después de 48 h de incubación con el estímulo correspondiente.

Figura 11. Los anticuerpos monoclonales 2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3 bloquean la migración inducida por S100A7 de la línea celular monocítica humana THP-1. (A) Efecto de respuesta a dosis de S100A7 en la migración de monocitos después de 4 h de estimulación. La gráfica muestra el porcentaje de células migradas con respecto a las células no estimuladas (Control). (B) Bloqueo del efecto de S100A7. S100A7 se usó a 3 μ M y los anticuerpos indicados se usaron a 9 μ M. La gráfica muestra el porcentaje de células estimuladas con respecto a la migración en presencia de S100A7, después de retirar la migración basal (control). Las barras

muestran la media \pm d-t. ns $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (“ensayo de U de Mann-Whitney”).

Figura 12. Efecto de los anticuerpos monoclonales 2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3 en el crecimiento *in vivo* de las células de carcinoma genital humano A431. Se inyectaron cuatro millones de células A431 en el flanco derecho de ratones atímicos y se permitió que crecieran hasta 120 mm^3 . Después, los ratones se clasificaron en 7 grupos de tratamiento ($n = 10$). El grupo de control recibió $100 \mu\text{l}$ de tampón de PBS (grupo de PBS) y los grupos tratados recibieron $25 \text{ mg/kg}/100 \mu\text{l}$ de PBS estéril de anticuerpos monoclonales (2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3), tres veces por semana. El volumen tumoral se siguió tres veces a la semana con un calibrador. **(A)** Media del volumen tumoral de cada grupo de tratamiento después del inicio del tratamiento. La gráfica muestra la media del volumen tumoral para cada grupo de tratamiento. **(B)** Relación T/C (eficacia) de los grupos tratados en comparación con el grupo de control (PBS).

Figura 13. Los anticuerpos monoclonales 2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3 no tuvieron ningún efecto secundario cuando se administraron *in vivo*. Se inyectaron cuatro millones de células A431 en el flanco derecho de ratones atímicos y se permitió que los tumores crecieran hasta una media de 120 mm^3 . Después, los ratones se clasificaron en 7 grupos de tratamiento ($n = 10$). El grupo de control recibió $100 \mu\text{l}$ de tampón de PBS (grupo de PBS) y los grupos tratados recibieron $500 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ de anticuerpo por animal (2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3) en tampón de PBS, tres veces por semana. El peso corporal se siguió tres veces por semana durante el experimento. La gráfica muestra la media \pm ETM.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína S100A7 son capaces de neutralizar la capacidad proliferativa y de migración inducida por S100A7 en ensayos de migración tumoral y proliferación tumoral *in vitro* funcionales. Estos resultados indican que los anticuerpos anti S100A7 son útiles para la prevención y/o el tratamiento del cáncer. Los autores de la presente invención también han descubierto que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína S100A7 tienen actividad antimetastásica.

Además, estos hallazgos permiten el desarrollo de ensayos para la detección temprana del cáncer basándose en la detección de los niveles de S100A7 en un biofluido.

Los autores de la presente invención han demostrado adicionalmente que los anticuerpos monoclonales contra la proteína S100A7 son capaces de neutralizar niveles de la molécula TNF alfa que son producidos por líneas celulares tumorales inducidas por S100A7. TNF alfa es una de las moléculas más importantes producidas durante el proceso inflamatorio y está sobreexpresada en la mayoría de los trastornos inflamatorios crónicos. Estos resultados indican que los anticuerpos de S100A7 también son útiles para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento (*in vitro* o *in vivo*) y a kits para el diagnóstico de cáncer o enfermedades no cancerosas asociadas con una angiogénesis no deseada o enfermedades asociadas con inflamación en un paciente por medio de detección de los niveles de S100A7 en un biofluido, especialmente con anticuerpos.

Usos terapéuticos de los anticuerpos anti S100A7

Cáncer y angiogénesis

Los anticuerpos anti S100A7 capaces de unirse específicamente con la proteína S100A7 pueden usarse para el tratamiento de tumores en los que se expresa S100A7.

Específicamente, la proteína S100A7 se expresa, como se ha descrito anteriormente, en una amplia diversidad de cánceres. Como resultado, los ligandos de proteína S100A7, y más específicamente anticuerpos específicos contra esta proteína, son fármacos candidatos para usar en terapia para el tratamiento de cáncer o para el tratamiento de enfermedades asociadas con una angiogénesis no deseada.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo que se une específicamente con la proteína S100A7 o de un fragmento de la misma con capacidad para unirse al antígeno para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de cáncer y una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un anticuerpo que se une específicamente con la proteína S100A7 o un fragmento de la misma con capacidad para unirse al antígeno para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de cáncer y una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada de cáncer y una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada en un sujeto que comprende

la administración a dicho sujeto de un anticuerpo que se une específicamente con la proteína S100A7 o de un fragmento del mismo con capacidad para unirse al antígeno.

Como se usa en la presente invención, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína monomérica o multimérica que comprende al menos un polipéptido que tiene la capacidad de unirse a un antígeno determinado y que comprende toda o parte de la región variable de cadena ligera o pesada de una molécula de inmunoglobulina. El término anticuerpo incluye cualquier tipo de anticuerpo conocido, tal como, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales y anticuerpos modificados genéticamente, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos primatizados, anticuerpos humanos y anticuerpos biespecíficos.

La unidad estructural básica de un anticuerpo típico es un tetrámero, que está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" o L (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" o H (aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que son principalmente responsables del reconocimiento de antígenos; mientras que la parte carboxilo terminal de cada cadena define una región constante, principalmente responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras consisten en una región variable (VL) y una región constante (CL); mientras que las cadenas pesadas tienen una región variable (VH) y tres regiones constantes (CH1, CH2, CH3). Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas entre sí por medio de una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. En general, véase *Fundamental Immunology* Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N. Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión a anticuerpo, de modo que un anticuerpo intacto típicamente tenga dos sitios de unión iguales.

Todas las cadenas tienen la misma estructura general de regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas por medio de tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean por medio de las regiones marco conservadas y las regiones CDR son responsables de la unión con un epítipo específico. Del extremo N terminal al extremo C terminal las cadenas tanto ligeras como pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de las secuencias de Kabat de proteínas de interés inmunológico (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991); Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987); Chothia y col. *Nature* 342: 878-883 (1989)).

En la presente invención, se entienden como "anticuerpos policlonales" anticuerpos derivados de diferentes líneas de células B, es decir, anticuerpos que son una mezcla de inmunoglobulinas, secretados contra un antígeno específico (S100A7), cada uno de los cuales reconoce diferentes epítipos.

Se entienden como "anticuerpos monoclonales" anticuerpos homogéneos idénticos producidos por un producto de células híbridas de la fusión de un descendiente de clon de célula B de una única célula parental y una célula plasmática tumoral. En una realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

Se entienden como "anticuerpos quiméricos" anticuerpos contruidos con regiones variables de un anticuerpo de una especie (habitualmente un mamífero en el que se generó el anticuerpo monoclonal) y regiones constantes de otra especie (la especie en la que se va a usar el anticuerpo quimérico). El objetivo de dicha construcción es obtener un anticuerpo con el anticuerpo monoclonal original pero que es menos inmunogénico y mejor tolerado en el sujeto que va a tratarse, con una semivida en suero mejorada y que puede ser reconocido por mecanismos efectores inmunológicos, es decir, el complemento, el receptor de Fc de células citotóxicas u otros receptores de inmunoglobulina específicos que muestran especificidad de especie. En una realización preferida, los anticuerpos quiméricos se forman por regiones variables murinas y regiones constantes humanas.

Se entiende que "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo de un anticuerpo no humano, típicamente un anticuerpo murino, que conserva las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo parental, pero que es menos inmunogénico en seres humanos. Esto puede conseguirse por medio de diferentes procedimientos, que incluyen (a) injertar los dominios variables no humanos completos en regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos; (b) injertar solamente las regiones determinantes de complementariedad no humanas (CDR) en un marco conservado humano y las regiones constantes, con o sin conservar los restos de marco conservado críticos; y (c) trasplantar los dominios variables no humanos completos, pero "ocultarlos" con una sección similar al dominio variable humano por medio de reemplazo de los restos de superficie.

Se entiende que un "anticuerpo primatizado" es un anticuerpo recombinante que se ha manipulado genéticamente para contener los dominios variable pesado y ligero de un anticuerpo de mono (o de otro primate), particularmente un anticuerpo de un mono cinomolgus, y que contiene secuencias de un dominio constante humano, preferentemente dominio constante de inmunoglobulina gamma 1 o 4 humana (o una variante de PE). La preparación de dichos anticuerpos se describe en Newman y col., *Biotechnology*, 10: 1458-1460 (1992); y en los documentos de patente US 5.658.570 y US 6.113.898. Se ha descrito que estos anticuerpos muestran un alto grado de homología con anticuerpos humanos, es decir, 85-98 %, tienen funciones efectoras humanas, tienen menor inmunogenicidad y pueden mostrar una alta afinidad por antígenos humanos. Otro medio muy eficaz para generar anticuerpos recombinantes se describe en Newman, *Biotechnology*, 10: 1455-1460 (1992).

Se entiende que el “anticuerpo humano” es un anticuerpo que contiene integralmente cadenas ligeras y pesadas humanas así como regiones constantes, producidas por medio de cualquiera de los procedimientos convencionales conocidos.

5 Se entienden como “anticuerpos biespecíficos” o “anticuerpos bifuncionales” son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítomos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítomos diferentes del marcador de superficie de células B. Otros de dichos anticuerpos pueden unirse a un primer marcador de linfocitos B y adicionalmente unirse a un segundo marcador de superficie de células B. Como alternativa, una rama de unión de un marcador anti linfocitos B puede combinarse con una rama que se une a una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2 o
10 CD3) o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD 16), de modo que los mecanismos de defensa celular se concentran en el linfocito B. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos contra el linfocito B. Estos anticuerpos tienen una rama de unión al marcador del linfocito y una rama que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti interferón α, alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o un isótopo radiactivo del hapteno). Los anticuerpos biespecíficos
15 pueden prepararse como anticuerpos completos o como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab)₂).

La invención también comprende el uso de fragmentos de los diferentes tipos de anticuerpos mencionados anteriormente. La expresión “fragmento de anticuerpo” incluye fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos Fab, F(ab')₂, Fab', Fv monocatenario (scFv), diacuerpos y nanocuerpos.

20 La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos denominados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión a antígeno y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de unión a antígeno y que aún es capaz de reticular con el antígeno.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dominio variable de un dímero de cadena ligera y cadena pesada variable en una asociación no covalente fuerte. En esta configuración las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En su totalidad, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de antígeno-anticuerpo al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv, que comprende solamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene capacidad de reconocimiento y de unión a antígeno, aunque con menos afinidad que el sitio de unión completo.
30

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de fragmentos Fab en la adición de algunos restos en el extremo carboxilo terminal del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo.
35

Los fragmentos de anticuerpo “Fv monocatenario” o “scFv” comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un polipéptido enlazador entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, N. Y., pp. 269-315 (1994).
40

El término “diacuerpos” se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo esos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Por medio del uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen en más detalle, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).
45

El término “nanocuerpos” designa entidades de tamaño pequeño (15 kDa) formadas solamente por la región de unión a antígeno de la cadena pesada (fragmento VH) de inmunoglobulinas. Dichos nanocuerpos se producen principalmente después de inmunizar animales de la familia Camelidae, tales como camellos, llamas y dromedarios, principalmente llamas; y también de la familia de los tiburones, que tienen la particularidad de tener anticuerpos que carecen de forma natural de la cadena ligera y reconocen el antígeno por el dominio variable de cadena pesada. No obstante, los nanocuerpos derivados de estas fuentes requieren un proceso de humanización para su aplicación terapéutica. Otra fuente potencial para obtener nanocuerpos es de anticuerpos derivados de diferentes muestras humanas separando los dominios VH y VL de la región variable. Los nanocuerpos presentan ventajas tales como una reducción del coste de producción con respecto a anticuerpos completos, estabilidad y la reducción de la inmunogenicidad.
50
55

Los fragmentos de anticuerpo incluidos en la presente invención conservan la capacidad de unión con el antígeno de

S100A7 del anticuerpo completo del que derivan, y también conservan la función de inhibir una o más funciones características de la proteína S100A7, tal como actividad de unión, actividad de señalización y/o la estimulación de una respuesta celular. Por ejemplo, en una realización, un fragmento de anticuerpo puede inhibir la reacción de la proteína S100A7 con uno o más de sus ligandos, especialmente con su ligando RAGE, y/o puede inhibir una o más funciones mediadas por dicha proteína, tal como la proliferación de células tumorales, metástasis o la formación de esferas tumorales. En otra realización, un fragmento de anticuerpo puede inhibir la interacción de la proteína S100A7 con uno o más de sus ligandos, especialmente con su ligando RAGE y/o puede inhibir una o más funciones mediadas por dicha proteína tal como proliferación de células endoteliales.

El anticuerpo es capaz de inhibir la interacción de la proteína S100A7 con el receptor para productos finales de glucosilación avanzada (RAGE). La expresión “receptor de productos finales de glucosilación avanzada (RAGE)” usada en el presente documento se refiere a un receptor regulado por ligando transmembrana de la superfamilia de inmunoglobulina capaz de unirse a productos finales de glucosilación avanzada que modula la cascada de señalización intracelular proinflamatoria desencadenada cuando la proteína diana interacciona. La expresión “producto final de glucosilación avanzada” se refiere al producto final de una cadena de reacciones químicas después de una reacción de glucosilación inicial. Dicha expresión abarca la S100A7 de cualquier especie de mamífero, incluyendo pero sin limitación animales domésticos y de granja (vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores), primates y seres humanos. Preferentemente, el RAGE es humano.

En la presente invención, se entiende “RAGE humano” como la proteína definida por la secuencia de la base de datos Swiss-Prot con el número de acceso Q15109 (publicación del 11 de julio de 2012).

Como se usa en el presente documento se entiende que “anticuerpo capaz de inhibir la interacción de la proteína S100A7 con el receptor para productos finales de glucosilación avanzada (RAGE)” se refiere a un anticuerpo capaz de inhibir la unión de la proteína S100A7 con el receptor RAGE sin inhibir la interacción entre RAGE y otros ligandos tales como otros miembros de la familia S100, ligando de caja de grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) o productos finales de glucosilación avanzada.

Para identificar los anticuerpos capaces de inhibir la interacción de la proteína S100A7 con RAGE, pueden usarse ensayos bien conocidos en la técnica. Dichos ensayos típicamente implican medir la formación de un complejo entre la proteína S100A7 y RAGE en presencia de un anticuerpo. Dichos anticuerpos conservan la función de inhibición de una o más funciones características de la proteína S100A7, tal como actividad de unión, actividad de señalización y/o la estimulación de una respuesta celular. Dicha inhibición de la interacción puede evaluarse por medio de los ensayos descritos en los ejemplos de la presente invención. Por ejemplo, en una realización, uno o más anticuerpos de la invención pueden inhibir una o más funciones mediadas por la proteína S100A7 como la formación de esferas tumorales mostradas en el Ejemplo 10 o la proliferación de células tumorales mostrada en el Ejemplo 11.

Los anticuerpos útiles en la invención se unen específicamente con la proteína S100A7. Como se usa en el presente documento, la expresión “se une específicamente con” se refiere a la capacidad de los anticuerpos para unirse específicamente con la proteína S100A7 y no con otras proteínas de la familia S100.

Los ensayos adecuados para la identificación de anticuerpos con la especificidad deseada incluyen ensayos químicos, tales como inmunofluorescencia, citometría de flujo, transferencia de Western y ensayos de ELISA, radioinmunoensayos, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones u otros ensayos inmunoquímicos conocidos en la técnica. Se conocen en el estado de la técnica varios protocolos para ensayos de unión competitiva o inmunoradiométricos. Dichos inmunoensayos implican típicamente medir la formación de un complejo entre un anticuerpo y un inmunógeno de la proteína S100A7.

Como se usa en el presente documento, el término “S100A7” se refiere a una proteína que pertenece a la familia de proteínas de unión a calcio denominadas S100, que se sobreexpresa en células tumorales y se asocia con la proliferación tumoral, la capacidad invasiva y metastásica de células tumorales y con la capacidad de formación de esferas tumorales. Como se usa en el presente documento, el término “S100A7” también se refiere a una proteína que pertenece a la familia de proteínas de unión a calcio denominada S100 que se asocia con la angiogénesis. El término también incluye todas las formas de modificaciones químicas postraduccionales fisiológicamente relevantes, por ejemplo, glucosilación, fosforilación o acetilación, etc., siempre que la funcionalidad de la proteína se mantenga. Dicho término abarca la S100A7 de cualquier especie de mamífero, incluyendo, pero sin limitación los animales domésticos y de granja (vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores), primates y seres humanos. Preferentemente, la S100A7 es humana.

En la presente invención se entiende como “S100A7 humana” la proteína definida por la secuencia de la base de datos Swiss-Prot con el número de acceso P31151 (publicación del 11 de julio de 2012).

Como se usa en el presente documento, se entiende como “variante funcionalmente equivalente de S100A7” cualquier molécula que comparta con S100A7 una o más de las funciones descritas en la presente invención asociadas con S100A7, tanto *in vitro* como *in vivo*, y que tenga una identidad mínima en la secuencia de aminoácidos. Las variantes de S100A7 pueden ser tanto naturales como artificiales

La expresión “variante natural” se refiere a todas las variantes de S100A7 humana mencionadas anteriormente que

aparecen de forma natural en otras especies, es decir, ortólogos de S100A7. Dichas variantes naturales incluyen pero sin limitación S100A7 de vacas, correspondiente a las secuencias con el número de acceso DAA31756 y NP 777021 (publicación del 21 de mayo de 2010 y 28 de abril de 2012, respectivamente) o a la secuencia predicha con el número de acceso XP_002686048 (publicación del 1 de diciembre de 2011); S100A7 de ratones, correspondiente a la secuencia con el número de acceso AAS91715 (publicación del 21 de abril de 2004); S100A7 de caballos, correspondiente a la secuencia con el número de acceso NP_001075349 (publicación del 22 de abril de 2012); monos macacos, correspondientes a la secuencia predicha con el número de acceso XP_001110603 (publicación del 1 de junio de 2010); S100A7 de cerdos, correspondiente a la secuencia predicha con el número de acceso XP_003125797 (publicación del 11 de octubre de 2011). Las variantes naturales de S100A7 adecuadas para su uso en el primer aspecto de la presente invención también pueden obtenerse de dichas secuencias por medio de inserción, sustitución o supresión de uno o más aminoácidos e incluyen alelos naturales, variantes resultantes de procesamiento alternativo y formas secretadas y truncadas de origen natural.

La S100A7 útil en la presente invención puede ser, por lo tanto, de una secuencia natural cuando comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la S100A7 derivada de la naturaleza. Dichos polipéptidos de una secuencia natural pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes y/o sintéticos. Por lo tanto, la S100A7 de la invención puede ser una proteína recombinante obtenida por la expresión de un polinucleótido que codifica S100A7 o una variante funcionalmente equivalente de la misma en un organismo heterólogo, tal como una bacteria, levadura o insecto o célula de mamífero. Dicha proteína recombinante puede obtenerse como una proteína de fusión con una cola amino terminal de histidinas que facilitan la purificación posterior de la misma. La expresión y purificación de dichas proteínas puede realizarse de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la materia y descritos en el estado de la técnica.

En una realización preferida, la S100A7 es de origen humano, preferentemente de secuencia con el número de acceso P31151 en la base de datos Swiss-Prot (publicación del 11 de julio de 2012). En otra realización preferida, la S100A7 es una proteína de fusión que comprende la secuencia de S100A7 humana con una cola amino terminal de tres aminoácidos adicionales, cuya secuencia es SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1

**GSHMSNTQAERSIIGMIDMFHKYTRRDDKIEKPSLLTMMKENFPNFLSACDKKGTNYLADVFE
RKDKNEDKKIDFSEFLSLLGDIATDYHKQSHGAAPCSGGSQ**

Como alternativa, la S100A7 puede obtenerse por medios recombinantes y/o sintéticos.

Las variantes de S100A7 muestran al menos una de las funciones de S100A7 tales como, sin limitación:

- la capacidad de inducir proliferación de células tumorales, que puede determinarse por medio del procedimiento descrito en el Ejemplo 11 de la presente invención.
- la capacidad de estimular la capacidad invasiva y metastásica de células tumorales, que puede determinarse por medio de procedimientos descritos en el estado de la técnica, tales como una invasión dirigida por estímulo usando cámaras de invasión recubiertas con matrigel o realizando modelos de crecimiento tumoral ortotópico en ratones (Arumugam T y col. 2006. J. Nat. Cancer Inst. 98: 1806-1818).
- la capacidad de formar esferas tumorales, que puede determinarse por medio del procedimiento descrito en el Ejemplo 10 de la presente invención.
- la capacidad para inducir la migración de células endoteliales, que puede determinarse por medio del procedimiento descrito en el Ejemplo 13 de la presente solicitud.
- la capacidad para inducir una respuesta inflamatoria mediada por secreción de TNFalfa, que puede determinarse por medio del procedimiento descrito en el Ejemplo 9 de la presente solicitud.
- la capacidad para activar la actividad metaloproteinasas de la matriz MMP9, que puede determinarse por medio del procedimiento descrito en el Ejemplo 13 de la presente solicitud.
- la capacidad para inducir una respuesta inflamatoria en monocitos que puede determinarse por medio del procedimiento descrito en el Ejemplo 14.
- la capacidad para inducir desarrollo tumoral en ratones desnudos atímicos, que puede determinarse por medio del procedimiento descrito en el Ejemplo 15.

Adicionalmente, las variantes funcionalmente equivalentes de S100A7 incluyen polipéptidos que muestran al menos 60 %, 65 %, 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % de similitud o identidad con las diferentes variantes naturales de S100A7 mencionadas anteriormente. El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina usando algoritmos implementados en un ordenador y procedimientos conocidos ampliamente por los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP (BLAST Manual, Altschul, S. y col., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., y col., J., 1990, Mol. Biol. 215: 403-410).

En el contexto de la presente invención, el término "antígeno" se refiere a S100A7.

En general, también se contemplan modificaciones de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la invención.

- Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo los cambios de nucleótidos adecuados en el ácido nucleico que codifica el anticuerpo, o por medio de síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones y/o inserciones y/o sustituciones de restos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se realiza cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para conseguir la construcción final, siempre que la construcción final tenga las características deseadas, es decir, especificidad de unión de S100A7 y actividad antagonista de dicha proteína. Los cambios en los aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo, tales como cambiar el número o la posición de los sitios de glucosilación.
- Algunas inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones del extremo amino terminal y/o carboxilo terminal cuya longitud varía de un resto hasta polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones dentro de la secuencia de uno o varios restos de aminoácidos. Algunos ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes por inserción de la molécula de anticuerpo incluyen fusión con el extremo N o C terminal del anticuerpo de una enzima, o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.
- Otro tipo de variante es una variante por sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido del anticuerpo sustituido con un resto diferente. Los sitios de mayor interés para mutagénesis por sustitución de anticuerpos incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en las FR.
- “Medicamento” se entiende como una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une específicamente con la proteína S100A7 o un fragmento del mismo con capacidad para unirse al antígeno.
- “Prevención” se entiende como la administración de un anticuerpo que se une específicamente con la proteína S100A7 o de un fragmento del mismo con capacidad para unirse al antígeno, o de un medicamento que los contiene en un estadio inicial o temprano de la enfermedad, o también a prevenir su aparición.
- El término “tratamiento” se usa para designar la administración de un anticuerpo que se une específicamente con la proteína S100A7 o de un fragmento del mismo con capacidad para unirse al antígeno o de un medicamento que lo contiene para combatir la progresión de la enfermedad antes o después de haber aparecido las señales clínicas. Combatir la progresión de la enfermedad se entiende como los resultados clínicos beneficiosos o deseados que incluyen pero sin limitación reducción de los síntomas, reducción de la duración de la enfermedad, estabilización de las condiciones patológicas (específicamente evitar deterioro adicional), retardo de la progresión de la enfermedad, mejora de la condición patológica y remisión (tanto parcial como completa). El control de la progresión de la enfermedad también implica una prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se aplicara el tratamiento.
- Los términos “cáncer” y “tumor” se refieren a una masa anómala de células dentro de un organismo multicelular que resulta de la división celular excesiva que está descontrolada y es progresiva, también denominada neoplasia. Los anticuerpos que se unen específicamente con la proteína S100A7 o sus fragmentos con capacidad para unirse al antígeno son útiles para el tratamiento de cualquier cáncer o tumor, tal como, sin limitación, tumores de mama, de corazón, de pulmón, de intestino delgado, de colon, esplénico, de riñón, de vejiga, de cabeza, de cuello, ovárico, de próstata, de cerebro, pancreático, de piel, de hueso, de médula ósea, de sangre, tímico, uterino, testicular y de hígado. Particularmente, los tumores que pueden tratarse con dichos anticuerpos incluyen pero sin limitación adenoma, angiosarcoma, astrocitoma, carcinoma epitelial, germinoma, glioblastoma, glioma, hemangioendotelioma, hemangiosarcoma, hematoma, hepatoblastoma, leucemia, linfoma, meduloblastoma, melanoma, neuroblastoma, osteosarcoma, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma y teratoma. Particularmente, el tumor/cáncer se selecciona del grupo de melanoma lentiginoso acral, adenocarcinoma de queratosis actínica, carcinoma quístico adenoide, adenomas, adenosarcoma, carcinoma adenoescamoso, tumores astrocíticos, carcinoma de glándulas de Bartholin, carcinoma de células basales, carcinoma de glándulas bronquiales, carcinoide capilar, carcinoma, carcinosarcoma, colangiocarcinoma, cistadenoma, tumor del seno endodérmico, hiperplasia endometrial, sarcoma del estroma endometrial, adenocarcinoma endometrioide, sarcoma ependimal, sarcoma de Ewing, hiperplasia nodular focal, tumores de línea germinal, glioblastoma, glucagonoma, hemangioblastoma, hemangioendotelioma, hemangioma, adenoma hepático, adenomatosis hepática, carcinoma hepatocelular, insulinooma, neoplasia intraepitelial, neoplasia de células escamosas interepiteliales, carcinoma de células escamosas invasivo, carcinoma de células grandes, leiomiomasarcoma, melanoma, melanoma maligno, tumor mesotelial maligno, meduloblastoma, meduloepitelioma, carcinoma mucoepidermoide, neuroblastoma, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, osteosarcoma, adenocarcinoma seroso papilar, tumores de la hipófisis, plasmacitoma, pseudosarcoma, blastoma pulmonar, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de tejido blando, tumor secretor de somatostatina, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma indiferenciado, melanoma de la úvea, carcinoma verrugoso, vipoma, tumor de Wilms. En una realización de la invención, el cáncer/tumor para prevenir o tratar con dichos anticuerpos es un cáncer seleccionado de fibrosarcoma, de mama, carcinoma colorrectal y carcinoma epidermoide, preferentemente seleccionado de fibrosarcoma, carcinoma colorrectal y carcinoma epidermoide. En otra realización preferida de la invención, el tumor/cáncer para prevenir o tratar con dichos anticuerpos es cáncer colorrectal, preferentemente carcinoma colorrectal. En otra realización preferida de la invención, el tumor/cáncer para prevenir o tratar con dichos

anticuerpos es un carcinoma genital. En otra realización preferida de la invención, el tumor/cáncer para prevenir o tratar con dichos anticuerpos es un carcinoma digestivo.

El término cáncer incluye tanto tumores primarios como metástasis.

La expresión tumor primario se refiere a un tumor que está en el sitio primario en el que se origina dicho tumor.

- 5 El término “metástasis”, como se usa en el presente documento, se refiere al proceso por el que un cáncer se propaga o se transfiere del sitio de origen a otras regiones del cuerpo con el desarrollo de una lesión cancerosa similar en una nueva localización. Una célula “metastásica” o “metastatizante” es una que pierde contactos adhesivos con células adyacentes y migra por el torrente sanguíneo o la linfa del sitio primario de la enfermedad para invadir estructuras corporales adyacentes. Este nuevo tumor se conoce como metastásico (o tumor secundario). Cuando las células tumorales metastatizan, la nueva célula tumoral se denomina tumor metastásico o secundario, y sus células son similares a las del tumor original. Esto significa, por ejemplo, que si el cáncer de mama metastatiza a los pulmones, el tumor secundario está compuesto de células de mama anómalas, no de células de pulmón anómalas. El tumor en el pulmón se denomina después cáncer de mama metastásico, no cáncer de pulmón. Los tumores metastásicos son muy comunes en los estadios tardíos de cáncer. La propagación de la metástasis puede producirse por la vía sanguínea, la linfática o ambas. Los lugares más comunes para que se produzca la metástasis son pulmón, hígado, cerebro y los huesos. En una realización preferida, el cáncer es un cáncer metastásico.

En una realización preferida, los anticuerpos para su uso de acuerdo con la presente invención se caracterizan porque bloquean la activación de la ruta de MAPK inducida por S100A7.

- 20 La expresión “activación aumentada de la ruta de MAPK”, como se usa en el presente documento, se refiere a tumores en los que la actividad y/o la expresión de uno o más componentes de la ruta de MAPK aumentan con respecto a un nivel de referencia, en el que dicho nivel de referencia es la expresión o actividad en tumores que no muestran una activación de la ruta de MAPK o en células no tumorales que no se han estimulado con agentes capaces de activar la ruta de MAPK.

- 25 La expresión “ruta de MAPK”, también conocida como ruta de Ras-Raf-MEK-ERK, como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena de proteínas en la célula que comunica una señal de un receptor en la superficie de la célula al ADN en el núcleo de la célula. La señal comienza cuando una molécula de señalización se une al receptor en la superficie celular y termina cuando el ADN en el núcleo expresa una proteína y produce algún cambio en la célula, tal como división celular.

- 30 En una realización preferida, se considera que un tumor muestra activación aumentada de la ruta de MAPK si muestra expresión y/o actividad aumentada de uno o más componentes de la ruta de MAPK seleccionados del grupo que consiste en EGFR, GRB2, SOS, Ras, RAF quinasa, MEK1, MEK2 y MAPK. Como se usa en el presente documento, se entiende como expresión y/o actividad aumentada un nivel de expresión o nivel de actividad que es al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 100 %, al 200 %, al menos 300 % o más con respecto a un nivel de expresión de referencia o a un nivel de actividad de referencia. Se conocen bien en la técnica procedimientos para determinar si el nivel de expresión de un componente dado de la ruta de MAPK está aumentado e incluyen procedimientos basados en la determinación de los niveles de ARNm del componente correspondiente (por ejemplo, transferencia de Northern, RT-PCR y similares) y procedimientos basados en la determinación de los niveles de proteínas del componente correspondiente (por ejemplo, ELISA, transferencia de Western, etc.). Los procedimientos para determinar si la actividad de uno o más componentes de la ruta de MAPK aumenta se basan en la determinación de la actividad de los diferentes componentes y son conocidos ampliamente por los expertos en la materia. Los procedimientos adecuados para determinar la actividad de la ruta de MAPK incluyen, por ejemplo, la detección de proteína ERK fosforilada (MAPK) así como la relación de fosfoERK con respecto a ERK.

- 45 En una realización preferida, los anticuerpos para su uso de acuerdo con la presente invención se caracterizan porque bloquean la expresión aumentada de TNFalfa inducida por S100A7.

- 50 La expresión “expresión aumentada de TNFalfa”, como se usa en el presente documento, se refiere a tumores en los que la actividad y/o la expresión de TNFalfa aumentan con respecto a un nivel de referencia, en el que dicho nivel de referencia es la expresión o actividad de tumores que no muestran activación de TNFalfa aumentada o en células no tumorales que no se han estimulado con agentes capaces de activar TNFalfa.

- 55 En una realización preferida, se considera que un tumor muestra expresión aumentada de TNFalfa si muestra un nivel de expresión o nivel de actividad de TNFalfa que es al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 100 %, al menos 200 %, al menos 300 % o más con respecto a un nivel de expresión de referencia o a un nivel de actividad de referencia. Se conocen bien en la técnica procedimientos para determinar si el nivel de expresión de TNFalfa aumenta e incluyen procedimientos basados en la determinación de los niveles de ARNm del componente correspondiente (por ejemplo transferencia de Northern, RT-PCR y similares) y procedimientos basados en la determinación de los niveles de proteínas del componente correspondiente (por ejemplo, ELISA, transferencia de Western, etc.). Los procedimientos para determinar si la actividad de TNFalfa

aumenta se basan en la determinación de la actividad biológica de TNFalfa. Ya que TNFalfa es una proteína secretada, la determinación de la actividad de TNFalfa puede determinarse midiendo la actividad de TNFalfa en el medio de cultivo acondicionado de las células tumorales.

5 La expresión “carcinoma colorrectal” se entiende como un cáncer por crecimiento descontrolado de células en el colon o el recto o en el apéndice. En otra realización preferida de la invención, el tumor/cáncer para prevenir o tratar con dichos anticuerpos es fibrosarcoma.

Como se usa en el presente documento, el término “fibrosarcoma” se refiere a un tumor maligno compuesto de células y fibras derivadas de fibroblastos que producen colágeno pero carecen por lo demás de diferenciación celular.

10 En otra realización preferida de la invención, el tumor/cáncer para tratar es carcinoma epidermoide.

Como se usa en el presente documento, la expresión “carcinoma epidermoide” se refiere a un tumor maligno derivado de tejido epitelial que tiende a metastatizar a otras áreas del cuerpo.

En otra realización preferida de la invención, el tumor/cáncer para tratar es carcinoma genital.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión “carcinoma genital” se refiere a un tumor maligno derivado de tejido transformado genital que tiende a metastatizar a otras áreas del cuerpo. La expresión “carcinoma genital” se refiere a cualquier carcinoma que tenga su origen en los órganos genitales incluyendo, sin limitación, carcinoma vaginal, carcinoma del cuello uterino, carcinoma ovárico, carcinoma oviductal, carcinoma uterino y carcinomas del tracto genital masculino.

20 En otra realización preferida de la invención, el tumor/cáncer para tratar es un carcinoma digestivo. La expresión “carcinoma digestivo”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier condición maligna del tracto gastrointestinal y órganos anejos de la digestión. Como se usa en el presente documento, “carcinoma digestivo” significa cualquier cáncer gastrointestinal (es decir cualquier carcinoma que tenga su origen en los órganos digestivos) incluyendo, sin limitación, cáncer del esófago, el estómago, el sistema biliar, el páncreas, el intestino delgado, el intestino grueso, el recto, el ano y colorrectal. En otra realización preferida de la invención, el tumor/cáncer para prevenir o tratar con dichos anticuerpos es cáncer de mama.

25 La expresión “cáncer de mama” se entiende como cáncer por crecimiento descontrolado de células en la mama.

Los autores de la presente invención han descubierto que la proteína S100A7 está implicada en la formación de esferas tumorales. Por lo tanto, en una realización particular el cáncer para prevenir o tratar es un cáncer que forma esferas tumorales.

30 “Cáncer que forma esferas tumorales” se refiere a un tumor compuesto de células progenitoras que son capaces de formar esferas y que tienen una capacidad de autorrenovación y tumorigénesis y que pueden inducirse para diferenciarse *in vitro* en células tumorales. La capacidad de autorrenovación en el presente documento implica la capacidad de proliferación clonal.

En una realización particular el cáncer para prevenir o tratar es un cáncer metastásico.

35 Como se usa en el presente documento, el término “metastásico” se refiere a un cáncer para el que se sabe que existe al menos un tumor (un “tumor secundario”) en un órgano distinto del órgano que es la fuente de las células tumorales. Por ejemplo, el cáncer colorrectal tiende a propagarse del colon o el recto a ganglios linfáticos y después al hígado. El órgano que es la fuente de las células tumorales puede identificarse usando procedimientos convencionales en la técnica.

40 En el contexto de la presente invención, se entiende que el término “angiogénesis” significa el proceso fisiológico que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos existentes. La angiogénesis también se conoce como neovascularización.

45 La expresión “enfermedades asociadas con angiogénesis indeseada” se refiere a todas las enfermedades en las que se produce angiogénesis patógena, es decir cuando dicho proceso es perjudicial o indeseable, bien sea canceroso o no. El alcance de la presente invención excluye el tratamiento de la angiogénesis en situaciones en las que sea necesaria, tal como una curación de herida. Son enfermedades asociadas con una angiogénesis no deseada que pueden tratarse con los compuestos de acuerdo con la presente invención, sin limitación, enfermedades inflamatorias, especialmente enfermedades inflamatorias crónicas tales como artritis reumatoide, psoriasis, sarcoidosis y similares; enfermedades autoinmunitarias; enfermedades víricas; enfermedades genéticas; 50 enfermedades alérgicas; enfermedades bacterianas; enfermedades oftalmológicas tales como retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, retinopatía auricular proliferativa, oclusión de venas retinianas, degeneración macular, degeneración macular discoide senil, glaucoma ocular neovascular, enfermedades de neovascularización coroidal, enfermedades de neovascularización retiniana, rubeosis (neovascularización del ángulo), rechazo de injerto corneano, fibroplasia retrolental, queratoconjuntivitis epidérmica, deficiencia de vitamina A, agotamiento de lentes de

contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, ojo seco de pterigión, síndrome de Sjögren, acné rosácea, flictenulosis, sífilis, infecciones micobacterianas, degeneración lipídica, quemaduras con sustancias corrosivas, úlceras bacterianas, úlceras micóticas, infecciones protozoarias, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratólisis marginal, escleritis, desprendimiento de la retina crónico y similares; 5
aterosclerosis; endometriosis; obesidad; insuficiencia cardíaca; insuficiencia renal avanzada; endotoxemia; síndrome de choque tóxico; meningitis; fibrosis inducida por silicio; fibrosis inducida por amianto; apoplejía; periodontitis; gingivitis; anemia macrocítica; anemia refractaria; síndrome de supresión de 5q; afecciones en las que la vascularización está alterada como infección por VIH, hepatitis, telangiectasia hemorrágica o enfermedad de Rendu-Osler-Weber.

10 En una realización particular las enfermedades asociadas con una angiogénesis no deseada son enfermedades inflamatorias. Se entiende como “enfermedad inflamatoria” cualquier enfermedad en la que haya una respuesta inflamatoria excesiva o alterada que conduzca a síntomas inflamatorios. Dichas enfermedades inflamatorias que pueden tratarse por compuestos de la invención incluyen, sin limitación, enfermedad de Addison, acné vulgar, alopecia areata, amiloidosis, espondilitis anquilosante, ulceraciones, estomatitis aftosa, artritis, arteriosclerosis, 15
osteoartritis, artritis reumatoide, asma bronquial, enfermedad de Behcet, enfermedad de Boeck, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, coroiditis, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, crioglobulinemia, degeneración macular, dermatitis, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, diabetes insulino dependiente, diabetes juvenil, enfermedad desmielinizante inflamatoria, contractura de Dupuytren, encefalomiелitis, encefalomiелitis alérgica, endoftalmia, enteritis alérgica, síndrome de enteropatía autoinmunitaria, eritema nudoso leproso, 20
espondilitis anquilosante, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, fibrosis quística, gingivitis, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, síndrome de Graves, enfermedad de Hashimoto, hepatitis crónica, histiocitosis, ileítis regional, iritis, lupus eritematoso diseminado, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso cutáneo, linfocitoma, mononucleosis infecciosa, miastenia grave, mielitis transversal, mixedema idiopático primario, nefrosis, obesidad, oftalmia simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, paniculitis, pénfigo vulgar, periodontitis, poliarteritis nudosa, poliarteritis crónica, polimiositis, polirradiculitis aguda, psoriasis, enfermedad 25
pulmonar obstructiva crónica, púrpura, piodermia gangrenosa, síndrome de Reiter, retinopatía diabética, rosácea, sarcoidosis, esclerosis atáxica, esclerosis sistémica progresiva, escleritis, esclerodermia, esclerosis múltiple, esclerosis diseminada, uveítis anterior aguda, vitiligo, enfermedad de Whipple, enfermedades asociadas con SIDA, inmunodeficiencia combinada grave y virus de Epstein Barr tal como el síndrome de Sjögren, tuberculosis osteoarticular y enfermedades parasitarias tales como leishmaniosis. Son enfermedades inflamatorias preferidas artritis reumatoide, psoriasis, sarcoidosis, retinopatía diabética, degeneración macular, arteriosclerosis y obesidad. 30
En una realización más preferida, la enfermedad es psoriasis.

En una realización de la presente invención, el medicamento comprende uno o más anticuerpos de acuerdo con la invención como el único agente terapéutico. Sin embargo, el medicamento de la invención también puede contener 35
uno o varios compuestos adicionales para el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, en otra realización de la presente invención, el medicamento se prepara para la administración combinada de un anticuerpo de acuerdo con la invención y uno o más agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de dicha enfermedad.

La expresión “agente terapéutico útil en el tratamiento de dicha enfermedad” se refiere a un agente adecuado para su uso en el tratamiento del cáncer.

40 Para el tratamiento del cáncer, el anticuerpo de la invención puede usarse en combinación con un compuesto terapéuticamente activo adicional, tal como un agente citotóxico, un agente antiangiogénico, un agente antimetastásico, un agente antiproliferativo o un agente antiinflamatorio.

Los agentes citotóxicos que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención para el tratamiento del cáncer incluyen pero sin limitación antibióticos de antraciclina tales como doxorubicina y daunorubicina, taxanos tales como Taxol™ y docetaxel, alcaloides de la vinca tales como vincristina y vinblastina, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, irinotecán, idarrubicina, mitomicina C, oxaliplatino, raltitrexed, tamoxifeno, cisplatino, carboplatino, metotrexato, actinomicina D, mitoxantrona, blenoxano o mitramicina. Los agentes antiangiogénicos que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención para el tratamiento del cáncer incluyen, pero sin limitación un agente antiangiogénico seleccionado del grupo de paclitaxel, 2-metoxiestradiol, prinomastat, 50
batimastat, BAY 12-9566, carboxiamidotriazol, CC-1088, ácido dextrometorfano acético, ácido dimetilxantenona acético, endostatina, IM-862, marimastat, penicilamina, PTK787/ZK 222584, RPI.4610, lactato de escualamina, SU5416, talidomida, combretastatina, tamoxifeno, COL-3, neovastat, BMS-275291, SU6668, anticuerpos anti VEGF, Medi-522 (Vitaxin II), CAI, interleucina 12, IM862, amilorida, angiostatina, angiostatina K1-3, angiostatina K1-5, Captopril, DL-alfa-difluorometilornitina, DL-alfa-difluorometilornitina HCl, endostatina, fumagilina, herbimicina A, 4-hidroxiifenilretinamida, juglona, laminina, hexapéptido de laminina, pentapéptido de laminina, lavendustina A, medroxiprogesterona, minociclina, inhibidor de ribonucleasa de placenta, suramina, trombospondina, anticuerpos dirigidos contra factores proangiogénicos (por ejemplo, Avastin, Erbitux, Vectibix, Herceptin); inhibidores de tirosina quinasa de bajo peso molecular de factores de crecimiento proangiogénicos (por ejemplo, Tarceva, Nexavar, Sutent, Iressa); inhibidores de mTOR (por ejemplo Torisel); interferón alfa, beta y gamma, IL-12, inhibidores de metaloproteinasas de la matriz (por ejemplo, COL3, marimastat, batimastat); ZD6474, SU11248, vitaxin; inhibidores de PDGFR (por ejemplo Gleevec); NM3 y 2-ME2; ciclopéptidos tales como cilengitida. Los agentes antimetastásicos que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención para el tratamiento del cáncer incluyen pero 60

- sin limitación cualquier agente capaz de actuar como un agente antimetastásico, tales como agentes alquilantes; antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo, pemetrexed (MTA), raltitrexed (TDX); agentes citotóxicos de platino tales como cisplatino u oxaliplatino; inhibidores de topoisomerasa; agentes antimicrotubulares; antraciclinas; alcaloides vegetales; inhibidores de GTPasa; inhibidores de la angiogénesis; inhibidores de metaloproteínasa de la matriz;
- 5 inhibidores de la quinasa reguladora del ciclo celular, tales como inhibidores de ciclinas y quinasas dependientes de ciclina; inhibidores de la señalización de Wnt; inhibidores del factor de transcripción E2F; inhibidores de histona desacetilasa; inhibidores de AKT quinasa o ATPasa. Los agentes antiproliferativos son agentes capaces de prevenir o inhibir la formación o el crecimiento de tumores. Los agentes antiproliferativos que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención para el tratamiento del cáncer incluyen pero sin limitación (i) antimetabolitos tales
- 10 como antimetabolitos de ácido fólico (aminopterina, denopterina, metotrexato, edatrexato, trimetrexato, nolatrexed, lometrexol, pemetrexed, raltitrexed, piritrexim, pteropterina, leucovorina, 10-propargil-5,8-didesazafolato (PDDF, CB3717)), análogos de purina (cladribina, clofarabina, fludarabina, mercaptopurina, pentostatina, tioguanina) y análogos de pirimidina (capecitabina, citarabina o ara-C, decitabina, fluorouracilo, 5-fluorouracilo, doxifluridina, floxuridina y gemcitabina) (ii) productos naturales, tales como antibióticos antitumorales e inhibidores mitóticos tales como alcaloides de la vinca tales como vindesina, vincristina, vinblastina, vinorelbina; taxanos tales como paclitaxel (Taxol™), docetaxel (Taxotere™); colchicina (NSC 757), tiocolchicina (NSC 361792), derivados de colchicina (por ejemplo, NSC 33410) y alocolchicina (NSC 406042); halicondrina B (NSC 609395); dolastatina 10 (NSC 376128); maitansina (NSC 153858); rizoxina (NSC 332598); epotilona A, epotilona B; discodermolide; estramustina; nocodazol; (iii) hormonas y antagonistas de las mismas, tales como tamoxifeno, toremifeno, anastrozol, arzoxifeno,
- 20 lasofoxifeno, raloxifeno, nafoxidina, fulvestrant, aminoglutetimida, testolactona, atamestano, exemestano, fadrozol, formestano, letrozol, goserelina, leuprorelina o leuprolide, buserelina, histrelina, megestrol y fluoximesterona; (iv) agentes biológicos, tales como vectores víricos, interferón alfa e interleucinas; (v) compuestos basados en platino tales como carboplatino, cisplatino [cis-diaminodicloroplatino, (CDDP)], oxaliplatino, iroplatino, nedaplatino, tetranitrato de triplatino, tetraplatino, satraplatino (JM216), JM118 [cis amino dicloro (II)], JM149 [cis amino dicloro (ciclohexilamina) trans dihidroxo platino (IV)], JM335 [trans amino dicloro dihidroxo platino (IV)], transplatino, ZD0473, cis, trans, cis-Pt(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)(O₂CC₃H₇)₂Cl, malanato-1,2-diaminociclohexanoplatino (II), 5-sulfosalicilato-trans-(1,2-diaminociclohexano)platino (II) (SSP), poli-[(trans-1,2-diaminociclohexano)platino]-carboxiamilosa (POLY-PLAT) y 4-hidroxisulfonilfenilacetato (trans-1,2-diaminociclohexano) platino (II) (SAP) y similares y (vi) fármacos alquilantes de ADN tales como mostazas de nitrógeno, nitrosoureas, derivados de etilenimina, alquil sulfonatos y triacenos, incluyendo, pero sin limitación, ciclofosfamida (Cytoxan™), busulfán, improsulfán, pipsulfán, pipobromán, melfalán (L-sarcolisina), clorambucilo, mecloretamina o mustina, uramustina o mostaza de uracilo, novembiquina, fenesterina, trofosfamida, ifosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), clorozotocina, fotemustina, nimustina, ranimustina, semustina (metil-CCNU), estreptoizocina, tiotepa, trietilenmelamina, trietilenofoforamina, procarbazona, altretamina, dacarbazina, mitozolomida y temozolomida.
- 35 Los agentes antiinflamatorios que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención para el tratamiento de cáncer incluyen, pero sin limitación cualquier agente capaz de actuar como un agente antiinflamatorio tal como ácido 5-aminosalicílico y medicamentos que lo contienen (sulfasalacina, mesalamina, mesalacina, osalacina); ácido acetilsalicílico; corticosteroides tales como hidrocortisona, cortisona, triamcinolona, budesonida, prednisona, deflazacort, metotrexato; infliximab o adalimumab.
- 40 Como "administración combinada" se entiende que el anticuerpo de acuerdo con la invención se administra conjuntamente o por separado, simultáneamente, al mismo tiempo o secuencialmente con un agente terapéutico útil en el tratamiento del cáncer en cualquier orden. Por ejemplo, la administración del anticuerpo de la invención puede realizarse primero, seguido de la administración de uno o más agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de dicha patología; o la administración del anticuerpo de la invención puede realizarse al final, precedida de la administración de uno o más agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de dicha patología; o la administración del anticuerpo de la invención puede realizarse al mismo tiempo que la administración de uno o más agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de dicha patología.

El experto en la materia entenderá que en el contexto de la presente invención, el medicamento para la administración combinada de un anticuerpo de acuerdo con la invención y un agente terapéutico adicional útil en el

50 tratamiento del cáncer puede prepararse como una forma de dosificación individual o en formas de dosificación separadas.

En una realización particular, el anticuerpo usado es un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706.

55 Las expresiones "anticuerpo monoclonal" e "hibridoma" se definen posteriormente en el contexto del segundo aspecto de la invención.

La "variante funcional" de los anticuerpos monoclonales de la invención se entiende como cualquier molécula que comparta con dichos anticuerpos monoclonales una o más de las funciones descritas en la presente invención asociadas con dichos anticuerpos monoclonales, tanto *in vitro* como *in vivo*, y que tiene una identidad mínima en la

60 secuencia de aminoácidos. Las variantes funcionales de los anticuerpos monoclonales de la invención pueden obtenerse de dichas secuencias por medio de inserción, sustitución o supresión de uno o más aminoácidos y

pueden obtenerse por medios recombinantes y/o sintéticos.

Las variantes funcionales de los anticuerpos monoclonales de la invención deben conservar su capacidad para unirse al antígeno S100A7 y también la capacidad para inhibir una o más funciones características de la proteína S100A7, tales como la interacción de la proteína S100A7 con uno o más de sus ligandos, especialmente con su ligando RAGE y/o la inhibición de una o más de las funciones mediadas por S100A7, tales como la proliferación de células tumorales, metástasis, la formación de esferas tumorales o la migración y proliferación de células endoteliales. Dichas funciones pueden determinarse por medio de los procedimientos descritos en los ejemplos de la presente invención.

Las variantes funcionales de los anticuerpos monoclonales incluyen polipéptidos que muestran al menos 60 %, 65 %, 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % de similitud o identidad con la secuencia polipeptídica de dichos anticuerpos. El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina usando algoritmos implementados en un ordenador y procedimientos que conocen ampliamente los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP (BLAST Manual, Altschul, S. y col., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., y col., J., 1990, Mol. Biol. 215: 403-410).

Inflamación

La proteína S100A7 se expresa en enfermedades asociadas con inflamación tales como psoriasis (Anderson y col., Br. J. Dermatol, 2009; 160 (2): 325-32). Como resultado, los ligandos de proteína S100A7, y más específicamente, anticuerpos específicos contra esta proteína, son fármacos candidatos para usar en terapia para el tratamiento de dichas enfermedades.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo que se une específicamente con la proteína S100A7 o un fragmento de la misma con capacidad para unirse al antígeno para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada con inflamación.

Dicho anticuerpo o fragmento del mismo puede también tener actividad antimetastásica y/o actividad antiangiogénica pero no es necesario.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un anticuerpo que se une específicamente con la proteína S100A7 o a un fragmento del mismo con capacidad para unirse al antígeno para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada con inflamación.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con inflamación en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de un anticuerpo que se une específicamente con la proteína S100A7 o de un fragmento del mismo con capacidad para unirse al antígeno.

Los términos “anticuerpo”, “fragmento” y “antígeno” se han definido previamente.

Los fragmentos de anticuerpo incluidos en la presente invención conservan la capacidad para unirse al antígeno de S100A7 del anticuerpo completo del que derivan y también conservan la función de inhibir una o más funciones características de la proteína S100A7, tales como actividad de unión y/o estimulación de una respuesta celular. Por ejemplo, en una realización, un fragmento de anticuerpo puede inhibir la interacción de la proteína S100A7 con uno o más de sus ligandos, especialmente con su ligando RAGE y/o puede inhibir una o más funciones mediadas por dicha proteína tales como secreción de TNF alfa por células tumorales.

En este contexto, la expresión “TNF alfa o TNF- α ” se refiere a factor de necrosis tumoral alfa que es una citocina implicada en la inflamación sistémica y es un miembro que estimula la reacción de fase aguda. Se produce principalmente por macrófagos activados (M1), aunque puede producirse por muchos otros tipos celulares como linfocitos CD4+, células citolíticas naturales y neuronas. La presencia continuada de TNF α en el microambiente tumoral también está relacionada con una inflamación potenciada y progresión tumoral (Szlosarek y col., 2006, Eur. J. Cancer, 42 (6): 745-50).

Las expresiones “RAGE” y “anticuerpo capaz de inhibir la interacción de la proteína S100A7 con RAGE” se han definido previamente. Dichos anticuerpos conservan la función de inhibición de una o más funciones características de la proteína S100A7, tales como actividad de unión, actividad de señalización y/o la estimulación de una respuesta celular. Dicha inhibición de la interacción puede evaluarse por medio de los ensayos descritos en los ejemplos de la presente invención. Por ejemplo, en una realización, uno o más anticuerpos de la invención pueden inhibir una o más funciones mediadas por la proteína S100A7 tales como secreción de TNF alfa por células tumorales mostradas en el Ejemplo 9.

Como se usa en el presente documento, el término “S100A7” se refiere a una proteína que pertenece a la familia de proteínas de unión a calcio denominadas S100 que está asociada con la inflamación. El término también incluye todas las formas de modificaciones químicas postraduccionales fisiológicamente relevantes, por ejemplo, glucosilación, fosforilación o acetilación, etc., siempre que se mantenga la funcionalidad de la proteína. Dicho

término abarca la S100A7 de cualquier especie de mamífero, incluyendo, pero sin limitación, animales domésticos y de granja (vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores), primates y seres humanos. Preferentemente, la S100A7 es humana.

5 Las expresiones “S100A7 humana” y “variantes funcionalmente equivalentes de S100A7” se han definido previamente.

Las variantes de S100A7 contempladas en el primer aspecto de la presente invención muestran la capacidad de inhibición de la secreción de TNF alfa por células tumorales inducidas por proteína S100A7.

Como se ha mencionado previamente, también se contemplan modificaciones en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la invención.

10 La expresión “enfermedad asociada con inflamación” se refiere a todas las enfermedades en las que se produce inflamación patógena, es decir cuando dicho proceso es perjudicial o indeseable, bien sea canceroso o no. Las enfermedades asociadas con inflamación incluyen enfermedades inflamatorias, en las que hay una respuesta inflamatoria excesiva o alterada que conduce a síntomas inflamatorios. Dichas enfermedades inflamatorias que
 15 pueden tratarse por los anticuerpos de la invención incluyen, sin limitación, enfermedad de Addison, acné vulgar, alopecia areata, amiloidosis, espondilitis anquilosante, ulceraciones, estomatitis aftosa, artritis, arteriosclerosis, osteoartritis, artritis reumatoide, asma bronquial, enfermedad de Behcet, enfermedad de Boeck, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, coroiditis, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, crioglobulinemia, degeneración macular, dermatitis, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, diabetes insulino dependiente, diabetes juvenil, enfermedad desmielinizante inflamatoria, contractura de Dupuytren, encefalomiелitis, encefalomiелitis
 20 alérgica, endoftalmia, enteritis alérgica, síndrome de enteropatía autoinmunitaria, eritema nudoso leproso, espondilitis anquilosante, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, fibrosis quística, gingivitis, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, síndrome de Graves, enfermedad de Hashimoto, hepatitis crónica, histiocitosis, ileítis regional, iritis, lupus eritematoso diseminado, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso cutáneo, linfogranuloma, mononucleosis infecciosa, miastenia grave, mielitis transversal, mixedema idiopático primario, nefrosis, obesidad, oftalmia simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, paniculitis, pénfigo vulgar, periodontitis, poliarteritis nudosa, poliartritis crónica, polimiositis, polirradiculitis aguda, psoriasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, púrpura, piodermia gangrenosa, síndrome de Reiter, retinopatía diabética, rosácea, sarcoidosis, esclerosis atáxica, esclerosis sistémica progresiva, escleritis, esclerodermia, esclerosis múltiple, esclerosis diseminada, uveítis anterior aguda, vitíligo, enfermedad de Whipple, enfermedades asociadas con el
 25 SIDA, inmunodeficiencia combinada grave y virus de Epstein Barr tal como síndrome de Sjögren, tuberculosis osteoarticular y enfermedades parasitarias tales como leishmaniosis. Son enfermedades inflamatorias preferidas la artritis reumatoide, arterioesclerosis, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino y enfermedad de injerto contra huésped. En una realización más preferida la enfermedad inflamatoria es psoriasis.

35 En una realización de la presente invención, el medicamento comprende uno o más anticuerpos de acuerdo con la invención como el único agente terapéutico. Sin embargo, el medicamento de la invención también puede contener uno o varios compuestos adicionales para el tratamiento de enfermedades asociadas con la inflamación. Por lo tanto, en otra realización de la presente invención, el medicamento se prepara para la administración combinada de un anticuerpo de acuerdo con la invención y uno o más agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de dichas enfermedades. Los términos “medicamento”, “prevención” y “tratamiento” se han definido previamente.

40 La expresión “agente terapéutico útil en el tratamiento de dicha enfermedad” se refiere a un agente adecuado para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con inflamación.

Los agentes antiinflamatorios que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención incluyen pero sin limitación cualquier agente capaz de actuar como un agente antiinflamatorio tal como ácido 5-aminosalicílico y medicamentos que los contienen (sulfasalazina, mesalamina, mesalazina, osalazina); ácido acetilsalicílico;
 45 corticosteroides tales como hidrocortisona, cortisona, triamcinolona, budesonida, prednisona, deflazacort, metotrexato; infliximab o adalimumab.

Como “administración combinada” se entiende que el anticuerpo de acuerdo con la invención se administra conjuntamente o por separado, simultáneamente, al mismo tiempo o secuencialmente con un agente terapéutico útil en el tratamiento de una enfermedad asociada con inflamación en cualquier orden. Por ejemplo, la administración
 50 del anticuerpo de la invención puede realizarse en primer lugar, seguido de la administración de uno o más agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de dicha patología; o la administración del anticuerpo de la invención puede realizarse al final, precedida de la administración de uno o más agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de dicha patología; o la administración del anticuerpo de la invención puede realizarse al mismo tiempo que la administración de uno o más agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de dicha patología.

55 En una realización particular, el anticuerpo usado es un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706.

La expresión “variante funcional” de los anticuerpos monoclonales se ha definido previamente. Las variantes

funcionales de los anticuerpos monoclonales de la invención deben conservar su capacidad para unirse al antígeno de S100A7 y también la capacidad para inhibir una o más funciones características de la proteína S100A7, tales como la interacción de la proteína S100A7 con uno o más de sus ligandos, especialmente con su ligando RAGE y/o la inhibición de una o más de las funciones mediadas por S100A7, tales como la secreción de TNF- α

5 Anticuerpos monoclonales de la invención

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal específico anti S100A7 producido por un hibridoma seleccionado del grupo of ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7.

10 Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” se refiere a una inmunoglobulina que muestra actividad de unión específica hacia una molécula o un antígeno diana, que en este caso específico es la proteína S100A7.

En el presente documento, el “antígeno” es la molécula a la que se une específicamente un anticuerpo. Específicamente, el antígeno para los anticuerpos de la invención es la proteína S100A7.

15 Los anticuerpos de la invención son capaces de unirse a un epítipo de la proteína S100A7. El término “epítipo” o “determinante antigénico” incluye cualquier región de un antígeno que reconozca específicamente un anticuerpo. El mismo antígeno puede tener diferentes epítopos. Cada epítipo consiste habitualmente en grupos de superficies químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, que tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se requieren típicamente al menos 6, 8, 10 o 12 aminoácidos contiguos para formar un epítipo. Sin embargo, los epítopos que implican aminoácidos no contiguos pueden requerir más, por ejemplo, al menos 15, 25 o 50 aminoácidos.

20 En el contexto de este segundo aspecto, un “anticuerpo monoclonal específico anti S100A7” es un anticuerpo homogéneo producido por una célula híbrida o hibridoma que es capaz de reconocer específicamente un epítipo específico de la proteína S100A7, pero no reconoce otras proteínas de la familia S100. Los anticuerpos monoclonales de la invención reconocen preferentemente S100A7 humana, pero también pueden reconocer la proteína S100A7 de otra especie de mamífero como se ha descrito en el contexto del primer aspecto de la invención. En realizaciones preferidas de la invención, el anticuerpo monoclonal es cualquiera de los mencionados en este segundo aspecto de la invención.

30 El término S100A7 se ha definido en el contexto del primer aspecto de la invención.

En el contexto de la presente invención, se entiende como “célula híbrida” o “hibridoma” el producto de la fusión de un clon de célula B descendiente de una única célula madre, y de una célula de mieloma. Específicamente, los anticuerpos monoclonales del segundo aspecto de la invención se corresponden con los anticuerpos monoclonales anti S100A7 a los que se hace referencia en la parte experimental del presente documento como 2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3, que se han obtenido a partir de los hibridomas generados por los inventores e identificados como 2D9-1C4-3D7-5E6, 2H3-1A12-5E12-1A4, 6E3-2D5-1F9-5B4, 6F5-2F8-2G9-1A2, 8B6-1A9-5A8-8G2 y 9F3-3E6-2D7-3B3, respectivamente. Dichos hibridomas se han depositado antes de presentar la presente solicitud de patente en la Colección Europea De Cultivos Celulares (ECACC), Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, Reino Unido, como una institución reconocida legalmente para ese fin de acuerdo con el tratado de Budapest del 28 de abril de 1977, sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos.

45 La Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) ha asignado a los hibridomas 2D9-1C4-3D7-5E6, 2H3-1A12-5E12-1A4, 6E3-2D5-1F9-5B4, 6F5-2F8-2G9-1A2, 8B6-1A9-5A8-8G2 y 9F3-3E6-2D7-3B3 los números de depósito respectivos, ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706. Las condiciones de cultivo de dichas líneas de hibridoma que permiten obtener los anticuerpos monoclonales anti S100A7 de la invención se describen en el contexto del procedimiento para obtener los anticuerpos monoclonales de la invención.

En el presente documento, los hibridomas 2D9-1C4-3D7-5E6, 2H3-1A12-5E12-1A4, 6E3-2D5-1F9-5B4, 6F5-2F8-2G9-1A2, 8B6-1A9-5A8-8G2 y 9F3-3E6-2D7-3B3 y los anticuerpos producidos por dichos hibridomas se indican por medio de su nombre abreviado 2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3 respectivamente.

50 La invención también contempla polipéptidos que tienen al menos un fragmento de la secuencia de los anticuerpos monoclonales anti S100A7 específicos del segundo aspecto de la invención que mantienen la capacidad para unirse a S100A7. Dicha capacidad para unirse puede comprobarse por medio de procedimientos conocidos por los expertos en la materia, tales como ELISA, transferencia de Western o técnicas inmunocitoquímicas o inmunohistoquímicas como se describe en los Ejemplos 4, 5 y 6 de la presente invención.

55 Se entienden como “polipéptidos” moléculas formadas por la unión de al menos 10 aminoácidos por medio de enlaces peptídicos. Los polipéptidos de la invención deben tener al menos un fragmento de la secuencia de los

- anticuerpos monoclonales específicos anti S100A7 mencionados. Dicho "fragmento de la secuencia" puede corresponder a una o varias partes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal mencionado que mantiene la capacidad para unirse a S100A7 y, por lo tanto, el polipéptido debe incluir la secuencia de las 6 regiones CDR, que pueden usarse para obtener los anticuerpos definidos en el contexto del primer aspecto de la invención, tales como, sin limitación, anticuerpos modificados por ingeniería genética tales como anticuerpos químicos, anticuerpos humanizados o anticuerpos biespecíficos. Dicho "fragmento de la secuencia" también puede usarse para obtener fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab, F(ab')₂, Fab', Fv monocatenario (scFv), diacuerpos o nanocuerpos.
- Los fragmentos Fab y F(ab')₂ pueden obtenerse por medio de escisión enzimática o química de los anticuerpos monoclonales intactos del segundo aspecto de la invención.
- La digestión con papaína de un anticuerpo monoclonal de la invención produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno. A su vez, el fragmento "F(ab')₂", que tiene dos sitios de unión a antígeno, se obtiene por tratamiento con pepsina.
- Adicionalmente, el "fragmento de la secuencia" permite obtener otro tipo de fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos Fab', fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o diacuerpos por medio de técnicas de ingeniería genética.
- Los anticuerpos monoclonales del segundo aspecto de la invención han demostrado que pueden neutralizar la proliferación de células tumorales. Por lo tanto, en una realización particular, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado de ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706.
- Se entiende que "detener el crecimiento tumoral" es la inhibición de la proliferación de dichas células tumorales en al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, 100 %; preferentemente al menos 30 %; más preferentemente al menos 35 %; aún más preferentemente al menos 60 %; más preferentemente al menos 65 %. Dicha inhibición de la proliferación o detención del crecimiento puede evaluarse por medio de los ensayos descritos en los Ejemplos 11 y 15 de la presente invención.
- Los anticuerpos monoclonales del segundo aspecto de la invención han demostrado poder neutralizar la migración de células tumorales.
- Se entiende que "detener la migración de células tumorales" es la inhibición de la migración de dichas células tumorales en al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, 100 % con respecto a la migración en células no tratadas; preferentemente al menos 55 %; más preferentemente al menos 60 %; aún más preferentemente al menos 65 %; más preferentemente al menos 70 %; aún más preferentemente al menos 80 %; aún más preferentemente al menos 90 %. Dicha inhibición de la migración puede evaluarse por medio de los ensayos descritos en el Ejemplo 12 de la presente invención.
- Los anticuerpos monoclonales del segundo aspecto de la invención han demostrado que pueden neutralizar la formación de esferas tumorales.
- Se entiende que "inhibir la formación de esferas tumorales" es la inhibición de la formación de dichas esferas tumorales en al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, 100 % con respecto a células no tratadas; preferentemente al menos 55 %; más preferentemente al menos 60 %; aún más preferentemente al menos 65 %; más preferentemente al menos 70 %. Dicha inhibición de la formación de esferas tumorales puede evaluarse por medio de los ensayos descritos en el Ejemplo 10 de la presente invención.
- Se entiende como "célula tumoral" una célula maligna, también conocida como célula cancerosa o carcinogénica que crece y se divide más allá de los límites normales, invadiendo el tejido circundante y provocando en ocasiones metástasis. Las células tumorales que pueden tratarse con los anticuerpos de la presente invención son células que sobreexpresan la proteína S100A7. Dichas células incluyen células tumorales de líneas celulares conocidas y establecidas y células tumorales presentes en el organismo de un paciente que padece cáncer. Varios ejemplos no limitantes ilustrativos de líneas tumorales conocidas que sobreexpresan S100A7 son MDA-MB-468 y MCF-7. Son ejemplos no limitantes ilustrativos de células tumorales presentes en un paciente que padece cáncer y que sobreexpresan S100A7 células tumorales de tumores de mama (Ethan y col., Clin. Can. Res., 2003, 9:2627-2631; Nasser y col., Cancer Res., 2012, 72:604-615), tumores gástricos (El-Rifai y col., Cancer Res., 2002, 62:6823-6826), tumores de pulmón (Zhang y col., Thorax, 2008, 63(4): 352-359), tumores de vejiga (Ostergaard M y col., Cancer Res, 1997: 57:4111-4117), tumores cutáneos epiteliales (Moubayed y col., J Cancer Res Clin Oncol, 133:253-61; Alowami y col., BMC Dermatol, 3:1), tumores de cabeza y cuello (Tripathi y col., Plos One, 2010, 5(8):e11939), tumores ováricos (Gagnon y col., Clin. Cancer Res., 2008, 14(3):764-761).
- Las células tumorales que expresan la proteína S100A7 pueden identificarse por medios de procedimientos convencionales tales como ELISA o transferencia de Western, de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente invención.
- En una realización, las células tumorales cuyo crecimiento se detiene por medio de los anticuerpos de la invención

son células tumorales de cualquier tipo de tumor con la excepción de cáncer de mama. En otra realización las células tumorales cuyo crecimiento se detiene por medio de los anticuerpos de la invención son células tumorales de carcinoma colorrectal. En otra realización las células tumorales cuyo crecimiento se detiene por medio de los anticuerpos de la invención son células tumorales de fibrosarcoma. En otra realización las células tumorales cuyo crecimiento se detiene por medio de los anticuerpos de la invención son células tumorales de mama.

Los anticuerpos de la invención también son capaces de mostrar actividad antimetastásica. Por lo tanto, en una realización preferida el anticuerpo monoclonal o polipéptido de acuerdo con la invención es antimetastásico.

Se entiende como "antimetastásico" una sustancia química o biológica que inhibe o reduce la metástasis, es decir, la propagación a distancia, fundamentalmente por el torrente sanguíneo o linfático, de las células que provocan cáncer, y el crecimiento de nuevos tumores en los sitios de destino de dicha metástasis. Preferentemente, se entiende como el anticuerpo antimetastásico o fragmento del mismo de la invención la inhibición de la metástasis de dichas células tumorales en al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, 100 %.

Los anticuerpos monoclonales del segundo aspecto de la invención son capaces de inhibir la angiogénesis o neovascularización.

Se entiende como "inhibición de la proliferación de células endoteliales" inhibición de la proliferación de dichas células en al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, 100 % con respecto a la migración de células no tratadas; preferentemente al menos 55 %; más preferentemente al menos 60 %; aún más preferentemente al menos 65 %; más preferentemente al menos 70 %; más preferentemente al menos 80 %; aún más preferentemente al menos 90 %.

La expresión "capacidad de migración de células endoteliales" se refiere a la capacidad de dichas células para moverse lo que es una etapa clave en la formación de neovasculatura. En una realización preferida dichas células son células endoteliales humanas que son células que revisten todos los vasos de un organismo mamífero. Las células endoteliales humanas incluidas en dicha definición son, sin limitación, células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). En una realización preferida las células endoteliales humanas son células HUVEC.

Los anticuerpos monoclonales del segundo aspecto de la invención han demostrado que son capaces de bloquear la secreción de formas activas de metaloproteinasa MMP9.

La expresión "bloquear la secreción de formas activas de metaloproteinasa MMP9" se entiende como la inhibición de la secreción de dichas formas activas en al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, 100 % con respecto a la secreción en células no tratadas; preferentemente al menos 70 %; más preferentemente al menos 80 %; más preferentemente al menos 90 %; aún más preferentemente al menos 95 %; aún más preferentemente al menos 99 %; lo más preferido 100 %.

Los anticuerpos monoclonales del segundo aspecto de la invención han demostrado que pueden neutralizar la secreción de TNF- α por células tumorales que se asocia con inflamación.

Se entiende como "inhibir la secreción de TNF- α " la inhibición de la secreción de dicho TNF- α en al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, 100 % con respecto a la migración en células no tratadas; preferentemente al menos 55 %; más preferentemente al menos 60 %; aún más preferentemente al menos 65 %; preferentemente al menos 70 %; más preferentemente al menos 80 %; aún más preferentemente al menos 90 %.

Los anticuerpos monoclonales del segundo aspecto de la invención han demostrado que pueden bloquear la migración de monocitos que se asocia con inflamación.

La expresión "bloquear la migración de monocitos" se entiende como la inhibición de la migración de monocitos en al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, 100 % con respecto a la migración en células no tratadas; preferentemente al menos 40 %; más preferentemente al menos 50 %; más preferentemente al menos 70 %; más preferentemente al menos 80 %; más preferentemente al menos 90 %; aún más preferentemente al menos 95 %; incluso más preferentemente al menos 99 %.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal específico anti S100A7 producido por un hibridomas seleccionado del grupo de ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7 para su uso en medicina.

Procedimiento para obtener los anticuerpos monoclonales de la invención

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para obtener un anticuerpo monoclonal de acuerdo con el segundo aspecto de la invención que comprende cultivar una línea celular de hibridoma seleccionada de las líneas celulares depositadas con los números de acceso ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703,

ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 en condiciones que permiten la producción de dicho anticuerpo.

5 El procedimiento para obtener los anticuerpos monoclonales del segundo aspecto de la invención puede realizarse de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica. Básicamente, el procedimiento consiste en cultivar la línea celular del hibridoma en un medio de cultivo adecuado para que las células de hibridoma produzcan anticuerpos y los secreten al medio, y posteriormente en recoger el sobrenadante del medio de cultivo que contiene los anticuerpos monoclonales producidos. Dichos anticuerpos pueden purificarse opcionalmente por medios convencionales, tales como cromatografía de afinidad, proteína A sepharose, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel o diálisis.

10 La expresión "anticuerpo monoclonal" ya se ha definido en el aspecto previo.

Se entiende como "cultivar" una línea celular de hibridoma incubar las células de hibridoma en presencia de un medio adecuado en viales de cultivo durante el tiempo necesario y en las condiciones adecuadas para que se produzca la multiplicación de dichas células y la producción de los anticuerpos monoclonales de la invención. Dicho cultivo puede implicar el uso de medio de cultivo con diferentes composiciones. Preferentemente, en una primera etapa las células se cultivan en un medio que contiene suero para favorecer su multiplicación y, después de recoger las células y lavarlas, se cultivan en un medio sin suero para obtener anticuerpos. Son medios de cultivo adecuados para obtener los anticuerpos de acuerdo con este procedimiento, sin limitación, DMEM/F12 complementado con L-glutamina y suero de ternero fetal para favorecer la multiplicación celular y la mezcla basada en el medio DMEM/F12 complementado con L-glutamina pero que carece de suero de ternero fetal ("medio sin proteínas") como un medio de recogida de anticuerpos. El medio para producir anticuerpos también podría consistir en cualquier medio o mezcla de medios de cultivo celular sintéticos cuya composición y complementación posterior no incluyen proteínas ("medio sin proteínas") o dichas proteínas están en una proporción muy baja ("medio sin suero" o "medio bajo en proteínas") y no pertenecen al grupo de inmunoglobulinas. Dicho medio debe permitir el crecimiento celular y el mantenimiento así como la secreción de anticuerpos por la línea celular de hibridoma previamente adaptada para crecer en ausencia de suero de ternero fetal. En una realización preferida el medio adecuado para el cultivo de dichas células es un medio que comprende DMEM/F12 y L-glutamina. Las condiciones en las que se realiza dicho cultivo son preferentemente en un ambiente húmedo y a una temperatura de 37 °C con atmósfera de aire convencional o aire enriquecido con CO₂ 5 %.

30 Por lo tanto, en otro aspecto la invención se refiere a una línea celular de hibridoma seleccionada de las líneas celulares depositadas con el número de acceso ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706.

La expresión "línea celular de hibridoma" se refiere a una línea celular formada por células híbridas o hibridomas como se ha definido previamente en el segundo aspecto de la invención. Dicha línea celular de hibridoma se ha obtenido por metodologías convencionales como se describe en los Ejemplos 2 y 3 de la presente invención. Brevemente, se inmunizaron ratones con una proteína S100A7 recombinante humana y se extrajeron células del bazo del ratón inmunizado, que se fusionaron con células de mieloma en presencia de un inductor de fusión tal como PEG-1500. Los hibridomas se seleccionaron en medio HAT y cada clon seleccionado se subclonó por dilución limitante. Los clones adecuados para expansión se adaptaron al medio DMEM/F12 y se congelaron, constituyendo las líneas celulares de hibridoma ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706.

En realizaciones preferidas de la invención, el anticuerpo monoclonal preparado por medio de este procedimiento puede ser cualquiera de los producidos por las líneas celulares de hibridoma descritas en el contexto de la presente invención.

Composiciones farmacéuticas de los anticuerpos monoclonales de la invención

45 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo monoclonal de acuerdo con el segundo aspecto de la invención o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 Como se usa en la presente invención, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una formulación que se ha adaptado para administrar una dosis predeterminada de uno o varios agentes terapéuticos útiles a una célula, un grupo de células, un órgano, un tejido o un animal en el que hay una sobreexpresión de la proteína S100A7.

Se entiende como "cantidad farmacéuticamente eficaz" una cantidad capaz de proporcionar un efecto terapéutico, y que puede determinarse por el experto en la materia por medios usados habitualmente.

55 Las composiciones de la invención pueden contener uno o más anticuerpos monoclonales de acuerdo con el segundo aspecto de la invención o uno o más polipéptidos que tienen al menos un fragmento de la secuencia de dichos anticuerpos monoclonales con capacidad para unirse a S100A7.

Las composiciones de la invención también pueden contener uno o varios compuestos adicionales para la prevención y/o el tratamiento de patologías en las que hay una sobreexpresión de la proteína S100A7, tal como cáncer. Dichos compuestos adicionales tales como agentes citotóxicos, agentes antiangiogénicos, agentes antimetastásicos, agentes antiproliferativos y agentes antiinflamatorios pueden formar parte de la composición farmacéutica como entidades independientes de los anticuerpos monoclonales o también formar conjugados con dichos anticuerpos.

Las composiciones farmacéuticas se preparan por medios convencionales con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Se entiende como "excipiente farmacéuticamente aceptable" una sustancia terapéuticamente inactiva que se dice que se usa para incorporar el principio activo y que es aceptable para el paciente desde un punto de vista farmacológico/toxicológico y para el químico farmacéutico que lo fabrica desde un punto de vista físico/químico con respecto a la composición, formulación, estabilidad, aceptación del paciente y biodisponibilidad.

El número y la naturaleza de los excipientes farmacéuticamente aceptables dependen de la forma de dosificación deseada. Los expertos en la materia conocen excipientes farmacéuticamente aceptables (Fauli y Trillo C. (1993) "Tratado de Farmacia Galénica", Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid). Dichas composiciones pueden prepararse por medio de los procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica ("Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª edición (2003) Genaro A. R., ed., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Estados Unidos).

Las composiciones farmacéuticas que contienen un anticuerpo monoclonal de acuerdo con el segundo aspecto de la invención o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dichos anticuerpos monoclonales con capacidad para unirse a S100A7 pueden administrarse por cualquier tipo de vía adecuada, tal como por vía oral, vía tópica, por inhalación o por vía parenteral de modo que se incluyan los excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma de dosificación deseada. La vía preferida de administración de la composición farmacéutica es la vía endovenosa.

Se entiende como "vía oral" la composición farmacéutica incorporada en el organismo después de la deglución. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención puede estar en una forma de dosificación adecuada para su administración por vía oral, bien sea sólida o bien líquida. Las formas de dosificación adecuadas para su administración por vía oral pueden ser comprimidos, cápsulas, jarabes o soluciones, y pueden contener cualquier excipiente convencional conocido en la técnica, tal como aglutinantes, por ejemplo, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol o polivinilpirrolidona; agentes de carga, por ejemplo, lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o glicina; lubricantes para compresión, por ejemplo, estearato de magnesio; agentes disgregantes, por ejemplo, almidón, polivinilpirrolidona, glicolato sódico de almidón o celulosa microcristalina; o agentes humectantes farmacéuticamente aceptables tales como laurilsulfato sódico. Las composiciones orales sólidas pueden prepararse por medio de procedimientos convencionales de mezclado, carga o compresión. Pueden usarse operaciones de mezclado repetitivas para distribuir completamente el agente activo en las composiciones que usan altas cantidades de agentes de carga. Dichas operaciones son convencionales en la técnica. Los comprimidos pueden prepararse, por ejemplo, por medio de granulación húmeda o seca, y opcionalmente revestirlos de acuerdo con los procedimientos conocidos en la práctica farmacéutica habitual, particularmente con un revestimiento entérico.

Por otro lado, se entiende como "vía tópica" una administración por vía no sistémica, e incluye la aplicación de una composición farmacéutica de la invención de forma externa en la epidermis, en la cavidad oral y la instilación de dicha composición en oídos, ojos y nariz, y en la que no entra significativamente en el torrente sanguíneo. Se entiende como "vía sistémica" la administración por vía oral, vía intravenosa, vía intraperitoneal y vía intramuscular. La cantidad de anticuerpo requerida para el efecto terapéutico o profiláctico variará de forma natural según el anticuerpo elegido, la naturaleza y la gravedad de la enfermedad que se va a tratar y el paciente.

Se entiende como "inhalación" la administración por vía intranasal y por inhalación oral. Las formas de dosificación adecuadas para dicha administración, tales como una formulación en aerosol o un inhalador de dosis medida, pueden prepararse por medio de técnicas convencionales.

Como se usa en el presente documento, el término "parenteral" incluye la administración por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular o por vía subcutánea. Se prefieren en general las formas de dosificación subcutánea, intramuscular e intravenosa de administración parenteral.

En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden adaptarse para su administración parenteral, tales como soluciones estériles, suspensiones o productos liofilizados en la forma unitaria de dosificación apropiada. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para su administración por vía intravenosa, algunos vehículos adecuados incluyen solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril, y debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil capacidad de inyección. Debe ser estable en las

condiciones de preparación y almacenamiento, y debe protegerse de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol farmacéuticamente aceptable tal como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, por medio del uso de un revestimiento tal como lecitina, por medio del mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y por medio del uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse por medio de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, tiomersal y similares. En la mayoría de los casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares; polialcoholes tales como manitol, sorbitol; o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede estar provocada por la inclusión de un agente que retarde la absorción, por ejemplo, aluminio y monoestearato de gelatina.

Las soluciones estériles inyectables pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes anteriormente mencionados, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración a través de membranas estériles. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y el resto de los ingredientes requeridos de entre los enumerados previamente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones estériles inyectables, los procedimientos de preparación preferidos son secado al vacío y liofilización que dan lugar a un polvo con el principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución estéril filtrada previamente del mismo. El anticuerpo se almacenará habitualmente en forma liofilizada o en solución. Las composiciones de anticuerpo terapéutico se alojan generalmente en un envase que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un adaptador que permite la recuperación de la formulación, tal como un tapón que puede perforarse por una aguja de inyección hipodérmica.

La composición farmacéutica puede administrarse convenientemente por medio de infusión por pulsos, por ejemplo, con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferentemente, la dosis se administra por medio de inyecciones, más preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo parcialmente de si la administración es aguda o crónica.

En una realización, la composición farmacéutica que contiene el anticuerpo del segundo aspecto de la invención se prepara con vehículos que protegerán dicho anticuerpo de una eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles biodegradables tales como etilenvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos para preparar dichas formulaciones resultarán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc.

Las composiciones de liberación sostenida también incluyen preparaciones de cristales de anticuerpos suspendidos en formulaciones adeudadas que pueden mantener los cristales en suspensión. Estas preparaciones, cuando se inyectan por la vía subcutánea o intraperitoneal pueden producir un efecto de liberación sostenido. Otras composiciones también incluyen anticuerpos inmovilizados en liposomas. Los liposomas que contienen dichos anticuerpos se preparan por medio de procedimientos conocidos tales como Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 82:3688-3692; Hwang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1980) 77:4030-4034; documentos EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949.

Las composiciones de la invención son adecuadas para la administración a cualquier tipo de mamífero, preferentemente un ser humano.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en medicina.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer y/o la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades asociadas con inflamación.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del cáncer y/o la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada con inflamación. En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento o prevención del cáncer y/o una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de una composición de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con la inflamación en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de una composición de acuerdo con la invención.

Conjugados de los anticuerpos monoclonales de la invención y sus usos

5 Dado que los anticuerpos monoclonales de la invención son capaces de unirse a la proteína S100A7 y que esta proteína está sobreexpresada en cáncer y procesos inflamatorios, los anticuerpos monoclonales producidos por un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7 constituyen agentes adecuados para portar compuestos con actividad terapéutica hacia los sitios de expresión de S100A7.

La proteína S100A7 se expresa, como se ha detallado anteriormente, en una amplia diversidad de cánceres.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado de ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal y un segundo componente seleccionado del grupo de:

- (a) agente citotóxico,
- (b) un agente antiangiogénico,
- (c) un agente antimetastásico,
- (d) un agente antiproliferativo y
- 20 (e) un agente antiinflamatorio

Se entiende como "conjugado" en el contexto de la presente invención un ensamblaje formado por un anticuerpo de acuerdo con el segundo aspecto de la invención unido, ligado o asociado con al menos un segundo componente.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal", "hibridoma", "polipéptido" y "fragmento de la secuencia" se han definido en el contexto del segundo aspecto de la invención.

25 Se entiende como "segundo componente" una molécula con actividad terapéutica que se dirige a su sitio de acción por medio del anticuerpo monoclonal de la invención.

La proteína S100A7 está sobreexpresada en células tumorales. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales de la invención pueden usarse para dirigir fármacos antitumorales a los sitios de expresión. La proteína S100A7 se expresa en enfermedades asociadas con inflamación tales como psoriasis. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales de la invención pueden usarse para dirigir fármacos antiinflamatorios a los sitios de expresión.

Como se usa en la presente invención, la expresión "agente citotóxico" se refiere a un agente que es capaz de promover la muerte celular y que tiene la capacidad de reducir el crecimiento, detener el crecimiento o destruir las células y, particularmente, células de rápida proliferación y, aún más particularmente, células tumorales. La muerte celular puede estar provocada por cualquier mecanismo, tal como por ejemplo apoptosis, aunque no se limita a esta causa, por la inhibición del metabolismo, la interferencia con la organización del citoesqueleto o la modificación química del ADN. La expresión agente citotóxico comprende cualquier agente quimioterapéutico incluyendo moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, oligonucleótidos y similares; toxinas; enzimas; citocinas; radioisótopos o agentes de radioterapia.

Se entienden como "agentes quimioterapéuticos" compuestos químicos tales como, sin limitación, antraciclina, antibióticos tales como doxorubicina y daunorrubicina, taxanos tales como Taxol™ y docetaxel, alcaloides de la vinca tales como vincristina y vinblastina, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, irinotecán, idarrubicina, mitomicina C, oxaliplatino, raltitrexed, tamoxifeno, cisplatino, carboplatino, metotrexato, actinomicina D, mitoxantrona, blenoxano o mitramicina.

Se entiende como "toxina" un agente tóxico que se conjuga con el anticuerpo monoclonal de la invención que forma una inmunotoxina. La conjugación de determinadas toxinas con anticuerpos reduce la toxicidad de las primeras, permitiendo su uso como agentes terapéuticos, debido a que de otro modo serían demasiado tóxicas. La unión entre la toxina y el anticuerpo se realiza químicamente, conservando su actividad biológica. Su separación se produce en general en los lisosomas de las células diana reconocidas por el anticuerpo de modo que la unión química mencionada solamente se rompe en el ambiente celular ácido cerrado proporcionado por los lisosomas. Son toxinas útiles en el contexto de la presente invención toxinas vegetales, toxinas bacterianas, toxinas de origen fúngico o animal y fragmentos de las mismas, tales como, sin limitación, la cadena A de ricina, saponina, la cadena A de difteria, fragmentos no de unión activos de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, cadena A de abrina, cadena A de modicina, α -sarcina, proteínas A de *Leurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos.

Se entiende como “enzimas” en el contexto de la presente invención enzimas activadoras de fármacos o toxinas, tales como, sin limitación, fosfatasa alcalina que activa etopósido y doxorubicina; carboxipeptidasa G2 que activa mostazas del nitrógeno; beta-lactamasa que activa doxorubicina, paclitaxel y mitomicina.

5 Se entienden como “citocinas” péptidos de diferentes tamaños y pesos moleculares que sintetizan las células del sistema inmunitario para el fin de regular la respuesta inmunitaria, y pueden ser hormonas, factores de crecimiento, factores de necrosis, etc. Pueden ser de origen natural o de cultivos celulares recombinantes y equivalentes biológicamente activos de citocinas de secuencia natural. Su conjugación con anticuerpos da lugar a inmunocitocinas. Son citocinas útiles en la presente invención, sin limitación, factor TNF alfa, INF-gamma, factor GM-
GSF o IL-2.

10 Se entienden como “radioisótopos” isótopos radiactivos tales como, sin limitación, ¹³¹I, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁸Re, ⁶⁷Cu, ²¹¹At, ²¹³Bi, ¹²⁵I, ¹¹¹In.

Se entienden como “agente antiangiogénico” una sustancia química o biológica que inhibe o reduce la formación de nuevos vasos sanguíneos, es decir, la angiogénesis.

15 Los agentes antiangiogénicos que pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención incluyen, sin limitación, un agente antiangiogénico seleccionado del grupo de paclitaxel, 2-metoxiestradiol, prinomastat, batimastat, BAY 12-
9566, carboxiamidotriazol, CC-1088, ácido dextrometorfano acético, ácido dimetilxantenona acético, endostatina, IM-
862, marimastat, penicilamina, PTK787/ZK 222584, RPI.4610, lactato de escualamina, SU5416, talidomida, combretastatina, tamoxifeno, COL-3, neovastat, BMS-275291, SU6668, anticuerpos anti VEGF, Medi-522 (vitaxin II),
20 CAI, interleucina 12, IM862, amilorida, angiostatina, angiostatina KI-3, angiostatina K1-5, captoprilo, DL-alfa-
difluorometilornitina, DL-alfa-difluorometilornitina HCl, endostatina, fumagilina, herbimicina A, 4-
hidroxifenilretinamida, juglona, laminina, hexapéptido de laminina, pentapéptido de laminina, lavendustina A, medroxiprogesterona, minociclina, inhibidor de la ribonucleasa de la placenta, suramina, trombospondina,
25 anticuerpos dirigidos contra factores proangiogénicos (por ejemplo, Avastin, Erbitux, Vectibix, Herceptin); inhibidores de la tirosina quinasa de bajo peso molecular de factores de crecimiento proangiogénicos (por ejemplo Tarceva,
Nexavar, Sutent, Iressa); inhibidores de mTOR (por ejemplo Torisel); interferón alfa, beta y gamma, IL-12, inhibidores de metaloproteínasa de la matriz (por ejemplo, COL3, marimastat, batimastat); ZD6474, SU11248,
vitaxin; inhibidores de PDGFR (por ejemplo Gleevec); NM3 y 2- ME2; ciclopéptidos tales como cilengitida.

30 Se entiende como “agente antimetastásico” una sustancia química o biológica que inhibe o reduce la metástasis, es decir, la propagación a distancia, fundamentalmente por el torrente sanguíneo o linfático, de las células que provocan cáncer y el crecimiento de nuevos tumores en los sitios de destino de dicha metástasis.

35 Los agentes antimetastásicos que pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención incluyen, sin limitación, cualquier agente citotóxico capaz de actuar como un agente antimetastásico, tales como agentes alquilantes; antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo, perimetrexed (MTA), raltitrexed (TDX); agentes citotóxicos de platino tales como cisplatino u oxaliplatino; inhibidores de topoisomerasa; agentes antimicrotubulares; antraciclinas; alcaloides vegetales; inhibidores de GTPasa; inhibidores de la angiogénesis; inhibidores de metaloproteínasa de la matriz; inhibidores de las quinasas reguladoras del ciclo celular, tales como los inhibidores de ciclina y de quinasas dependientes de ciclina; inhibidores de la señalización de Wnt; inhibidores del factor de transcripción E2F; inhibidores de la histona desacetilasa; o inhibidores de AKT quinasa o ATPasa.

40 Los conjugados del anticuerpo y otros agentes pueden crearse usando una diversidad de agentes de acoplamiento o enlazadores proteicos bifuncionales. El enlazador puede ser un “enlazador escindible” que permite la liberación del agente en la célula, tal como un enlazador lábil por ácidos, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro.

45 Se entiende como “agente antiproliferativo” una sustancia química o biológica que es capaz de prevenir o inhibir la formación o el crecimiento de tumores. Los agentes antiproliferativos incluyen pero sin limitación (i) antimetabolitos tales como antimetabolitos de ácido fólico (aminopterina, denopterina, metotrexato, edatrexato, trimetrexato, nolatrexol, lometrexol, pemetrexed, raltitrexed, piritrexim, pteropterina, leucovorina, 10-propargil-5,8-didesazafolato (PDDF, CB3717)), análogos de purina (cladribina, clofarabina, fludarabina, mercaptopurina, pentostatina, tioguanina) y análogos de pirimidina (capecitabina, citarabina o ara-C, decitabina, fluorouracilo, 5-fluorouracilo, doxifluridina, floxuridina y gemcitabina) (ii) productos naturales, tales como antibióticos antitumorales e inhibidores mitóticos tales como alcaloides de la vinca tales como vindesina, vincristina, vinblastina, vinorelbina; taxanos tales como paclitaxel (Taxol™), docetaxel (Taxotere™); colchicina (NSC 757), tiocolchicina (NSC 361792), derivados de colchicina (por ejemplo, NSC 33410) y alocolchicina (NSC 406042); halicondrina B (NSC 609395); dolastatina 10 (NSC 376128); maitansina (NSC 153858); rizoxina (NSC 332598); epotilona A, epotilona B; discodermolide; estramustina; nocodazol; (iii) hormonas y antagonistas de las mismas, tales como tamoxifeno, toremifeno, anastrozol, arzoxifeno, lasofoxifeno, raloxifeno, nafoxidina, fulvestrant, aminoglutetimida, testolactona, atamestano, exemestano, fadrozol, formestano, letrozol, goserelina, leuprorelina o leuprolide, buserelina, histrelina, megestrol y fluoximesterona; (iv) agentes biológicos, tales como vectores víricos, interferón alfa e interleucinas; (v) compuestos basados en platino tales como carboplatino, cisplatino [cis-diaminodicloroplatino (CDDP)], oxaliplatino, iroplatino, nedaplatino, tetranitrito de triplatino, tetraplatino, satraplatino (JM216), JM118 [cis amino dicloro (II)], JM149 [cis amino dicloro

(ciclohexilamina) trans dihidroxo platino (IV)], JM335 [trans amino dicloro dihidroxo platino (IV)], transplatino, ZD0473, cis, trans, cis- Pt(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)(OOC₃H₇)₂Cl, malanato-1,2-diaminociclohexanoplatino(II), 5-sulfosalicilato-trans-(1,2- diaminociclohexano)platino (II) (SSP), poli-[(trans-1,2-diaminociclohexano)platino]-carboxiamilosa (POLY-PLAT) y 4-hidroxi-sulfonilfenilacetato (trans-1,2- diaminociclohexano) platino (II) (SAP) y similares y (vi) fármacos alquilantes de ADN tales como mostazas de nitrógeno, nitrosoureas, derivados de etilenimina, alquil sulfonatos y triacenos, incluyendo, pero sin limitación, ciclofosfamida (Cytoxan™), busulfán, improsulfán, piposulfán, pipobromán, melfalán (L-sarcolisina), clorambucilo, mecloretamina o mustina, uramustina o mostaza de uracilo, novembiquina, fenesterina, trofosfamida, ifosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), clorozotocina, fotemustina, nimustina, ranimustina, semustina (metil-CCNU), estreptozocina, tiotepa, trietilenmelamina, trietilentioposforamina, procarbazona, altretamina, dacarbazina, mitozolomida y temozolomida.

Se entiende como “agente antiinflamatorio” una sustancia química o biológica que inhibe o reduce la inflamación.

Los agentes antiinflamatorios que pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención incluyen, sin limitación, ácido 5-aminosalicílico y medicamentos que lo contienen (sulfasalazina, mesalamina, mesalazina, osalazina); ácido acetilsalicílico; corticosteroides tales como hidrocortisona, cortisona, triamcinolona, budesonida, prednisona, deflazacort, metotrexato; infliximab o adalimumab.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a conjugados que comprenden un anticuerpo monoclonal específico anti S100A7 producido por un hibridoma seleccionado del grupo de ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7 para su uso en medicina.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un conjugado que comprende un anticuerpo monoclonal específico anti S100A7 producido por un hibridoma seleccionado del grupo de ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7 para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del cáncer y/o una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un conjugado que comprende un anticuerpo monoclonal específico anti S100A7 producido por un hibridoma seleccionado del grupo de ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7 para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada con inflamación.

En una realización preferida de la invención, el tumor/cáncer para prevenir o tratar con dichos conjugados de la invención es cáncer colorrectal, preferentemente carcinoma colorrectal.

En otra realización preferida de la invención, el tumor/cáncer para prevenir o tratar con dichos conjugados de la invención es carcinoma digestivo.

En otra realización preferida de la invención, el tumor/cáncer para prevenir o tratar con dichos conjugados de la invención es fibrosarcoma.

En otra realización preferida de la invención, el tumor/cáncer para prevenir o tratar con dichos conjugados de la invención es cáncer de mama.

En otra realización preferida de la invención, el tumor/cáncer para prevenir o tratar con dichos conjugados de la invención es carcinoma epidermoide.

En otra realización preferida de la invención, el tumor/cáncer para prevenir o tratar con dichos conjugados de la invención es carcinoma genital.

En otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende un anticuerpo monoclonal específico anti S100A7 producido por un hibridoma seleccionado del grupo de ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7 para su uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer y/o una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento o prevención en un individuo que padece cáncer y/o una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada que comprende administrar a dicho sujeto un conjugado que comprende un anticuerpo monoclonal específico anti S100A7 producido por un hibridoma seleccionado del grupo de ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7.

En otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende un anticuerpo monoclonal específico anti S100A7 producido por un hibridoma seleccionado del grupo de ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada con inflamación.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento o prevención en un individuo que padece una enfermedad asociada con inflamación que comprende administrar a dicho sujeto un conjugado que comprende un anticuerpo monoclonal específico anti S100A7 producido por un hibridoma seleccionado del grupo de ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7.

Se entiende como “medicamento”, en el contexto de estos aspectos de la invención, una composición farmacéutica que comprende un conjugado de un anticuerpo monoclonal de la invención o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con un compuesto útil en el tratamiento del cáncer, una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada, o una enfermedad asociada con inflamación.

Las expresiones “prevención”, “tratamiento”, “cáncer”, “enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada” y “enfermedad asociada con inflamación” se han definido previamente en el contexto de los usos terapéuticos de la invención.

Procedimiento de diagnóstico de la invención

Ya que la proteína S100A7 se secreta al medio extracelular por las células tumorales, su presencia puede detectarse en diversos biofluidos. S100A7 también tiene un papel en la inflamación, ya que S100A7 puede secretarse y se ha mostrado que es quimiotáctica para neutrófilos y linfocitos T CD4+, proporcionando de este modo un procedimiento útil y no invasivo para el diagnóstico de enfermedades no cancerosas asociadas con una angiogénesis no deseada o enfermedades asociadas con inflamación.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención está relacionado con un procedimiento para diagnosticar cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y carcinoma genital o una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación en un sujeto que comprende:

- (a) detectar los niveles de la proteína S100A7 en un biofluido de dicho sujeto y
- (b) comparar dichos niveles con un valor de referencia

en el que los niveles aumentados de la proteína S100A7 con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y carcinoma genital, una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación.

El procedimiento para diagnosticar el cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y carcinoma genital o una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación puede llevarse a cabo *in vivo* o *in vitro*.

En el contexto de la presente invención, se entiende como “procedimiento *in vitro* para diagnosticar el cáncer” un procedimiento que permite mostrar la existencia de un tumor maligno en un sujeto por medio de detección de la presencia de la proteína S100A7 soluble en un biofluido aislado del paciente. También es útil para documentar la expresión de S100A7 producida por un tumor antes de administrar fármacos de selección de S100A7 para permitir una selección adecuada de pacientes y la determinación de la dosis óptima.

En el contexto de la presente divulgación, se entiende como “procedimiento *in vitro* para diagnosticar una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada” un procedimiento que permite mostrar la existencia de una enfermedad asociada con todas las enfermedades en las que se produce angiogénesis patógena, es decir cuando dicho proceso es perjudicial o indeseable, bien sea canceroso o no, en un sujeto por medio de la detección de la presencia de la proteína S100A7 soluble en un biofluido aislado del paciente. También es útil para documentar la expresión de S100A7 producida cuando se produce una angiogénesis no deseada antes de administrar fármacos de selección de S100A7 para permitir una selección adecuada de pacientes y la determinación de la dosis óptima.

En el contexto de la presente invención, se entiende como “procedimiento *in vitro* asociado con inflamación” un procedimiento que permite mostrar la existencia de una enfermedad inflamatoria en un sujeto por medio de detección de la presencia de la proteína S100A7 soluble en un biofluido aislado del paciente. También es útil para documentar la expresión de S100A7 producida cuando una enfermedad asociada con inflamación se produce antes de administrar fármacos de selección de S100A7 para permitir una selección adecuada de pacientes y la determinación de la dosis óptima.

Se entiende como “sujeto” de la presente invención cualquier animal clasificado como mamífero e incluye pero sin limitación animales domésticos y de granja, primates y seres humanos, por ejemplo seres humanos, primates no

humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferentemente, el sujeto es un ser humano mujer u hombre de cualquier raza o edad. En el contexto de la presente invención, el sujeto es un sujeto que potencialmente padece cáncer o al que se ha diagnosticado previamente cáncer. También se considera en el contexto de la presente invención que el sujeto es un sujeto que potencialmente padece una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación o al que se ha diagnosticado previamente cualquiera de dichas enfermedades.

La primera etapa del procedimiento de la invención comprende determinar los niveles de la proteína S100A7 o de una variante de la misma en un biofluido del sujeto del estudio.

El término "biofluido" en el contexto de la presente invención se refiere a cualquier secreción o fluido biológico, bien sea fisiológico o bien patológico, que se produce en el cuerpo de un sujeto. Dichos biofluidos incluyen, sin limitación, sangre, plasma, suero, líquido de lavado broncoalveolar, secreción nasal, secreción ótica, secreción uretral, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido ascítico, líquido pericárdico, líquido amniótico, jugo gástrico, líquido linfático, líquido intersticial, saliva, esputo, deposición líquida, lágrimas, moco, sudor, leche, semen, secreciones vaginales, líquido que viene de úlcera, ampollas, abscesos y otras erupciones superficiales. Dichas muestras pueden obtenerse por procedimientos convencionales, usando procesos conocidos en el estado de la técnica por el experto en la materia, tales como extracción de sangre, instilación y aspiración de líquido durante broncofibroscopia, punción cisternal, ventricular o lumbar, punción pleural o toracocentesis, punción percutánea de las articulaciones o sinovial, punción abdominal, amniocentesis, expectoración, punción percutánea peritoneal, punción percutánea pericárdica, etc., o por simple recogida.

En una realización preferida, el biofluido se selecciona de sangre, plasma y suero. La muestra de sangre se extrae típicamente por medio de punción de una arteria o vena, normalmente una vena de la parte interna del codo o del reverso de la mano, recogiendo la muestra de sangre en un vial hermético o una jeringa. Puede realizarse una punción capilar normalmente en el talón o en las falanges distales de los dedos para análisis por medio de un microprocedimiento.

El suero puede obtenerse de la muestra de sangre completa y en ausencia de anticoagulante dejando la muestra reposar durante 10 minutos de modo que coagule y posteriormente centrifugándola a 1.500 rpm durante 10 minutos para el fin de separar las células (precipitado) del suero (sobrenadante). A su vez, para obtener la muestra de plasma la sangre completa se pone en contacto con un anticoagulante y se centrifuga a 3.000 rpm durante 20 minutos. El precipitado de dicha centrifugación corresponde a los elementos formados y el sobrenadante corresponde al plasma.

El suero o el plasma obtenido pueden transferirse a un tubo de almacenamiento para análisis de muestras por medio del procedimiento de la invención.

Los niveles de expresión de la proteína S100A7 pueden detectarse y cuantificarse por medio de procedimientos convencionales. Dichos procedimientos incluyen, sin limitación, la detección de S100A7 midiendo su afinidad con uno de sus ligandos tales como RAGE, y la cuantificación posterior del complejo de ligando-S100A7; o por medio del uso de anticuerpos con capacidad de unión específica con la proteína S100A7 (o fragmentos de la misma que contienen los determinantes antigénicos) y la posterior cuantificación de los complejos de antígeno-anticuerpo resultantes. En una realización preferida de la invención, la detección se lleva a cabo por medio del uso de un anticuerpo que se une específicamente con la proteína S100A7 o de un fragmento de la misma con capacidad para unirse al antígeno.

Son anticuerpos que pueden usarse en estos ensayos, por ejemplo, anticuerpos policlonales del suero; sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales; anticuerpos quiméricos; anticuerpos humanizados; anticuerpos primatizados; anticuerpos humanos; anticuerpos biespecíficos; y fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y nanocuerpos. Todos los anteriores se han descrito previamente en el contexto de los usos terapéuticos de los anticuerpos anti S100A7.

Además, los anticuerpos usados en el procedimiento de la invención pueden estar o no marcados con un agente detectable. En una realización particular el anticuerpo usado se conjuga con un agente detectable.

En el contexto de la presente invención, las expresiones "agente detectable" y "marcaje" son sinónimas y se refieren a un agente cuya naturaleza permite su detección por medio de procedimientos enzimáticos, radiactivos o de fluorescencia. El compuesto detectable puede ser una enzima, un compuesto marcado con radiactividad o un isótopo radiactivo, un fluorocromo, un reactivo quimioluminiscente, un sustrato enzimático o cofactor, un inhibidor enzimático, una partícula, un colorante, etc.

Los compuestos marcados con radiactividad por medio de isótopos radiactivos, también denominados radioisótopos o radionúclidos, pueden incluir, sin limitación, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I. Los marcadores fluorescentes pueden incluir, sin limitación, rodamina, lantánidos de fósforo o FITC. Los marcadores enzimáticos pueden incluir, sin limitación, peroxidasa de rábano rústico, β-galactosidasa, luciferasa o fosfatasa alcalina. El marcaje preferido incluye, pero sin limitación, fluoresceína, una fosfatasa tal como fosfatasa alcalina, biotina, avidina, una peroxidasa tal como peroxidasa de rábano rústico y compuestos relacionados con biotina o compuestos

relacionados con avidina (por ejemplo, estreptavidina o ImmunoPure® NeutrAvidin disponible de Pierce, Rockford, IL).

5 Existe una amplia diversidad de ensayos bien conocidos que pueden usarse en la presente invención, estos ensayos usan anticuerpos no marcados primarios y anticuerpos marcados secundarios. Dichas técnicas incluyen transferencia de Western, o Western blot, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA de tipo sándwich de doble anticuerpo) o técnicas basadas en el uso de micromatrices de proteínas o microplacas biológicas que incluyen anticuerpos específicos o ensayos basados en la precipitación coloidal en formas tales como tiras reactivas. Otros medios de detección de la proteína S100A7 incluyen técnicas tales como cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc. Existen anticuerpos comerciales contra la proteína S100A7 en el mercado que pueden usarse en el contexto de los procedimientos de la presente invención.

En una realización particular, la cuantificación de los niveles de S100A7 se realiza por medio de transferencia de Western o ELISA.

15 En otra realización más particular, los niveles de la proteína S100A7 o de sus variantes se determinan por transferencia de Western. La transferencia de Western se basa en la detección de las proteínas previamente resueltas por medio de electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes y que se inmovilizan en una membrana, generalmente en nitrocelulosa, por medio de incubación con un anticuerpo específico para S100A7 y un sistema de desarrollo (por ejemplo, quimioluminiscente).

20 En otra realización preferida, el diagnóstico se realiza por medio de ELISA. Dicha técnica se basa en la detección de la proteína S100A7 en una muestra por medio de un anticuerpo anti S100A7 inmovilizado en un sustrato y la posterior detección del complejo de S100A7-anticuerpo por medio de un anticuerpo secundario. Kits comerciales para llevar a cabo el diagnóstico tales como S100A7 (kit de ELISA Circulex S100A7/Psoriasina CY8073).

25 El término "proteína" como se usa en el presente documento se refiere a una cadena molecular de aminoácidos, unida por enlaces covalentes o no covalentes. El término incluye además todas las formas de modificación química postraduccionales fisiológicamente relevantes. Las modificaciones postraduccionales que quedan dentro del alcance de la presente invención incluyen, por ejemplo, escisión de péptido señal, glucosilación, acetilación, fosforilación, isoprenilación, proteólisis, miristoilación, plegamiento de proteínas y proceso proteolítico, etc. Adicionalmente, las proteínas pueden incluir aminoácidos no naturales formados por modificaciones postraduccionales o por medio de la introducción de aminoácidos no naturales durante la traducción.

30 El término "S100A7" se ha definido en el contexto del primer aspecto inventivo de la invención. Para el procedimiento de diagnóstico de la invención, la S100A7 detectada es la que corresponde a la especie a la que pertenece el sujeto del que se ha extraído el biofluido para analizar.

35 Las variantes de la proteína S100A7 pueden ser: (i) en las que uno o más de los restos de aminoácidos están sustituidos por un resto de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un aminoácido conservado) y dicho resto de aminoácido sustituido puede estar o no codificado por el código genético, (ii) en las que hay uno o más restos de aminoácidos modificados, por ejemplo restos que están modificados por el acoplamiento de grupos de sustitución, (iii) en las que la proteína es una variante de corte y empalme alternativa de la S100A7 y/o (iv) fragmentos de la proteína. Los fragmentos incluyen proteínas generadas mediante un procedimiento proteolítico (incluyendo proteólisis en múltiples sitios) de una secuencia original

40 Las variantes incluyen secuencias de aminoácidos que son al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 96 % similares o idénticas a la secuencia de aminoácidos original. Como se conoce, la "similitud" entre dos proteínas se determina por medio de la comparación de la secuencia de aminoácidos de una proteína con una secuencia de una segunda proteína. El grado de identidad entre dos proteínas se determina usando algoritmos informáticos y procedimientos que conocen ampliamente los expertos en la materia, preferentemente usando el algoritmo BLASTP [BLASTManual, Altschul, S., y col., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

En una realización particular, la variante es una variante de mamífero, preferentemente una variante humana, más preferentemente con al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 96 % de similitud o identidad con la secuencia de aminoácidos original.

50 El experto en la materia apreciará que el procedimiento de la invención puede ponerse en práctica usando tanto el nivel absoluto como el nivel relativo de expresión de la proteína S100A7. Por lo tanto, en la presente invención, la expresión "niveles de la proteína S100A7" se usa para hacer referencia tanto a los niveles absolutos como a los niveles relativos de dicha proteína.

55 La expresión "niveles absolutos" se refiere a la cantidad total de la proteína de interés en una muestra. Dicho valor puede proporcionarse como la concentración de proteína expresada en unidades de masa por unidad de volumen (por ejemplo en ng/ml de muestra), en el número de moléculas proteicas por unidad de volumen (por ejemplo en pmol de proteína/ml de muestra), en las unidades de masa de proteína S100A7 por unidad de masa de proteína total

(pg de S100A7/mg de proteína total) o en el número de moléculas de S100A7 por unidad de masa de proteína total (por ejemplo en pmol de S100A7/mg de proteína total).

5 La expresión “niveles relativos” se refiere a la relación entre los niveles de expresión de la proteína S100A7 objeto del estudio y de una proteína de referencia, es decir, se define la concentración de proteína S100A7 en forma normalizada con respecto a dicha proteína de referencia.

10 Para normalizar los valores de proteína entre las diferentes muestras, es posible comparar los niveles de proteína S100A7 en las muestras para analizar con la expresión de una proteína de control. Se entiende como “proteína de control” en la presente invención una proteína cuyos niveles de expresión no cambian o solamente cambian en cantidades limitadas en las células tumorales con respecto a las células no tumorales. Preferentemente, la proteína de control es una proteína codificada por genes que se expresan de forma constitutiva que son los genes siempre activos o que se transcriben constantemente, de modo que estas proteínas se expresan constitutivamente y llevan a cabo funciones celulares esenciales. Las proteínas de control preferidas que pueden usarse en la presente invención incluyen, sin limitación, β -2-microglobulina (B2M), ubiquitina, proteína ribosómica 18S, ciclofilina, GAPDH, PSMB4, tubulina y actina. En una realización más preferida, la proteína de control es tubulina.

15 El experto en la materia entiende que las mutaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína S100A7 no afectan a la detección de la expresión de la misma y, por lo tanto, las variantes de esta proteína generadas por mutaciones de la secuencia de aminoácidos quedan dentro del alcance de la presente invención.

Una vez que se ha determinado el nivel de expresión de S100A7 en una muestra, tiene lugar la etapa (b) de la invención que consiste en comparar los niveles de S100A7 obtenidos en la etapa (a) con un valor de referencia.

20 El “valor de referencia” deriva de una colección de muestras formada preferentemente por una mezcla del biofluido para analizar de individuos normales no afectados por cáncer, una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación. Dicho valor de referencia puede determinarse por medio de técnicas bien conocidas en el estado de la materia, por ejemplo, determinando la media de los niveles de proteína S100A7 medidos en biofluidos tomados de sujetos sanos. El valor de referencia también puede obtenerse de las proteínas expresadas de forma constitutiva tomadas del mismo sujeto para analizar.

25 Una vez que se ha establecido el valor de referencia, el valor de los niveles de S100A7 obtenidos en la etapa (a) puede compararse con este valor de referencia y, por lo tanto, permite detectar alteraciones en los niveles de proteína S100A7 del sujeto con respecto al valor de referencia. Más específicamente, en el procedimiento, un aumento de los niveles de S100A7 con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece cáncer o una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación.

30 En el contexto de la presente invención, se entiende como “niveles aumentados” con respecto al valor de referencia una variación de los niveles de S100A7 por encima del valor de referencia de al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más veces en comparación con el valor de referencia.

35 En una realización particular, el procedimiento es adecuado para diagnosticar carcinoma digestivo. En una realización particular, el procedimiento es adecuado para diagnosticar carcinoma colorrectal. En otra realización particular, el procedimiento es adecuado para diagnosticar carcinoma genital. En otra realización particular, el procedimiento es adecuado para diagnosticar carcinoma epidermoide.

40 En otra realización, una vez que se ha realizado dicha comparación, el procedimiento de la invención permite diagnosticar si el sujeto padece una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada.

En otra realización, una vez que se ha realizado dicha comparación, el procedimiento de la invención permite diagnosticar si el sujeto padece una enfermedad asociada con inflamación.

Procedimiento de pronóstico de la invención

45 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para determinar el pronóstico o supervisar la progresión del cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital o una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación en un sujeto que comprende:

- a) detectar los niveles de la proteína S100A7 en un biofluido de dicho sujeto, y
- b) comparar dichos niveles con un valor de referencia para dicha proteína obtenida del mismo sujeto en un punto temporal anterior de la enfermedad,

50 en el que los niveles reducidos de la proteína S100A7 con respecto al valor de referencia son indicativos de que el carcinoma digestivo o genital o una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación muestra un buen pronóstico o en el que los niveles aumentados de la proteína S100A7 con respecto al valor de referencia son indicativos de que el carcinoma digestivo o genital o una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una

enfermedad asociada con inflamación muestra un mal pronóstico.

En una realización preferida, el carcinoma digestivo es un carcinoma colorrectal.

Como se usa en la presente invención, la expresión “supervisar la progresión del cáncer”, que es equivalente a “determinar el pronóstico”, se refiere a la determinación de uno o varios parámetros que indican la progresión de la enfermedad en un paciente al que se ha diagnosticado cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital. Los parámetros adecuados para determinar la evolución de un sujeto al que se ha diagnosticado carcinoma digestivo o genital se seleccionan del grupo de riesgo de recaída, supervivencia sin enfermedad y/o supervivencia general del sujeto. Como se usa en el presente documento, la expresión “riesgo de recaída” se entiende como la probabilidad de que un sujeto desarrolle carcinoma digestivo o genital y/o una metástasis secundaria de nuevo después de un periodo sin enfermedad; se entiende como “supervivencia sin enfermedad” el periodo de tiempo después del tratamiento en el que no se encuentra el cáncer; y se entiende como “supervivencia general del sujeto” el porcentaje de sujetos que sobreviven, desde el momento del diagnóstico o tratamiento, después de un periodo de tiempo definido.

La expresión “supervisar la progresión de una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada”, que es equivalente a “determinar el pronóstico”, se refiere a la determinación de uno o varios parámetros que indican la progresión de la enfermedad en un paciente al que se ha diagnosticado una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada. Los parámetros adecuados para determinar la evolución de un sujeto al que se ha diagnosticado una enfermedad asociada con angiogénesis no deseada se seleccionan del grupo de riesgo de recaída, supervivencia sin enfermedad y/o supervivencia general del sujeto. Como se usa en el presente documento, la expresión “riesgo de recaída” se entiende como la probabilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada de nuevo después de un periodo sin enfermedad; se entiende como “supervivencia sin enfermedad” el periodo de tiempo después del tratamiento en el que la enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada no se encuentra; y se entiende como “supervivencia general del sujeto” el porcentaje de sujetos que sobreviven, desde el momento del diagnóstico o tratamiento, después de un periodo de tiempo definido.

La expresión “supervisar la progresión de una enfermedad asociada con inflamación”, que es equivalente a “determinar el pronóstico”, se refiere a la determinación de uno o varios parámetros que indican la progresión de una enfermedad en un paciente al que se ha diagnosticado una enfermedad asociada con inflamación. Los parámetros adecuados para determinar la evolución de un sujeto al que se ha diagnosticado una enfermedad asociada con inflamación se seleccionan del grupo de riesgo de recaída, supervivencia sin enfermedad y/o supervivencia general del sujeto. Como se usa en el presente documento, la expresión “riesgo de recaída” se entiende como la probabilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad asociada con inflamación de nuevo después de un periodo sin enfermedad; se entiende como “supervivencia sin enfermedad” el periodo de tiempo después del tratamiento en el que la enfermedad asociada con inflamación no se encuentra; y se entiende como “supervivencia general del sujeto” el porcentaje de sujetos que sobreviven, desde el momento del diagnóstico o tratamiento, después de un periodo de tiempo definido.

De acuerdo con este aspecto inventivo, los niveles de la proteína S100A7 determinados en un biofluido de un sujeto que tiene cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital, una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación obtenida en un primer periodo de tiempo (primera muestra de sujeto) y los niveles de la proteína S100A7 determinados en un biofluido de un sujeto que tiene cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital, una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación obtenidos en un segundo periodo de tiempo (segunda muestra de sujeto) se comparan permitiendo supervisar la progresión del cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital, una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación en dicho sujeto que tenga cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital, una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación. La segunda muestra de sujeto puede tomarse del mismo sujeto que tiene cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital o una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación del que se obtiene la primera medida, en un segundo periodo de tiempo, es decir, en cualquier momento después del primer periodo de tiempo, por ejemplo, un día, una semana, un mes, dos meses, tres meses, un año, dos años o más después de la primera muestra de sujeto. En una realización particular, la primera muestra de sujeto se toma antes de que el sujeto reciba tratamiento, por ejemplo, quimioterapia, radioterapia o cirugía, y la segunda muestra de sujeto se toma después del tratamiento. En otra realización particular, la primera muestra de sujeto se toma después de que el sujeto haya iniciado/recibido el tratamiento, por ejemplo quimioterapia, radioterapia, o cirugía, y la segunda muestra de sujeto se toma más tarde, en periodos de tiempo diferentes durante un ciclo de tratamiento. Estos procedimientos permiten la evaluación de la progresión del cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital, una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación en un sujeto seleccionado al que se ha diagnosticado previamente que padece cualquiera de dichas enfermedades. En consecuencia, si el cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital, la enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o la enfermedad asociada con inflamación tiene un mal pronóstico, debería designarse una terapia adicional para tratar dicha enfermedad en dicho sujeto. La progresión del cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital o la enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis

no deseada o la enfermedad asociada con inflamación después de dicho nuevo tratamiento puede seguirse fácilmente de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

5 Como se ha mencionado previamente con respecto al procedimiento de diagnóstico de la invención, los niveles de la proteína S100A7 pueden determinarse por cualquier medio adecuado conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, transferencia de western o ELISA.

10 Una vez que los niveles de expresión de la proteína S100A7 en las muestras de sujetos, en diferentes periodos de tiempo (primera y segunda muestras de sujeto) se han determinado, es necesario identificar si hay un aumento significativo de la expresión de dicha proteína en la segunda muestra del sujeto en comparación con el nivel de expresión de dicha proteína en la primera muestra del sujeto. Como alternativa, si se desea, se puede analizar si hay una reducción significativa de la expresión de dicha proteína en la segunda muestra del sujeto en comparación con el nivel de expresión de dicha proteína en la primera muestra de sujeto. Las expresiones “niveles aumentados” y “niveles reducidos” aplicados al nivel de expresión de proteína S100A7 se han definido previamente.

15 Por lo tanto, un nivel aumento significativamente de la proteína S100A7 en la segunda muestra del sujeto con respecto al nivel de expresión de dicha proteína en la primera muestra del sujeto es indicativa de que el cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital, una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación en el sujeto que se estudia está en progresión (es decir, tiene un mal pronóstico); por lo tanto, la terapia administrada al sujeto que se estudia debería cambiarse y debería diseñarse una nueva terapia para tratar el cáncer seleccionado del carcinoma digestivo y genital, una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación en dicho sujeto.
20 La progresión del cáncer seleccionado del carcinoma digestivo y genital o una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación en el sujeto puede seguirse fácilmente de acuerdo con este procedimiento.

25 Por el contrario, si no se consiguen niveles significativamente aumentados de la proteína S100A7 de proteína en la segunda muestra del sujeto con respecto al nivel de expresión de dicha proteína en la primera muestra del sujeto, o incluso, si se consigue una reducción significativa en el nivel de expresión de la proteína S100A7 en la segunda muestra del sujeto con respecto al nivel de expresión de dicha proteína en la primera muestra del sujeto, entonces el cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital, una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación en el sujeto que se estudia no está en progresión (es decir, no tiene un mal pronóstico).

30 La expresión “sujeto”, “muestra”, “biofluido”, “enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada”, “enfermedad asociada con inflamación” y su realización preferida, “carcinoma digestivo”, “carcinoma colorrectal” y “carcinoma genital”, se han definido previamente en el contexto del procedimiento de diagnóstico de la invención y se aplican igualmente al aspecto inventivo de la presente invención.

Kits de la invención y usos de los mismos

35 En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para diagnosticar cáncer o una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación en una muestra que comprende al menos un anticuerpo de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, es decir, un anticuerpo monoclonal específico anti S100A7 producido por un hibridoma seleccionado del grupo de ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7. En una realización particular, el cáncer es un cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y carcinoma genital. En una realización más preferida el carcinoma digestivo es carcinoma colorrectal.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un kit como se ha definido previamente para diagnosticar una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada en una muestra de un sujeto.

45 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un kit como se ha definido previamente para diagnosticar una enfermedad asociada con inflamación en una muestra de un sujeto.

50 El término “kit”, como se usa en el presente documento, se refiere a una combinación de un conjunto de reactivos adecuados para detectar los niveles de S100A7 junto con uno o más tipos de elementos o componentes (por ejemplo, otros tipos de reactivos bioquímicos, recipientes, envases adecuados para su venta comercial, sustratos con los que se unen los reactivos, componentes de hardware electrónico, etc.).

55 En la presente invención, se entiende como “reactivo adecuado para detectar los niveles de S100A7” un anticuerpo monoclonal específico anti S100A7 producido por un hibridoma seleccionado del grupo de ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7 y, opcionalmente, reactivos para detectar una o más proteínas constitutivas.

Como entenderán los expertos en la materia, los anticuerpos del kit de la invención pueden usarse en todas las

técnicas para determinar los niveles de proteína que se sabe que son adecuados para el análisis de un biofluido, tal como transferencia de Western o Western blot, ELISA, RIA, EIA competitivo, DAS-ELISA, técnicas inmunocitoquímicas o inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el uso de microplacas biológicas, micromatrices de proteínas, ensayos de precipitación coloidal en tiras reactivas, etc.

- 5 Los anticuerpos pueden fijarse a un soporte sólido tal como una membrana, un plástico o un vidrio, opcionalmente tratado para facilitar la fijación de dichos anticuerpos al soporte. Dicho soporte sólido comprende, al menos, un conjunto de anticuerpos que reconocen específicamente la proteína S100A7, y que pueden usarse para detectar los niveles de expresión de dicha proteína.

- 10 Los kits de la invención comprenden adicionalmente reactivos para detectar una proteína codificada por un gen constitutivo. La disponibilidad de dichos reactivos adicionales permite normalizar las mediciones realizadas en diferentes muestras (por ejemplo, la muestra para analizar y la muestra de control) para descartar que las diferencias en la expresión de los biomarcadores se deban a una cantidad diferente de proteína total en la muestra más que a las diferencias reales en los niveles relativos de expresión. Los genes constitutivos en la presente invención son genes que están siempre activos o que se transcriben constantemente y que codifican proteínas que se expresan de forma constitutiva y llevan a cabo funciones celulares esenciales. Las proteínas que se expresan de forma constitutiva y pueden usarse en la presente invención incluyen, sin limitación, β -2-microglobulina (B2M), ubiquitina, proteína ribosómica 18S, ciclofilina, GAPDH, PSMB4, tubulina y actina.
- 15

Todas las realizaciones particulares del procedimiento de la presente invención son aplicables a los kits de la invención y a sus usos.

20 Otros aspectos de los anticuerpos monoclonales de la invención

- Los anticuerpos monoclonales del segundo aspecto de la invención producidos por un hibridoma seleccionado del grupo de ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7 también pueden ser útiles para detectar S100A7 en muestras biológicas de otro tipo diferente de un biofluido. Dichos procedimientos de detección se aplican provechosamente para el diagnóstico y/o pronóstico de cáncer cuyas células tumorales expresan la proteína S100A7.
- 25

- Estos anticuerpos monoclonales pueden usarse para identificar células y tejidos que expresan la proteína S100A7 por medio de técnicas convencionales tales como inmunofluorescencia, citometría de flujo, cromatografía de afinidad, técnicas inmunocitoquímicas o inmunohistoquímicas o inmunoprecipitación. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de la invención puede facilitar la identificación de una célula tumoral que expresa una proteína S100A7 y permite diagnosticar cáncer en un sujeto.
- 30

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para diagnosticar cáncer o una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación en un sujeto que comprende:

- 35 (a) detectar los niveles de la proteína S100A7 no cancerosos en una célula o tejido de dicho sujeto por medio de un anticuerpo monoclonal específico anti S100A7 producido por un hibridoma seleccionado del grupo de ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7.
- 40 (b) comparar dichos niveles con un valor de referencia

- en el que los niveles aumentados de la proteína S100A7 con respecto al valor de referencia son indicativos de que el sujeto padece cáncer o una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación. La expresión "procedimiento *in vitro*" implica que dicho procedimiento se lleva a cabo en una muestra biológica aislada del sujeto del que se ha tomado. Dicha muestra biológica puede ser una célula, tal como una célula sanguínea, una célula epitelial, una célula germinal, etc., o también una muestra de biopsia de un tejido.
- 45

- En una realización preferida, el diagnóstico se realiza por medio de técnicas inmunohistoquímicas. Dichas técnicas se basan en la detección de la proteína S100A7 en una célula o tejido por medio de detección de un anticuerpo anti S100A7 conjugado con una enzima, dicha peroxidasa que puede catalizar una reacción productora de color. Como alternativa, el anticuerpo también puede marcarse con un fluoróforo, tal como fluoresceína o rodamina entre otros bien conocidos en la técnica.
- 50

La detección puede facilitarse por medio del acoplamiento (es decir, unión física) del anticuerpo con un grupo de marcaje.

Dado que los anticuerpos monoclonales de la invención reconocen la proteína S100A7, estos pueden usarse para purificar dicha proteína de una muestra.

- 55 Preferentemente, para su uso en la purificación de S100A7, los anticuerpos monoclonales del segundo aspecto de la

invención se usan asociándolos con un soporte o sustrato. En principio, puede usarse cualquier tipo de soporte en los procedimientos de la invención, aunque es preferible el uso de soportes de tipo polimérico tales como Sephadex, dextrano, poliaminoácidos solubles en agua, polietilenglicol (PEG), ácido poliglútamico (PGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), poli(D,L-lactida-co-glicólido) (PLA/PLGA), poli(hidroxialquilmetacrilamida), un poliglicerol, una poliamidoamina (PAMAM) y una polietilenimina (PEI).

Típicamente, la purificación de S100A7 usando los anticuerpos monoclonales del segundo aspecto de la invención se lleva a cabo por medio de un procedimiento que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto la muestra de la que se va a purificar la proteína S100A7 con un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado del grupo de ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7 inmovilizada en un soporte en condiciones adecuadas para que tenga lugar la unión entre el anticuerpo y la proteína S100A7;
- (ii) lavar los complejos formados en la etapa (i) para retirar todos los compuestos de la muestra que no se unan de forma específica al conjugado de un soporte-anticuerpo y
- (iii) eluir la proteína S100A7 que está unida al compuesto.

El procedimiento para purificar la proteína S100A7 de la invención puede llevarse a cabo usando cualquier procedimiento de purificación de proteínas conocido por medio de afinidad, incluyendo, por ejemplo, columnas de cromatografía de afinidad cuya fase estacionaria se forma por los anticuerpos monoclonales de acuerdo con el segundo aspecto de la invención conjugados con un soporte sólido.

La invención se describe posteriormente por medio de los siguientes ejemplos que deben considerarse como únicamente ilustrativos y en ningún caso limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Cultivo celular y líneas celulares

Se cultivaron las líneas celulares adenocarcinoma de colon humano HCT-116 (ATCC, n.º: CCL-247), fibrosarcoma humano HT1080 (ECACC, n.º 85111505), adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 (ECACC n.º: 92020424) y carcinoma genital humano A431 (ECACC, n.º 85090304) en DMEM alto en glucosa (PAA) complementado con FCS 10 % (Invitrogen) más L-glutamina 2 mM. Se cultivaron células de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-468 (ATCC, n.º HTB-132) y células monocíticas humanas THP-1 (ATCC, n.º: TIB-202) en RPMI 1640 (PAA) complementado con FCS 10 % (Invitrogen) más L-glutamina 2 mM. Se cultivaron células endoteliales de la vena umbilical humana, HUVEC, (Lonza) en medio EBM-2 (Lonza) complementado con factores de crecimiento y FCS como se proporciona en el EGM-2 bulletkit (Lonza).

Se cultivaron células de mieloma de ratón en RPMI 1640 (PAA) complementado con FCS 10 % (PAA; origen australiano) más GlutaMAX™-I 2 mM (Invitrogen).

Todas las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada, y estuvieron uniformemente libres de micoplasmas como se evaluó por el kit de ensayo de micoplasma EZ-PCR (Biological Industries).

Ejemplo 2: Preparación de la proteína S100A7 recombinante humana

Se obtuvo un fragmento que codificaba la S100A7 humana de longitud completa por RT-PCR a partir de ARNm de la línea celular de adenocarcinoma de mama MDA-MB-468, derivada de adenocarcinoma de mama humano. Los cebadores específicos usados en la PCR fueron:

SEQ ID NO: 2 5'-ACTCACATATGAGCAACACTCAAGCTGAGAGGTCCATAATAG-3' y
SEQ ID NO: 3 5'-ACTCATGAGCTCATCTGGCTGCCCCCGGAACAGGGCGCTGC-3'

Se clonó ADNc de S100A7 en el sitio *Ndel* del vector de expresión bacteriana pET28a(+) (Novagen) y se seleccionaron clones positivos y se confirmaron por secuenciación de ADN. Esta construcción se transformó en células Competentes Tuner™ *E. coli* (DE3) (Novagen), y la proteína se indujo con isopropil-D-tiogalactopiranosido 1 mM (IPTG; Sigma) durante 6 h. Después, las bacterias se recogieron y se lisaron por ultrasonidos en tampón A (lisozima 100 µg/ml, NaCl 0,5 M, Na₂HPO₄·2H₂O 10 mM NaH₂PO₄·2H₂O 10 mM e imidazol 10 mM pH 7,5). El lisado se clarificó por centrifugación y se filtró a través de una columna de afinidad Quelante HiTrap™ (Amersham). La proteína se eluyó con tampón B (NaCl 0,5 M, Na₂HPO₄·2H₂O 10 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 10 mM e imidazol 300 mM pH 7,5). En algunos experimentos el marcador de histidina se escindió usando trombina proteasa (Novagen, la secuencia de reconocimiento es Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4) sitio de escisión entre Arg y Gly). Por lo tanto, la proteína S100A7 recombinante de longitud completa final tiene un Gly-Ser-His adicional en el extremo N-terminal. Después de la digestión la cadena de poli his restante se retiró por columna de afinidad quelante HiTrap™ (Amersham) usando el marcador de secuencia de polihistidina y se comprobó la pureza del sobrenadante que contenía la proteína S100A7 recombinante mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) SDS-12 % (p/v).

Ejemplo 3: Obtención de los anticuerpos monoclonales anti S100A7

Se realizó fusión de anticuerpo monoclonal (mAb), exploración por ELISA y subclonación usando tecnologías convencionales. Se realizó el mantenimiento, la expansión y el aumento de escala de cultivos en una atmósfera humidificada (94 % de aire y 6 % de CO₂) a 37 °C.

5 Para cada anticuerpo monoclonal, se inmunizaron cuatro animales con S100A7 recombinante humana de acuerdo con el siguiente protocolo. Se usaron 50 µg de proteína S100A7 diluida en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,8 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM; pH 7,2) como una emulsión con adyuvante completo de Freund (Sigma) para la inmunización subcutánea (s.c.) inicial y con Adyuvante Incompleto de Freund (Sigma) para inyecciones posteriores los días 13 y 28 (s.c.). Diez días después de la tercera inyección, los sueros se obtuvieron y se ensayaron. El día 51 se proporcionó un refuerzo final de 25 µg de proteína S100A7 diluida en PBS por vía intravenosa al ratón con el mayor título de suero.

15 La fusión se realizó cuatro días después de la última inyección. Los mAb obtenidos se obtuvieron de una fusión de células de mieloma con células del bazo del ratón seleccionado a una relación 1/10, respectivamente usando PEG-1500 (Roche Diagnostics) como inductor de fusión. Después de esto, las células se sembraron en placas de 96 micropocillos en medio que contenía HAT (Invitrogen) para selección de híbridos.

20 Se exploraron los sobrenadantes de hibridoma con respecto a reactividad con S100A7 humana recombinante mediante ELISA. Se recubrieron placas de 96 micropocillos MaxiSorp (NUNC) con 50 µl de proteína S100A7 (3 µg/ml en PBS) durante una noche a 4 °C. Después de lavar con PBS y bloquear (leche desnatada 1 % en PBS; 1 h, 37 °C), se añadieron 50 µl de sobrenadantes de hibridoma a cada pocillo y se incubaron durante 2 h a 37 °C. Después de lavar, a temperatura ambiente, cinco veces con PBS-HT sin calcio-magnesio (NaCl 274 mM, KCl 2,8 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Tween-20 0,1 %; pH 7,2), se detectaron inmunoglobulinas unidas con IgM de cabra anti IgG de ratón conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) usando tetrametilbencidina 3,3,5,5 (TBM, Sigma) como sustrato.

25 Los pocillos con una densidad óptica mayor de tres veces el fondo de la placa se eligieron para clonación. Se seleccionaron clones correspondientes al anticuerpo monoclonal 2D9 (código interno 2D9-1C4-3D7-5E6, ECACC 13020701), 2H3 (código interno 2H3-1A12-5E12-1A4, ECACC 13020702), 6E3 (código interno 6E3-2D5-1F9-5B4; ECACC 13020703), 6F5 (código interno 6F5-2F8-2G9-1A2; ECACC 13020704), 8B6 (código interno 8B6-1A9-5A8-8G2; ECACC 13020705) y 9F3 (código interno 9F3-3E6-2D7-3B3; ECACC 13020706) para análisis *in vitro* e *in vivo* y se subclonaron por dilución limitante. Solamente los subclones que crecían a 0,1 y 0,01 células por pocillo se consideraron adecuados para expansión y se adaptaron a medio DMEM/F12 (PAA) y se congelaron.

35 Para purificación a gran escala, las células de hibridoma se cultivaron en DMEM/F12 que contenía 10 % de suero bovino fetal (PAA, origen australiano) y L-glutamina 2 mM (GlutaMAX™-I, Invitrogen) en un matraz de cultivo de 175 cm². Cuando la concentración celular alcanzó 0,8 x 10⁶ células/ml (viabilidad sobre 85 %) el medio de cultivo se retiró y las células se lavaron dos veces con medio DMEM/F12 sin suero. Después, se añadieron 50 ml de un medio que contenía DMEM/F12 80 %, CDHibridoma 20 % (Invitrogen) y L-glutamina 2 mM a cada matraz y se incubaron durante 96 h. Al final, se recogió medio sin suero, se centrifugó y se congeló hasta su purificación.

40 Se obtuvieron seis litros de sobrenadante sin suero del hibridoma. Después de la filtración, se realizó purificación usando una columna de afinidad de Proteína G HP HiTrap de 5 ml (Amersham). El anticuerpo eluido se concentró y se diafiltró en PBS con dispositivos de filtro de centrifuga Ultra-15 Amicon® con membranas Ultracel® de unión baja (30000 LPMN, Millipore). Los anticuerpos acondicionados finales se cuantificaron a 280 nm.

Ejemplo 4: Caracterización de la reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales anti S100A7: los anticuerpos monoclonales 2D9, 2H3, 6E6, 6F5, 8B6 y 9F3 solamente reaccionan con S100A7 humana

45 Se exploraron los anticuerpos monoclonales 2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3 con respecto a reacción cruzada contra otros miembros de la familia S100: S100A4 y S100P humana recombinante (clonada a partir de la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HCT-116 y de la línea celular de adenocarcinoma del cuello uterino humano HeLa, respectivamente, en Leitnat Biomed Division). El isotipo de inmunoglobulina para anticuerpos monoclonales contra S100A7 se determinó usando el kit de subtipificación de inmunoglobulina de ratón (Southern Biotech).

La exploración de anticuerpos por ELISA en S100A7 humana purificada, S100A4 humana y S100P humana reveló que el anticuerpo monoclonal 2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3 solamente reconocía la S100A7 humana (Tabla 1).

50

Tabla 1: especificidad de 2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3 analizada por ELISA.

Anticuerpo	Inmunógeno	Isotipo	S100A7 Humana	S100A4 Humana	S100P Humana
2D9	S100A7 Humana	IgG1	++++	-	-
2H3	S100A7 Humana	IgG1	++++	-	-
6E3	S100A7 Humana	IgG1	++++	-	-
6F5	S100A7 Humana	IgG1	++++	-	-
8B6	S100A7 Humana	IgG1	++++	-	-
9F3	S100A7 Humana	IgG1	++++	-	-
++++ reacción positiva, - sin reacción					

Ejemplo 5: Caracterización de los anticuerpos monoclonales por transferencia de Western

5 Las muestras celulares y tumorales se aclararon dos veces con PBS y se lisaron inmediatamente con tampón de lisis celular helado (NaCl 150 mM, IGEPAL CA630 1 %, EDTA 5 mM, PMSF 100 µg/ml, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 1 mM y Tris 50 mM pH 7,4). Los lisados se clarificaron por centrifugación y la concentración de proteína se cuantificó con el reactivo de Bradford (Bio-Rad). Los extractos totales (50 µg) se resolvieron en una electroforesis de gel de poliacrilamida-SDS 15 % (PAGE) en condiciones reducidas y se transfirieron a membranas de PVDF BioTrace™ (PALL corporation). Las membranas se bloquearon durante 1 h en TBS más Tween-20 0,1 % con leche en polvo desnatada al 5 %, se incubaron durante una noche con el anticuerpo primario relevante y después con los anticuerpos secundarios durante 1 h en tampón de bloqueo, lavando tres veces durante 10 min en TBS más Tween-20 0,1 % después de cada incubación. Las señales se desarrollaron usando los Reactivos de Detección de Transferencia de Western ECL™ (Amersham) y se expusieron a Hyperfilm™ ECL (Amersham).

15 Las concentraciones de los anticuerpos fueron las siguientes: anticuerpo monoclonal de ratón anti S100A7 humana (Leitat Biomed Division) a 3 µg/ml; anticuerpo policlonal de conejo anti tubulina (ICN Biomedicals) a dilución 1:5000; anticuerpo de cabra anti ratón (Jackson ImmunoResearch) a 0,04 µg/ml y anticuerpo de cabra anti conejo (Sigma) a dilución 1:25000, como anticuerpos secundarios.

20 La Figura 1 muestra el patrón de expresión de proteína S100A7 analizado por transferencia de Western en varias líneas celulares tumorales usando el anticuerpo monoclonal 9F3 como un anticuerpo primario. Línea celular de carcinoma colorrectal humano HT29 (Carril 1), línea celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-468 (Carril 2) y células de adenocarcinoma de mama humano MCF7 (Carril 3). La proteína recombinante S100A7 se usó como un control positivo (Carril 4).

Los mismos resultados obtenidos con 9F3 también podrían ser extensibles para los otros anticuerpos monoclonales de la presente invención (datos no mostrados).

25 Ejemplo 6: caracterización de mAb 2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3 por inmunohistoquímica

La tinción de inmunohistoquímica (IHC) se usa ampliamente en el diagnóstico de células anómalas tales como las halladas en tumores cancerosos. Se ha descubierto que la detección de S100A7 por IHC en algunos tumores se correlaciona con un mal pronóstico (Tripathi y col. PLoS One. 3 ago 2010; 5(8): e11939).

30 Se desparafinizaron secciones de cuatro micrómetros de grosor de los bloques tumorales de carcinoma genital humano A431 y adenocarcinoma de colon humano HT29, se rehidrataron en alcoholes de graduación y se procesaron. Brevemente, se realizó recuperación de antígenos en un horno microondas durante 15 min en citrato sódico 10 mM pH 6,0 con Tween-20 0,05 %. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con una solución de H₂O₂ 3 % en agua destilada y los portaobjetos se incubaron en suero de cabra normal al 5 % durante 30 min para evitar la tinción no específica. Después se incubaron durante una noche a 4 °C con los anticuerpos primarios diluidos apropiadamente. Se usaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal de ratón 2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 o 9F3 (2 µg/ml). A continuación las secciones se incubaron con el IgG de cabra anti ratón biotinilado de forma apropiada (H+L) (Vector Laboratories) a 2 µg/ml durante 60 min y complejo ABC (Dako) durante 30 min a temperatura ambiente. Se usó NovaRed (Dako) como cromógeno. Se realizó control negativo usando un anticuerpo monoclonal no relacionado (anti polihistidina) en lugar del anticuerpo primario.

40 La Figura 2 muestra el análisis inmunohistoquímico de muestras tumorales derivadas de carcinoma genital A431 y modelo de adenocarcinoma de colon humano HT29 usando el anticuerpo monoclonal anti S100A7 8B6. S100A7 se expresa en gran medida en el centro del tumor.

Se observó la misma sensibilidad y especificidad para los otros anticuerpos de la invención (datos no mostrados).

Ejemplo 7: Cuantificación de los niveles en plasma de S100A7 en el modelo de tumor de xenoinjerto subcutáneo A431

5 Existe la necesidad de detección temprana de tumores y metástasis, proceso crítico para mejorar el tratamiento en pacientes con cáncer. La detección de biomarcadores moleculares usando ensayos sencillos no invasivos como procedimientos de cuantificación basados en sangre es una de las necesidades clínicas principales para detectar la presencia de un tumor, y supervisar la terapia de cáncer.

10 Los niveles en plasma de S100A7 se cuantificaron mediante el procedimiento de ELISA de tipo sándwich. Brevemente, se revistieron 96 placas de microtitulación (Maxisorb, NUNC) con anticuerpo monoclonal 9F3 10 µg/ml diluido en PBS (50 µl/pocillo) durante 24 h a 4 °C. Después de retirar el revestimiento, las placas se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante 2 h a 37 °C en tampón de bloqueo (PBS que contenía leche desnatada al 1 %).

15 Se aplicaron muestras de plasma diluidas 1:2 en tampón de dilución (PBS-leche desnatada 1 %) a los pocillos (50 µl/pocillo) y se incubaron durante 2 h a 37 °C. Las placas se lavaron seis veces con tampón de lavado (PBS-Tween-20 0,1 %) y se aplicó anticuerpo 2D9 biotinilado anti S100A7 a 10 µg/ml en tampón de bloqueo a los pocillos (50 µl/pocillo) y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente.

20 Las placas se lavaron seis veces con tampón de lavado y se añadió anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Jackson) a la dilución apropiada a cada pocillo (50 µl/pocillo) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar seis veces con tampón de lavado, el ELISA se reveló añadiendo 50 µl de sustrato de tetrametilbenzidina (Sigma) y se incubó durante 10 minutos a TA antes de detener con HCl 1 M (50 µl/pocillo). La absorbancia se leyó a 450 nm.

Se obtuvo una curva patrón por diluciones en serie de S100A7 recombinante humana en tampón de bloqueo con suero bovino fetal (1:1, v/v).

25 La Figura 3 muestra la cuantificación de los niveles en plasma de S100A7 en animales que portan tumor subcutáneo (media de los volúmenes tumorales entre 50 y 1000 mm³ aproximadamente) de la línea celular A431. También se analizaron plasmas de animales sin tumor. La Figura 3A muestra una correlación entre el volumen tumoral y los niveles de S100A7, que son mayores en los tumores mayores. En animales sin tumor no se detectó S100A7 (Figura 3B).

30 La Figura 3B muestra los niveles en plasma de S100A7 de animales sin tumor, animales que portan tumores de entre 800 y 1000 mm³ y de animales 4 días después de la resección tumoral. Los niveles en plasma se analizaron por ELISA.

Tomados juntos todos estos resultados, se confirma que los anticuerpos monoclonales ensayados pueden usarse como una herramienta en el diagnóstico, pronóstico y análisis de supervisión de la enfermedad.

35 **Ejemplo 8: S100A7 induce la fosforilación de ERK y los anticuerpos monoclonales anti S100A7 bloquean esta actividad**

Se determinó si S100A7 es un activador de la ruta de MAPK en células de adenocarcinoma de mama y si los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención pueden bloquear esta actividad.

40 Se sembraron células de adenocarcinoma de mama humano, MDA-MB-231, en placas de 24 pocillos a una densidad de 150.000 células/pocillo y se cultivaron durante 24 h. Después, se añadió S100A7 3 µM al cultivo. Para ensayos de bloqueo, se preincubó S100A7 con anticuerpos monoclonales (3 µM) 4 h antes de la adición a las células. Después de 60 min de estimulación, las células se lavaron con PBS y después se lisaron con tampón de lisis celular helado (NaCl 150 mM, IGEPAL CA630 1 %, EDTA 5 mM, PMSF 100 µg/ml, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 1 mM y Tris-HCL 50 mM, pH 7,4). Los lisados se clarificaron por centrifugación. Los extractos totales para todos los análisis se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)-SDS 15 % en condiciones reductoras y se transfirieron a membranas de PVDF BioTrace™ (PALL corporation). Las membranas se bloquearon durante 1 h en TBS más Tween-20 0,1 % y leche desnatada en polvo 5 %, se incubaron durante una noche con el anticuerpo primario y después con los anticuerpos secundarios durante 1 h en tampón de bloqueo, con tres lavados de 10 min cada uno en TBS más Tween-20 0,1 % después de cada incubación. Las señales se desarrollaron usando los Reactivos de Detección de Transferencia de Western ECL™ (Amersham) y se expusieron a Hyperfilm™ ECL (Amersham). Los anticuerpos usados para transferencia Western fueron: anticuerpo monoclonal anti β actina conjugado con peroxidasa (sigma), dilución 1:50000; anticuerpo monoclonal de ratón anti fosfo-p44/42 MAP quinasa humana (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology), dilución 1:2000; anticuerpo policlonal de conejo anti p44/p42 MAP quinasa (Cell Signaling Technology), dilución 1:1000. Se usaron anticuerpo de cabra anti ratón (Jackson ImmunoResearch) a 0,04 µg/ml y anticuerpo de cabra anti conejo (Sigma) a una dilución 1:25000, como anticuerpos secundarios.

55

La Figura 4 muestra la inmunodetección de proteínas actina, ph-ERK y ERK en líneas celulares tanto MDA-MB-231 como MDA-MB-468 después de estimulación con S100A7 solamente o con la combinación de concentraciones aumentadas de anticuerpo monoclonal 2D9. Las gráficas muestran la cuantificación de los niveles de fosforilación usando el software de análisis ImageJ (NIH).

- 5 Los resultados muestran el valor de relación de: $(\text{ph-ERK/actina})/(\text{ERK/actina})$, para cada carril, considerando el valor para las células no estimuladas (carril 1) como 1. El porcentaje de inhibición para los carriles 3-6 se calculó considerando el valor de las células estimuladas (carril 2) como 100 % de estimulación.

10 S100A7 indujo la fosforilación de ERK después de 60 minutos en líneas celulares de adenocarcinoma de mama tanto MDA-MB-231 como MDA-MB-468. El anticuerpo monoclonal 2D9 fue capaz de bloquear esta actividad de una manera dependiente de dosis. Estos resultados son extensibles para los otros anticuerpos monoclonales de la presente invención (datos no mostrados).

Basándose en estos resultados, los inventores han mostrado que S100A7 induce una respuesta en células tumorales a través de la activación de varias rutas de señalización, incluyendo ERK, y que este efecto está bloqueado por los anticuerpos monoclonales contra la proteína S100A7.

15 **Ejemplo 9: S100A7 induce la secreción de TNFalfa y los anticuerpos monoclonales anti S100A7 bloquean esta actividad**

Se determinó después si S100A7 extracelular puede inducir la secreción de TNFalfa al microambiente tumoral por una línea celular tumoral y si esta actividad podría bloquearse por los anticuerpos de acuerdo con la invención.

20 Se sembraron células de adenocarcinoma de mama humano, MDA-MB-231, en placas de 24 pocillos a una densidad de 150.000 células/pocillo y se cultivaron durante 24 horas. Después las células se lavaron dos veces con medio sin suero y se estimularon con S100A7 3 μM . Para ensayos de neutralización se preincubó S100A7 con anticuerpos monoclonales (3 μM) durante 4 h antes de la adición a las células. Después de 72 horas de estimulación, los sobrenadantes se recogieron y se clarificaron por centrifugación. La misma cantidad de sobrenadante de cada condición (35 μl) se resolvió mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)-SDS
25 15 % en condiciones reductoras y se transfirió a membranas de PVDF BioTrace™ (PALL corporation). Las membranas se bloquearon durante 1 h en TBS más Tween-20 0,1 % y leche en polvo desnatada al 5 %, se incubaron durante una noche con el anticuerpo primario y después con los anticuerpos secundarios durante 1 h en tampón de bloqueo, con tres lavados de 10 min cada uno en TBS más Tween-20 0,1 % después de cada incubación. Las señales se desarrollaron usando los Reactivos de Detección de Transferencia de Western ECL™
30 (Amersham) y se expusieron a Hyperfilm™ ECL (Amersham). Los anticuerpos usados para transferencia de Western fueron: anticuerpo policlonal de conejo anti TNFalfa (Sigma) dilución 1:1000; anticuerpo de cabra anti conejo (Sigma) conjugado con peroxidasa a una dilución 1:25000.

35 La Figura 5 muestra la inmunodetección de proteína TNFalfa presente en el sobrenadante de células MDA-MB-231 después de 72 h de estimulación con S100A7. Se analizó el efecto de neutralización de anticuerpos monoclonales 2D9 o 2H3.

S100A7 extracelular indujo la secreción de TNFalfa en células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231, y los anticuerpos monoclonales 2D9 y 2H3 fueron capaces de bloquear esta actividad. Estos resultados son extensibles para los otros anticuerpos monoclonales de la presente invención (datos no mostrados).

40 Teniendo en cuenta estos resultados, se puede especular que S100A7 extracelular presente en microambiente tumoral podría actuar como un modulador de diferentes tipos celulares induciendo la activación de rutas de señalización, como ruta de MAPK, como se ha mostrado previamente, y la expresión y secreción de otros factores, tales como TNFalfa, que también pueden actuar como promotores inflamatorios y tumorales. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención son capaces de bloquear el mecanismo de acción inducido por S100A7 soluble, y de este modo pueden bloquear la respuesta inflamatoria inducida por la proteína.

45 **Ejemplo 10: S100A7 induce la formación de esferas tumorales de HCT116 y los anticuerpos monoclonales anti S100A7 bloquean esta actividad**

La capacidad de las células de adenocarcinoma de colon HCT-116 para formar esferas tumorales se ha descrito previamente (Kai K y col., Cancer Sci. dic 2009; 100: 2275-82).

50 Se cultivaron células HCT-116 en placas de 12 pocillos adherentes con medio FCS DMEM 3 % a una densidad de 200.000 células/pocillo en presencia de S100A7 extracelular (1 μM) durante 120 h. Para bloquear, se incubó S100A7 con anticuerpos monoclonales (3 μM) durante 4 h antes de la adición a las células. Después de estimulación, se tomó una imagen representativa de cada condición. La cantidad de esferas formadas en cada condición de cultivo se analizó visualmente. El ensayo se repitió más de 3 veces con los mismos resultados.

55 La Figura 6 muestra imágenes representativas de la línea celular HCT-116 expuesta a cada condición de cultivo. Las células expuestas a S100A7 extracelular adquirieron una morfología de tipo esfera tumoral después de 120 h de

estimulación. Todos los anticuerpos monoclonales de la presente invención fueron capaces de bloquear esta actividad, como se muestra en la Figura 6 con anticuerpos monoclonales 2D9 y 2H3.

Aquí se ha descrito por primera vez que el factor S100A7 es capaz de inducir este fenotipo de tipo célula madre y que los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención pueden bloquear este efecto.

5 **Ejemplo 11: S100A7 induce la proliferación de células tumorales HT1080 y los anticuerpos monoclonales anti S100A7 bloquean esta actividad**

Se determinó a continuación si S100A7 podría inducir la proliferación de células tumorales HT1080 y si los anticuerpos monoclonales anti S100A7 podrían bloquear esta actividad.

10 Se sembraron células de fibrosarcoma, HT1080, en placas de 96 pocillos a una densidad de 2.000 células/pocillo y se estimularon con S100A7 (500 nM) durante 72 h. Para ensayos de bloqueo se preincubó S100A7 con anticuerpos monoclonales (1,5 µM) durante 2 h antes de la adición a las células. Después de 72 h de estimulación, la viabilidad se midió por un procedimiento colorimétrico basado en sal de tetrazolio de MTT (Calbiochem) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El porcentaje de viabilidad celular se calculó usando la siguiente fórmula:

15
$$\frac{(\text{absorbancia media de células tratadas} - \text{absorbancia media de células de control negativo})}{(\text{absorbancia media de células no tratadas} - \text{absorbancia media de células de control negativo})}$$

La Figura 7 muestra la viabilidad después de 3 experimentos independientes. S100A7 extracelular induce un aumento de 2,6 veces de la proliferación celular con respecto a células no estimuladas. Los anticuerpos mostraron una actividad neutralizante estadísticamente significativa de la estimulación de S100A7: mAb 2D9 (66 %), mAb 9F3 (35 %) y mAb 2H3 (63 %), respectivamente.

20 Teniendo en cuenta estos resultados, se puede concluir que S100A7 puede ser un inductor de la proliferación celular, que está relacionado con el crecimiento tumoral *in vivo*, y los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden bloquear esta actividad.

Ejemplo 12: S100A7 aumenta la migración de células tumorales MDA-MB-231 y A431 y los anticuerpos monoclonales anti S100A7 bloquean esta actividad

25 La migración de células tumorales es necesaria al inicio de la cascada metastásica, momento en el que las células tumorales dejan la localización primaria y acceden a la circulación.

30 Las líneas celulares de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 y A431 se cultivaron en placas de cultivo celular de 24 pocillos (50.000 células/pocillo cada una) con insertos de filtro de membrana PET opaca ligeros con poros de 8 µm (preparados de acuerdo con el fabricante). Las células pueden migrar de forma activa desde el compartimiento superior al inferior.

35 Se añadió medio con proteína S100A7 soluble (3 µM) solo o en combinación con los anticuerpos 2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 o 9F3 (9 µM) a cada pocillo y se cultivaron durante 24 horas. Después de 24 horas las células se incubaron con Calceína-AM (Calbiochem) 5 µM durante 15 minutos a 37 °C. La fluorescencia se midió usando un fluorímetro de exploración multipocillo. Se realizaron comparaciones entre grupos usando el ensayo de U de Mann Whitney no paramétrico de dos colas. Las diferencias para las que el P valor fue menor de 0,05 se consideraron estadísticamente significativas.

40 La Figura 8A muestra que S100A7 extracelular induce un aumento de 1,85 veces de la migración de células tumorales MDA-MB-231 con respecto a células no estimuladas. Los anticuerpos mostraron una actividad neutralizante estadísticamente significativa del efecto de S100A7: 2D9 (90 %), 2H3 (80 %), 6E3 (57 %), 6F5 (72 %), 8B6 (91 %) y 9F3 (63 %), respectivamente.

La Figura 8B muestra que S100A7 extracelular induce un aumento de 1,43 veces de la migración de células tumorales A431 con respecto a células no estimuladas. Los anticuerpos mostraron una actividad neutralizante estadísticamente significativa del efecto de S100A7: 2D9 (100 %), 2H3 (100 %), 6E3 (72 %), 6F5 (100 %), 8B6 (100 %) y 9F3 (100 %), respectivamente.

45 Teniendo en cuenta estos resultados, se puede concluir que S100A7 puede ser un inductor de la migración celular, que está relacionado con la invasión de tumores *in vivo* y la metástasis, y los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden bloquear esta actividad.

Ejemplo 13: S100A7 aumenta la migración de células endoteliales HUVEC y la secreción de metaloproteinasas de la matriz y los anticuerpos monoclonales anti S100A7 bloquean estas actividades

50 La capacidad de las células endoteliales para formar nuevos vasos sanguíneos en el tumor (angiogénesis) está regulada por su capacidad para migrar y secretar metaloproteasas de la matriz que les permitan moverse más fácilmente.

Para el ensayo de migración, se cultivaron células endoteliales de vena humana (HUVEC) en placas de cultivo celular de 24 pocillos (50.000 células/pocillo) con insertos de filtro de membrana PET opaca ligeros con poros de 8 µm (preparados de acuerdo con el fabricante). Las membranas se revistieron con colágeno, de tipo I, de cola de rata (upstate) a 15 µg/ml durante 1 h a 37 °C, antes de sembrar las células.

5 Se añadió medio con proteína S100A7 soluble (1 µM) sola o en combinación con el anticuerpo 6F5 (3 µM) a cada pocillo y se cultivaron durante 24 horas. Después de 24 horas las células se incubaron con Calceína-AM (Calbiochem) 5 µM durante 15 minutos a 37 °C. La fluorescencia se midió usando un fluorímetro de exploración multipocillo. Se realizaron comparaciones entre grupos usando el ensayo de U de Mann Whitney no paramétrico de dos colas. Las diferencias para las que el P valor fue menor de 0,05 se consideraron estadísticamente significativas.

10 La Figura 9 muestra que S100A7 extracelular induce un aumento de 2,1 veces de la migración de células endoteliales con respecto a las células no estimuladas. El anticuerpo 6F5 mostró una actividad neutralizante estadísticamente significativa del efecto de S100A7 (100 % de neutralización).

Además, se estudió la capacidad de S100A7 para inducir la secreción de metaloproteinasas de la matriz en células endoteliales. Se sembraron HUVEC en placas de 24 pocillos a una densidad de 200.000 células/pocillo y se permitió que se unieran durante 24 horas. Después las células se lavaron dos veces con medio sin suero y se estimularon con varias concentraciones de S100A7 recombinante durante 48 h. Para ensayos de neutralización se preincubó S100A7 (3 µM) con anticuerpos monoclonales (9 µM) durante 4 h antes de la adición a las células. Después de 48 horas de estimulación, los sobrenadantes se recogieron y se clasificaron por centrifugación. La misma cantidad de sobrenadante de cada condición (10 µl) se mezcló 1:1 con tampón de muestra no desnaturizante (Tris-HCl 80 mM, pH 6,8, glicerol 10 %, SDS 4 %, azul de bromofenol 0,01 %) y se resolvió en geles de poliacrilamida-SDS 8 % que contenían 1 mg/ml de gelatina (Sigma). Después los geles se lavaron con Triton X-100 (Sigma) 2,5 % durante 15 minutos, tres veces, y se incubaron durante una noche a 37 °C en tampón de desarrollo a pH 7,6 (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM y NaN₃ 0,02 % (p/v)). Los geles se tiñeron después con Azul Brillante R® (Sigma) y se destiñeron con una solución de metanol al 30 % y ácido acético al 10 %. Los geles destiñidos se exploraron para su análisis. Se realizó cuantificación de MMP-9 activa usando software de imágenes NIH, ImageJ.

La Figura 10A muestra un aumento dependiente de la dosis de MMP9 activo en sobrenadantes de células HUVEC después de 48 horas de exposición a las concentraciones indicadas de S100A7. La Figura 10B muestra el efecto de S100A7 a 3 µM cuando se usa solo y el efecto neutralizante de los anticuerpos monoclonales 2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3 cuando se usa a 9 µM y se preincuba con la proteína. La densitometría de las bandas muestra prácticamente 100 % de inhibición de la actividad de S100A7 con todos los anticuerpos usados.

Con estos resultados se puede especular que la proteína S100A7 tiene un papel importante en la angiogénesis tumoral induciendo una mayor movilidad de las células endoteliales y un aumento de la secreción de metaloproteinasas de la matriz. Los anticuerpos de la invención son capaces de bloquear el papel de S100A7 en procesos angiogénicos.

35 **Ejemplo 14: S100A7 aumenta la migración de células monocíticas humanas THP1 y los anticuerpos monoclonales anti S100A7 bloquean esta actividad**

La infiltración de células tumorales en el tumor se ha relacionado con la progresión tumoral, la invasión y la metástasis.

Se cultivaron células monocíticas humanas THP-1 en placas de cultivo de 96 pocillos (50.000 células/pocillo) con insertos de filtro de membrana de poliéster con poros de 8 µm (preparado de acuerdo con el fabricante). Las membranas se revistieron con colágeno, de tipo I, de cola de rata (upstate) a 15 µg/ml durante 1 h a 37 °C, antes de sembrar las células. Inmediatamente después de sembrar las células en la cámara superior, se colocó un estímulo en el compartimento inferior diluido en medio sin suero y se permitió que las células migraran durante 4 h. Después, se recogió el medio del compartimento inferior y se contaron las células migradas totales usando una cámara de Neubauer. Para experimentos de bloqueo, se preincubó S100A7 3 µM con cada anticuerpo monoclonal (9 µM) antes de la adición a las células.

La Figura 11A muestra un aumento dependiente de la dosis de la migración de células THP-1 en presencia de varias concentraciones de S100A7 recombinante, en comparación con las células no estimuladas. La Figura 11B muestra el efecto neutralizante de los anticuerpos monoclonales 2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3 cuando se usan a 9 µM y se preincuban con la proteína (3 µM), consiguiendo un porcentaje de inhibición de 40 %, 50 %, 44 %, 80 %, 48 % y 97 %, respectivamente.

Considerando estos resultados, se puede especular que la proteína S100A7 tiene un papel importante en los procesos inflamatorios reclutando células inflamatorias, como monocitos. Los anticuerpos de la invención son capaces de bloquear el papel de S100A7 en procesos inflamatorios.

55

Ejemplo 15: Los anticuerpos monoclonales 2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3 bloquean el desarrollo de células tumorales A431 en ratones desnudos atímicos, sin efectos secundarios

Se usan habitualmente modelos tumorales de xenoinjerto para evaluar la respuesta a agentes antitumorales. Se ha demostrado que los resultados obtenidos en estos modelos son comparables con los obtenidos en fases clínicas. Los xenoinjertos tumorales son por lo tanto buenos modelos para ensayar la eficacia de agentes antitumorales y predecir la respuesta futura de pacientes de cáncer.

Se inyectó una línea celular tumoral A431 (carcinoma genital humano) por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones desnudos atímicos (4×10^6 células/animal en 100 μ l de medio sin suero). El volumen tumoral se siguió con la ayuda de un calibrador y se calculó usando la fórmula:

$$\text{volumen} = (D \times d^2) / 2$$

en la que D es el eje mayor del tumor y d es el eje menor. Cuando la media del volumen tumoral alcanzó 120 mm³, los animales se clasificaron en 7 grupos (n = 10), de modo que el tamaño tumoral medio fue similar entre los grupos y se iniciaron los tratamientos. Los animales se trataron tres veces a la semana por vía intraperitoneal con tampón de PBS (grupo de control) o anticuerpos monoclonales (2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 o 9F3) a 25 mg/kg/100 μ l de PBS estéril.

La gráfica en la Figura 12 muestra la evolución de la media del volumen tumoral para cada grupo a lo largo del tiempo desde el inicio del tratamiento (día 0). Los tumores de PBS alcanzaron una media de volumen tumoral de 507 mm³, mientras que los grupos tratados (2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3) alcanzaron volúmenes de 375, 383, 359, 275, 301 y 319 mm³, respectivamente. La relación T/C para cada grupo se calcula usando la fórmula: relación T/C = volumen tumoral medio de grupo tratado/volumen tumoral medio de grupo de control (PBS). Usando esta fórmula, las relaciones T/C obtenidas para cada grupo fueron: 0,73, 0,75, 0,70, 0,54, 0,59 y 0,62, respectivamente, como se muestra en la tabla debajo de la gráfica en la Figura 12. Este resultado significa que todos los anticuerpos monoclonales ensayados (2D9, 2H3, 6E3, 6F5, 8B6 y 9F3) afectaron el crecimiento tumoral, reduciendo el volumen tumoral en 27 %, 25 %, 30 %, 46 %, 41 % y 38 %, respectivamente.

Con estos resultados, los inventores han demostrado por primera vez que un tratamiento con un anticuerpo monoclonal contra S100A7 induce una reducción importante en el crecimiento tumoral, en comparación con el grupo de control.

Además, el peso corporal del control y los animales tratados se siguió, con el objetivo de detectar posibles efectos secundarios inducidos por los anticuerpos administrados. Como se muestra en la Figura 13, no se observó ninguna pérdida de peso en ningún grupo. Además, el análisis macroscópico de los animales no mostró ninguna anomalía en los órganos. No se observó ningún efecto secundario adverso (coordinación, parálisis, ataxia, ataques, diarrea, caquexia, eritema, hipotermia o mortalidad) en ningún animal a lo largo del experimento.

Basándose en estos resultados, los inventores pueden concluir que el tratamiento con un anticuerpo monoclonal contra S100A7 no es tóxico a la dosis y en el programa usado en este experimento.

35 Depósitos de materiales biológicos

El hibridoma que produce anticuerpo monoclonal anti S100A7 2D9-1C4-3D7-5E6 se depositó en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) (Porton Down, Stalisbury, SP4 OJG, Reino Unido) en las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. Se depositó el 7 de febrero de 2013 y el número asignado a dicho depósito fue ECACC 13020701.

40 El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal anti S100A7 2H3-1A12-5E12-1A4 se depositó en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) (Porton Down, Stalisbury, SP4 OJG, Reino Unido) bajo las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. Se depositó el 7 de febrero de 2013 y el número asignado a dicho depósito fue ECACC 13020702.

45 El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal anti S100A7 6E3-2D5-1F9-5B4 se depositó en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) (Porton Down, Stalisbury, SP4 OJG, Reino Unido) bajo las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. Se depositó el 7 de febrero de 2013 y el número asignado a dicho depósito fue ECACC 13020703.

50 El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal anti S100A7 6F5-2F8-2G9-1A2 se depositó en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) (Porton Down, Stalisbury, SP4 OJG, Reino Unido) bajo las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. Se depositó el 7 de febrero de 2013 y el número asignado a dicho depósito fue ECACC 13020704.

El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 8B6-1A9-5A8-8G2 anti S100A7 se depositó en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) (Porton Down, Stalisbury, SP4 OJG, Reino Unido) en las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. Se depositó el 7 de febrero de 2013 y el número asignado a dicho depósito

fue ECACC 13020705.

El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal anti S100A7 9F3-3E6-2D7-3B3 se depositó en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) (Porton Down, Stalisbury, SP4 OJG, Reino Unido) bajo las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. Se depositó el 7 de febrero de 2013 y el número asignado a dicho depósito fue ECACC 13020706.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ACONDICIONAMIENTO TARRASENSE

10 <120> ANTICUERPOS ANTI-S100A7 PARA EL TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO DE CÁNCER

<130> P6902PC00

15 <150> EP 13382128

<151> 09-04-2013

<160> 4

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 104

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<200>

<223> Proteína de fusión de S100A7

30 <400> 1

Gly Ser His Met Ser Asn Thr Gln Ala Glu Arg Ser Ile Ile Gly Met
1 5 10 15

Ile Asp Met Phe His Lys Tyr Thr Arg Arg Asp Asp Lys Ile Glu Lys
20 25 30

Pro Ser Leu Leu Thr Met Met Lys Glu Asn Phe Pro Asn Phe Leu Ser
35 40 45

Ala Cys Asp Lys Lys Gly Thr Asn Tyr Leu Ala Asp Val Phe Glu Lys
50 55 60

Lys Asp Lys Asn Glu Asp Lys Lys Ile Asp Phe Ser Glu Phe Leu Ser
65 70 75 80

Leu Leu Gly Asp Ile Ala Thr Asp Tyr His Lys Gln Ser His Gly Ala
85 90 95

Ala Pro Cys Ser Gly Gly Ser Gln
100

<210> 2

<211> 42

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 639 227 T3

<200>
<223> cebador directo

5 <400> 2
actcacatat gagcaacct caagctgaga ggtccataat ag 42

10 <210> 3
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <200>
<223> cebador inverso

20 <400> 3
actcatgagc tcactctggc tgcccccgga acagggcgct gc 42

25 <210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<200>
<223> Secuencia de reconocimiento de trombina proteasa en proteína de fusión de S100A7

<400> 4

Leu Val Pro Arg Gly Ser
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente a la proteína S100A7 o un fragmento del mismo con capacidad para unirse a dicho antígeno para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad seleccionada de cáncer, una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada y una enfermedad asociada con inflamación.
- 5 2. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer es un cáncer metastásico o un cáncer que forma esferas tumorales.
3. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el tumor se **caracteriza por un** aumento de la activación de la ruta de MAPK y/o por un aumento de la expresión de TNFalfa.
- 10 4. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma colorrectal, fibrosarcoma, carcinoma epidermoide, carcinoma genital y cáncer de mama.
5. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cáncer es carcinoma digestivo.
- 15 6. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706.
- 20 7. Un anticuerpo monoclonal específico anti S100A7 producido por un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o un polipéptido que tiene al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo monoclonal con capacidad para unirse a S100A7.
8. Una línea celular de hibridoma seleccionada de las líneas celulares depositadas con el número de acceso ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706.
- 25 9. Un procedimiento para obtener un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende cultivar una línea celular de hibridoma seleccionada de las líneas celulares depositadas con el número de acceso ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 en condiciones que permiten la producción de dicho anticuerpo.
10. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo monoclonal o un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 7 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 11. Un kit para diagnosticar cáncer o una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación en una muestra que comprende al menos un anticuerpo o un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 7.
12. Un conjugado que comprende un anticuerpo monoclonal o polipéptido de acuerdo con la reivindicación 7 y un segundo componente seleccionado del grupo de:
 - 35 (a) un agente citotóxico,
 - (b) un agente antiangiogénico,
 - (c) un agente antimetastásico,
 - (d) un agente antiproliferativo y
 - (e) un agente antiinflamatorio.
- 40 13. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 12, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer o una enfermedad asociada a una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación.
14. Un procedimiento *in vitro* para el diagnóstico de cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital o para el diagnóstico de una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o para una enfermedad asociada con inflamación en un sujeto, que comprende:
 - 45 (a) detectar los niveles de la proteína S100A7 en un biofluido de dicho sujeto y
 - (b) comparar dichos niveles con un valor de referencia

en el que los niveles aumentados de la proteína S100A7 con respecto al valor de referencia son indicativos de que el sujeto padece cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital o de enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación.
- 50 15. Un procedimiento *in vitro* para determinar el pronóstico o para supervisar la progresión de un cáncer seleccionado de carcinoma digestivo y genital o de una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis

no deseada o de una enfermedad asociada con inflamación en un sujeto que comprende:

(a) detectar los niveles de la proteína S100A7 en un biofluido de dicho sujeto y

(b) comparar dichos niveles con un valor de referencia para dicha proteína obtenida del mismo sujeto en un punto temporal más temprano de la enfermedad

5 en el que una reducción de los niveles de la proteína S100A7 con respecto al valor de referencia es indicativo de que el carcinoma digestivo o genital o una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación muestra un buen pronóstico o

10 en el que un aumento de los niveles de la proteína S100A7 con respecto al valor de referencia es indicativo de que el carcinoma digestivo o genital o una enfermedad no cancerosa asociada con una angiogénesis no deseada o una enfermedad asociada con inflamación muestra un mal pronóstico.

16. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 14 o 15, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en ECACC 13020701, ECACC 13020702, ECACC 13020703, ECACC 13020704, ECACC 13020705 y ECACC 13020706 o una variante funcional de dicho anticuerpo.

15 17. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el carcinoma digestivo es carcinoma colorrectal.

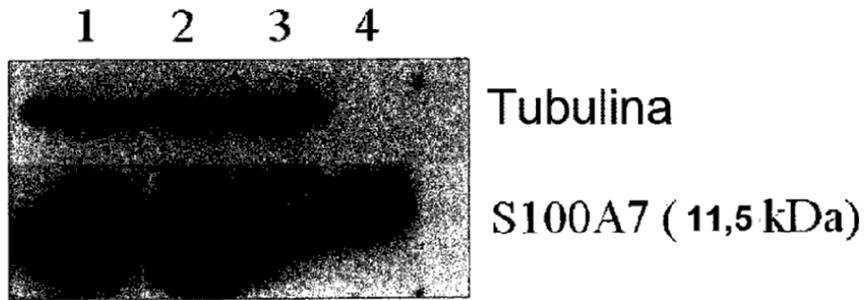


FIG.1

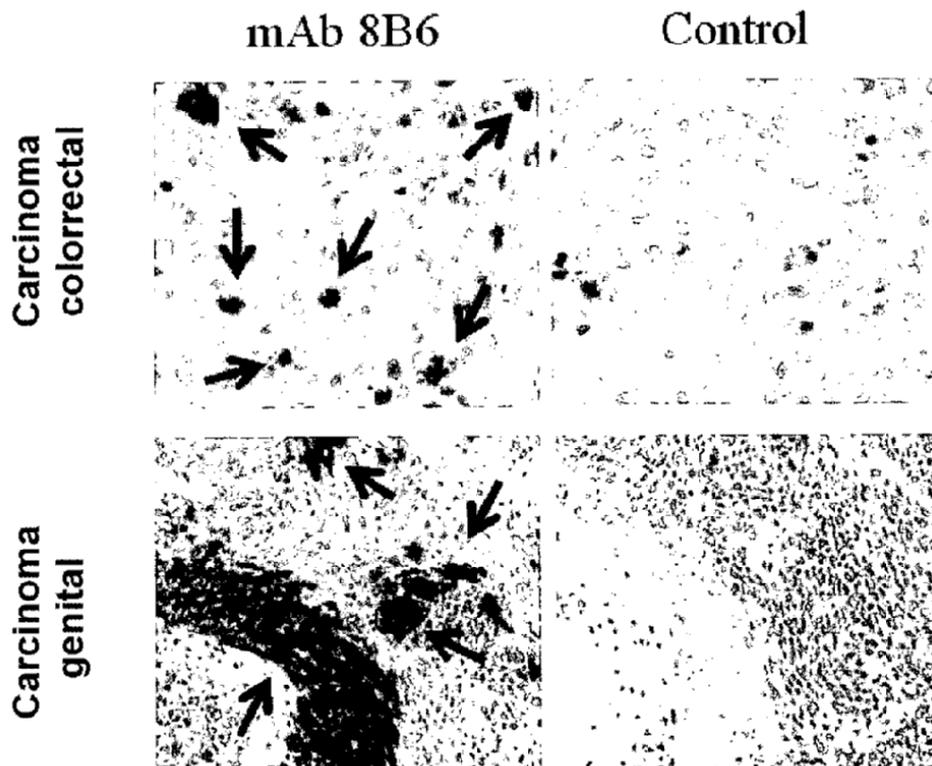
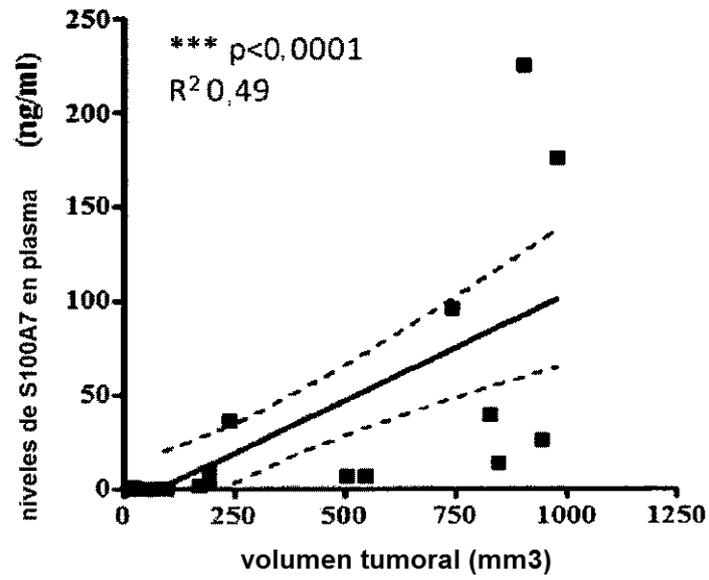


FIG.2

A



B

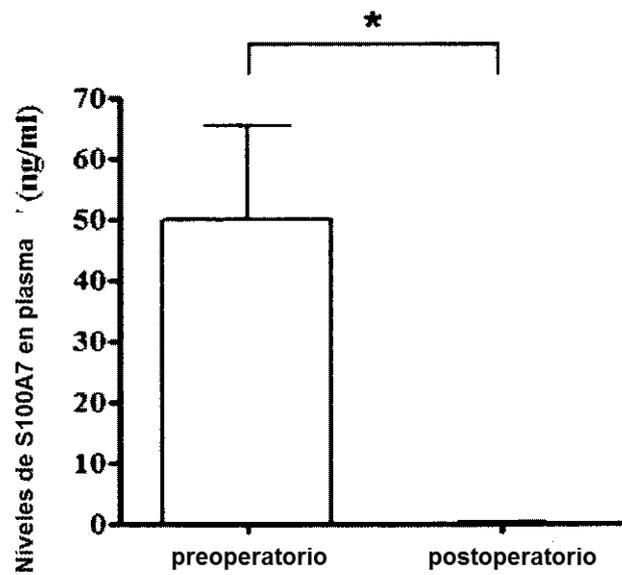


FIG.3

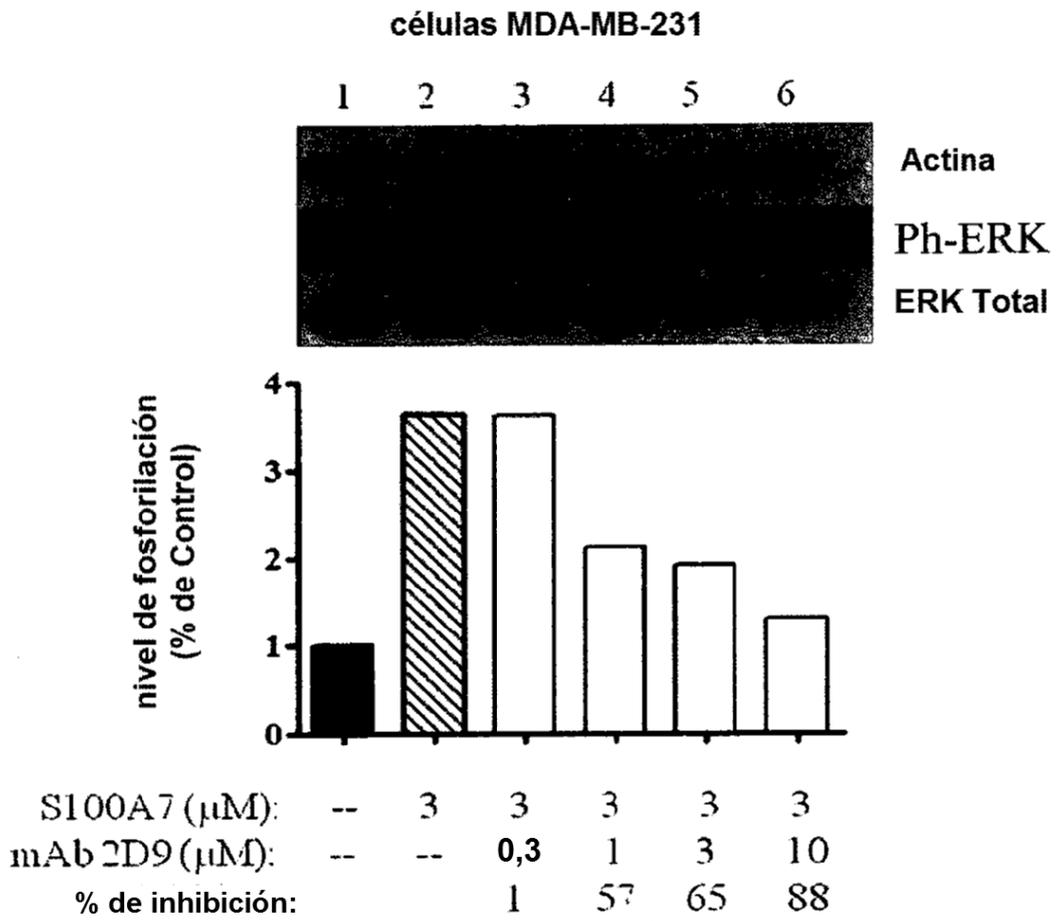


FIG. 4

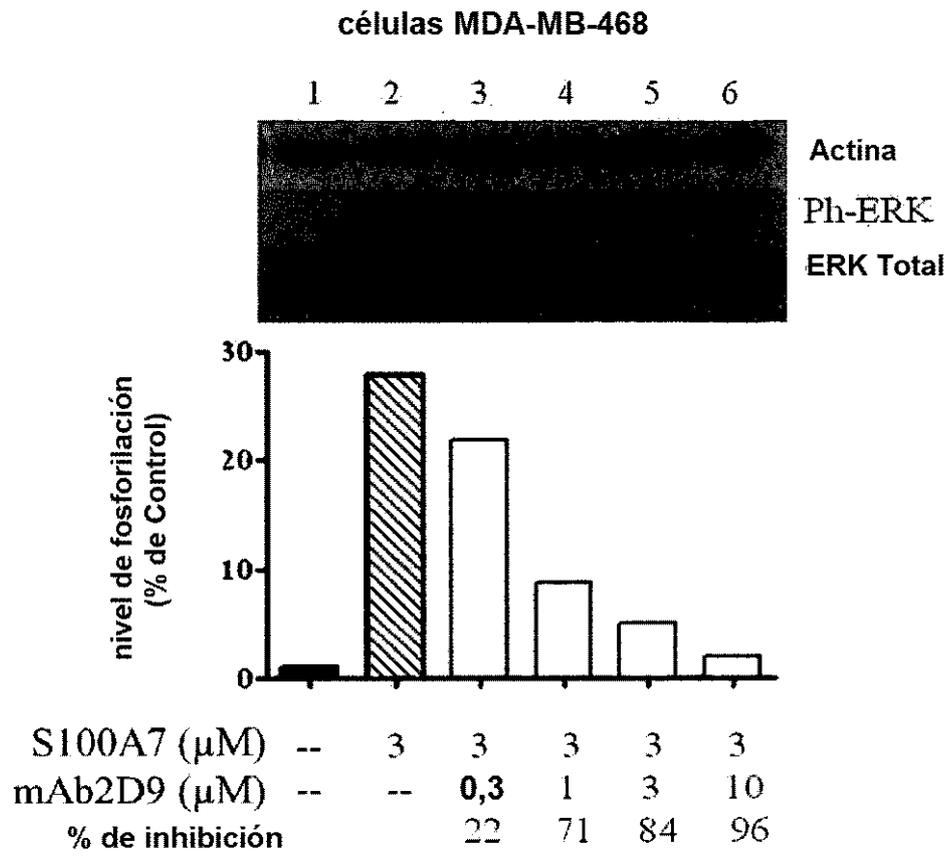


FIG.4 (cont)

TNF α secretada							17 kDa
S100A7 (μ M):	--	3	3	3	--	--	
mAb 2H3 (μ M):	--	--	3	--	3	--	
mAb 2D9 (μ M):	--	--	--	3	--	3	

FIG.5

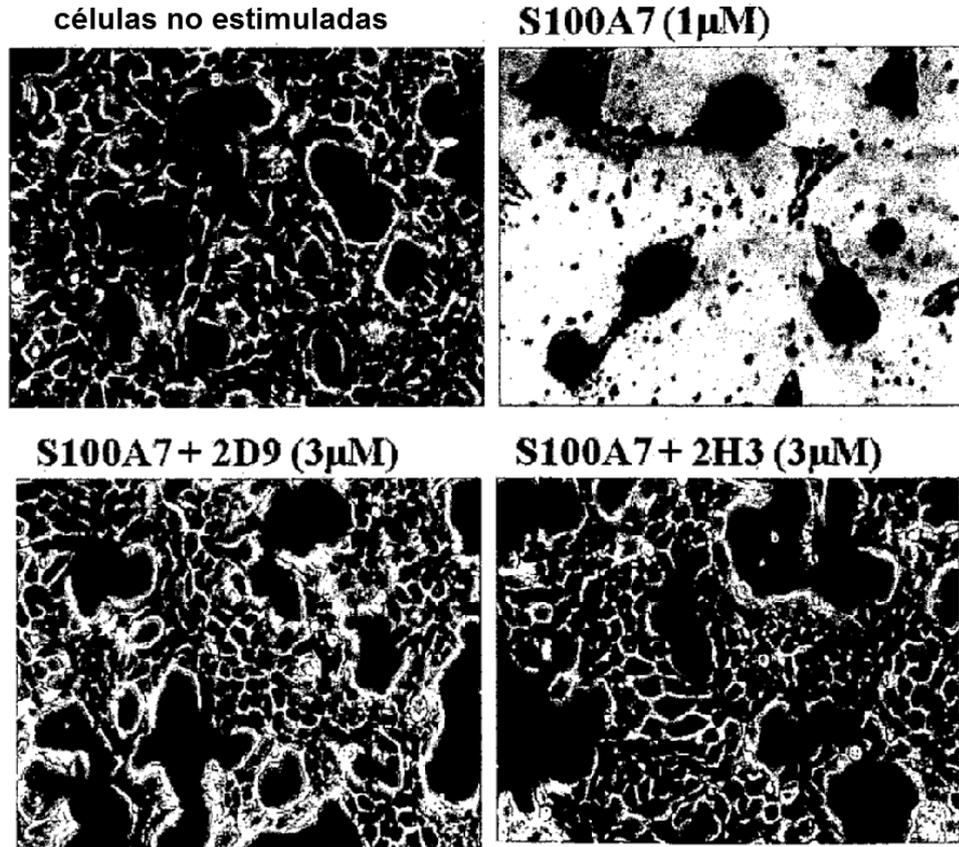


FIG.6

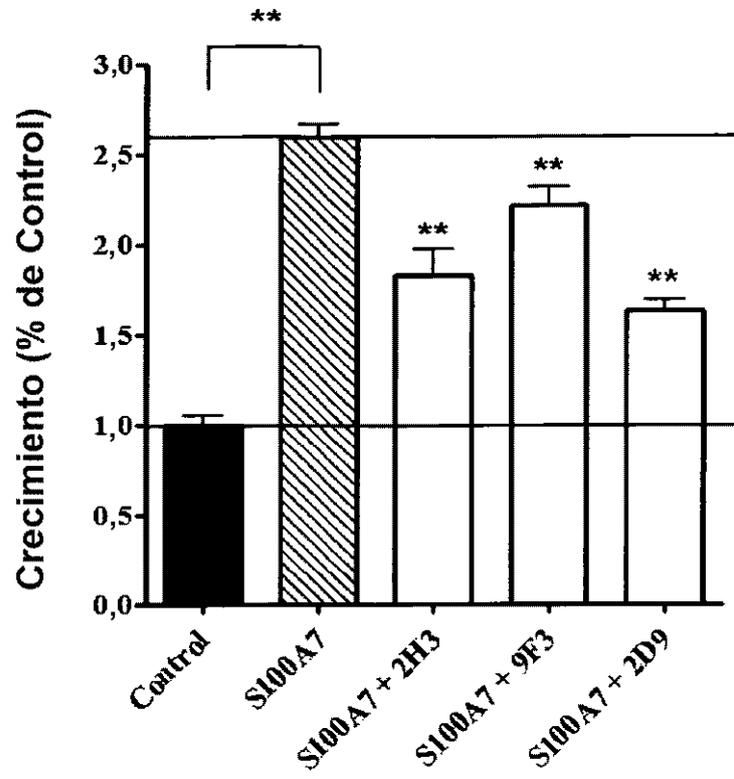


FIG.7

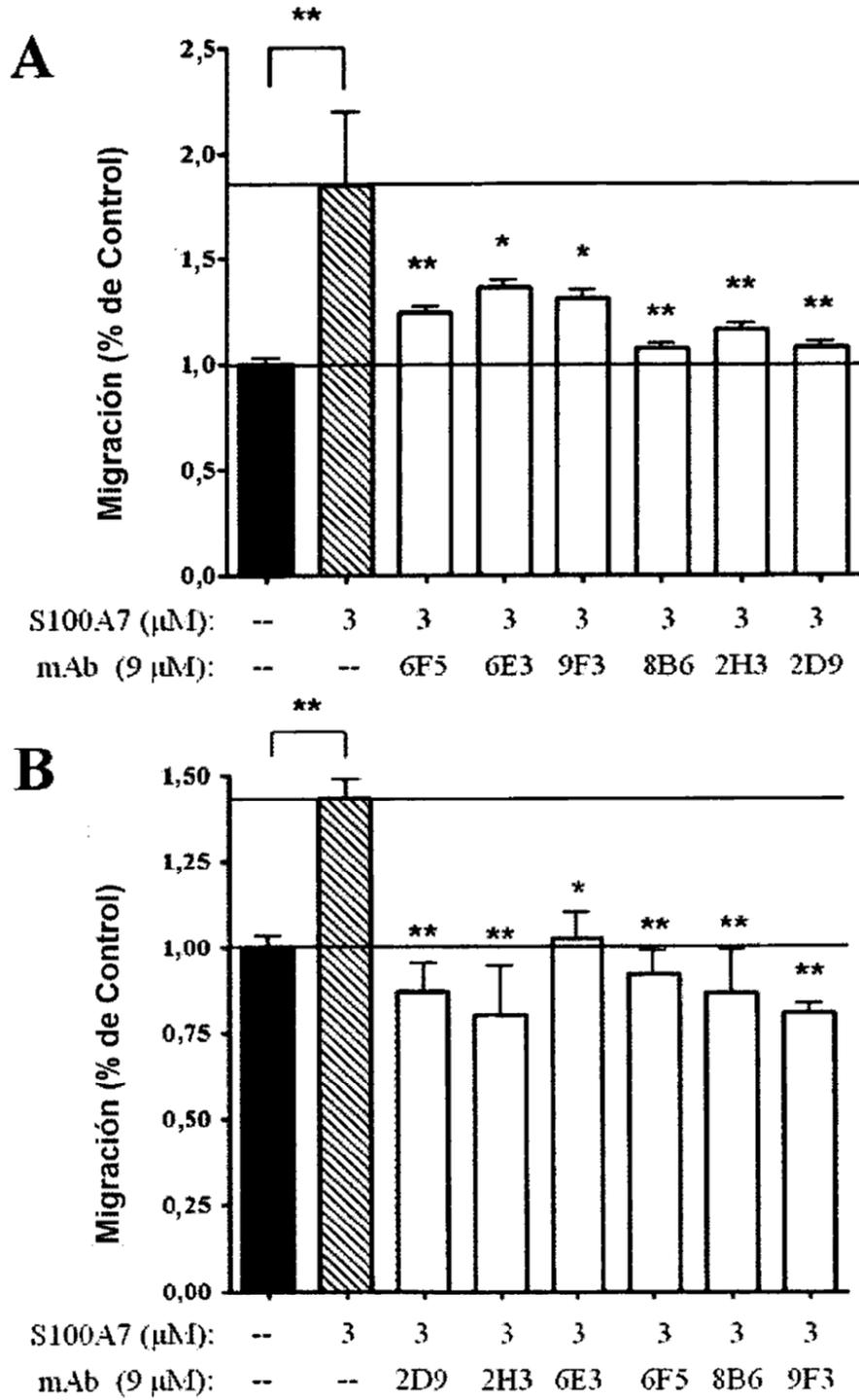


FIG.8

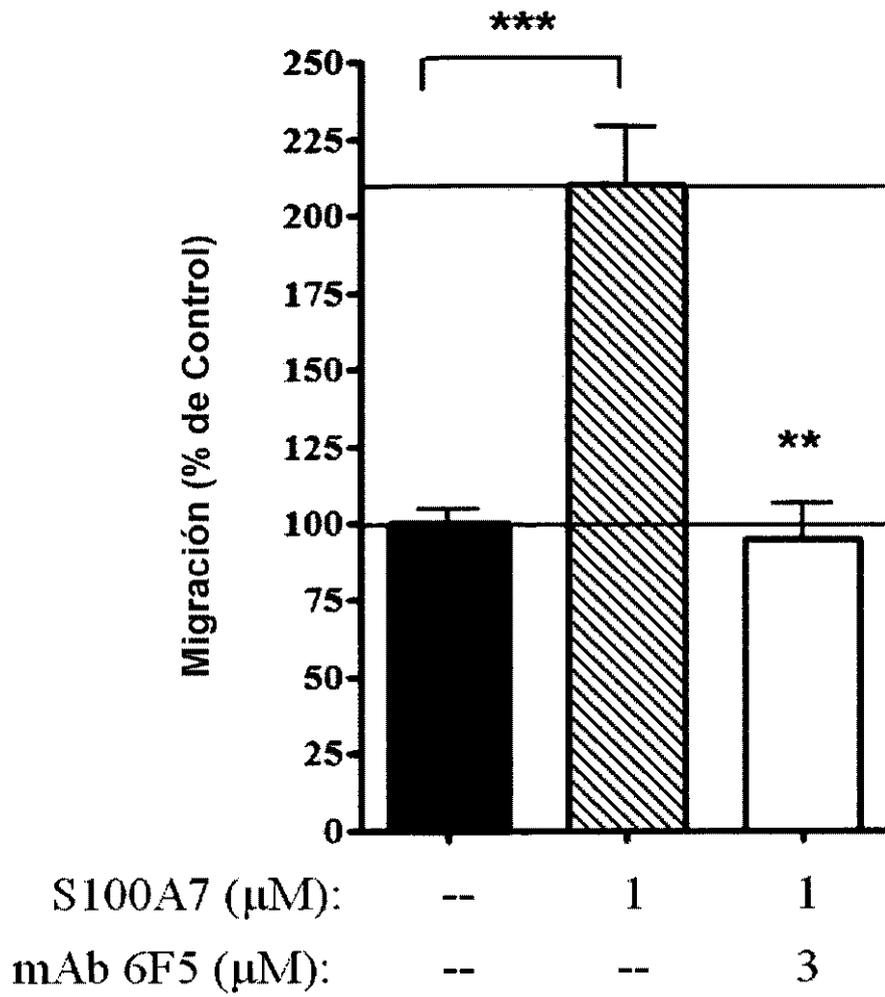


FIG.9

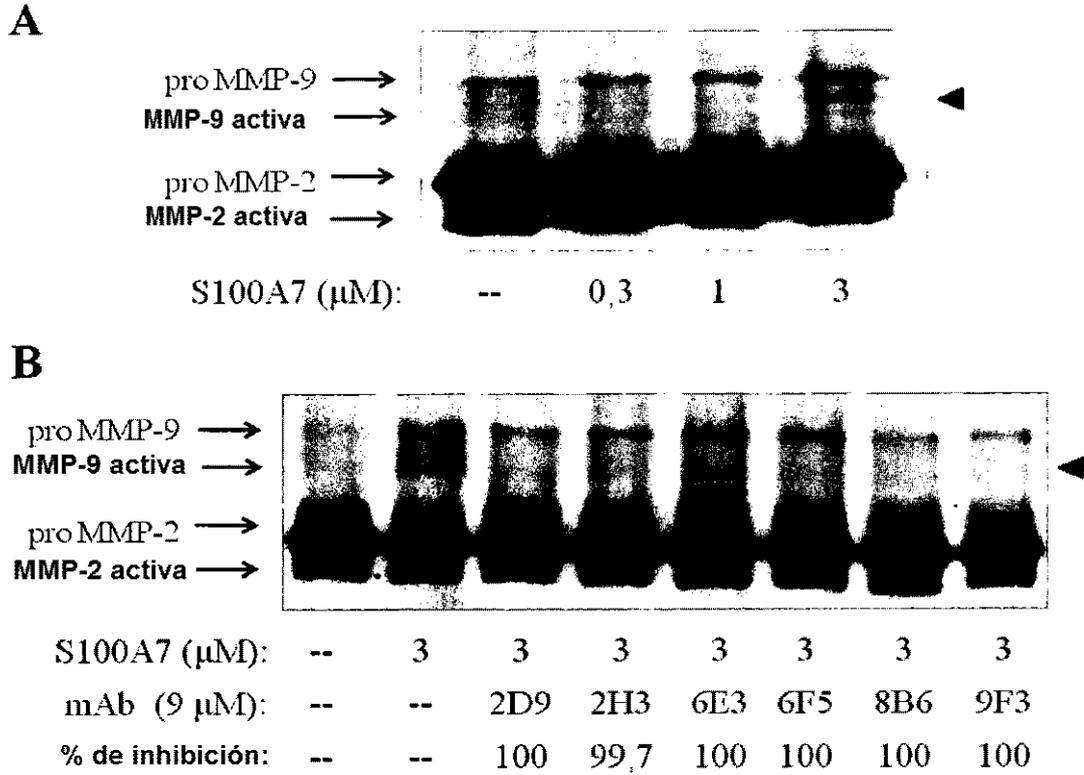


FIG.10

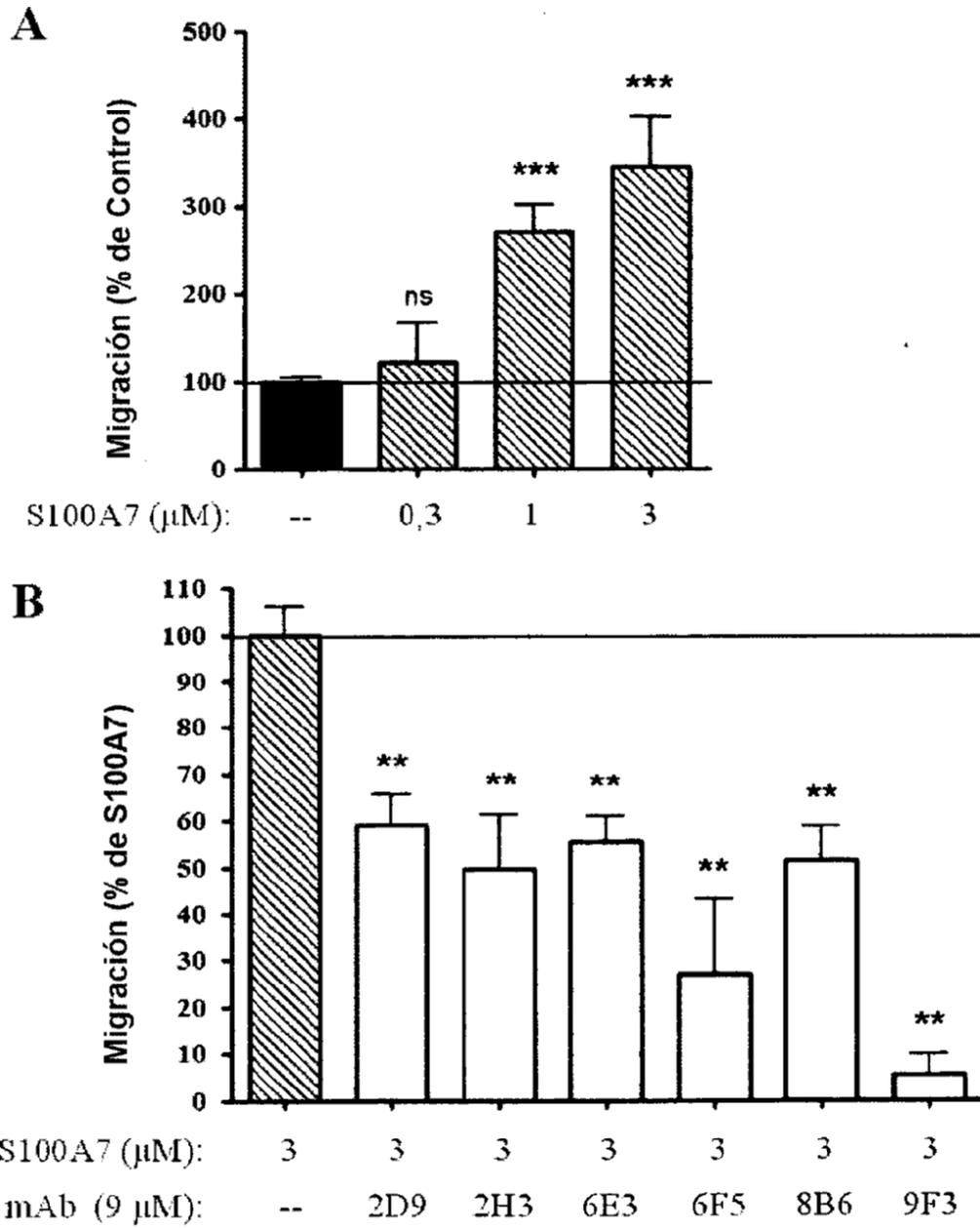
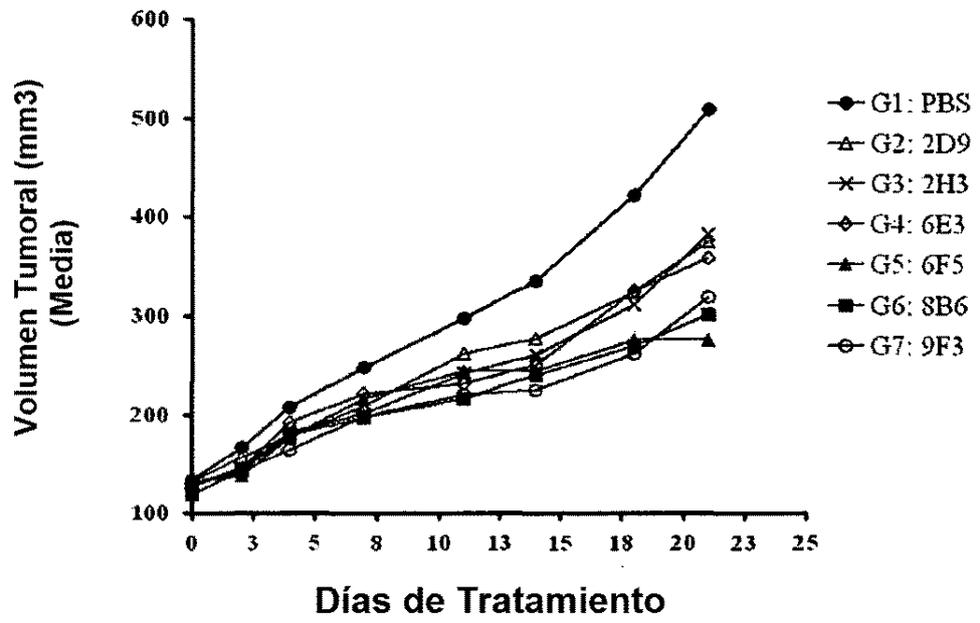


FIG.11

A



B

	PBS	2D9	2H3	6E3	6F5	8B6	9F3
relación T/C	--	0,73	0,75	0,70	0,54	0,59	0,62

FIG.12

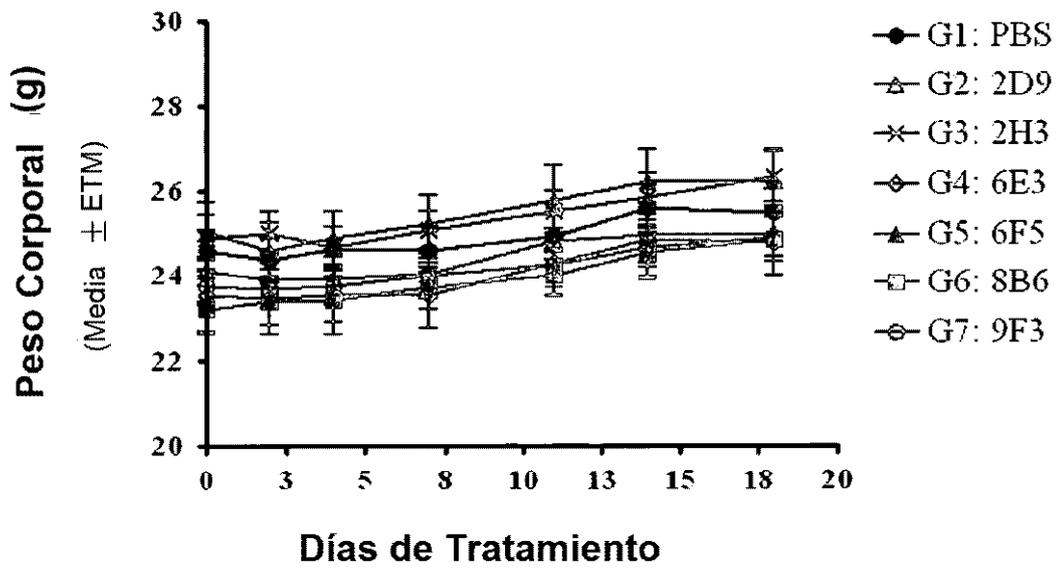


FIG.13