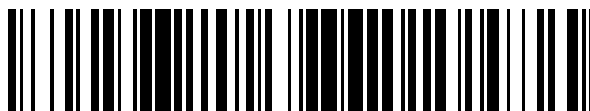


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 999**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

A61P 25/22 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2012 PCT/GB2012/000906**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13088111**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2012 E 12805726 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2791167**

54 Título: **Un método de tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo (TOC) o la ansiedad usando un anticuerpo que se une a la anexina-1**

30 Prioridad:

14.12.2011 GB 201121564

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

04.06.2018

73 Titular/es:

**QUEEN MARY AND WESTFIELD COLLEGE
UNIVERSITY OF LONDON (100.0%)**

**Mile End Road
London E1 4NS, GB**

72 Inventor/es:

**D'ACQUISTO, FULVIO y
PERRETTI, MAURO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 670 999 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

Un método de tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo (TOC) o la ansiedad usando un anticuerpo que se une a la anexina-1

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de moléculas de unión específicas, particularmente anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se unen a la anexina-A1, en el tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo (TOC) y enfermedades relacionadas.

10

Antecedentes de la invención

El trastorno obsesivo compulsivo (TOC) es una afección psiquiátrica crónica y recurrente con una prevalencia de por vida del 1-3 %. De acuerdo con el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (4^a ed; DSM IV), las características esenciales de esta enfermedad son obsesiones y/o compulsiones recurrentes (por ejemplo, dudar, controlar, lavar) que consumen tiempo (es decir, llevan más de 1 hora por día) o causan una angustia notable o un deterioro significativo.

15

Los tratamientos más efectivos para los trastornos mentales como el TOC son los tratamientos antipsicóticos y conductuales. Sin embargo, alrededor del 30 % de los pacientes son resistentes a la terapia farmacológica y conductual. Además, los efectos secundarios como la agranulocitosis (pérdida de los glóbulos blancos que ayudan a una persona a combatir las infecciones) y los cambios en el metabolismo de la persona (que conducen a la diabetes) son problemas graves que limitan el uso de estos fármacos. Kellner, 2010 describe inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) o inhibidores de la recaptación de serotonina (SRI) como agentes de primera línea recomendados para el tratamiento del TOC. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de una terapia para tales enfermedades que no tenga estos efectos secundarios no deseados.

20

25

Sumario de la invención

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre dentro de las reivindicaciones se proporciona solo a título informativo.

30

Los presentes inventores han descubierto previamente que los anticuerpos que se unen a una proteína llamada anexina-1 (Anx-A1) son útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas por linfocitos T. Este es el objeto de la solicitud PCT publicada como WO 2010/064012. Los inventores también han producido un anticuerpo monoclonal que se une a la Anx-A1 y que tiene propiedades excelentes en términos de inhibición específica de la activación de linfocitos T sin efectos citotóxicos adversos. Este anticuerpo es el objeto de la solicitud PCT publicada como WO 2011/154705. Los inventores ahora han descubierto sorprendentemente que los anticuerpos que se unen a la Anx-A1 son útiles en el tratamiento del TOC y de las enfermedades relacionadas.

35

40

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una molécula de unión específica que se une a la anexina-1 (Anx-A1) para su uso en el tratamiento del trastorno obsesivo-compulsivo (TOC) o de la ansiedad. En una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión específica obtenida contra la proteína Anx-A1 humana que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2A para su uso en el tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo (TOC) o la ansiedad.

45

Definiciones

Como se usa en la presente memoria, una "molécula de unión específica" es un miembro de un par de moléculas que tienen especificidad de unión entre sí. Los miembros de un par de unión específica pueden ser de origen natural o pueden producirse total o parcialmente sintéticamente. Un miembro del par de moléculas tiene un área en su superficie, que puede ser una protrusión o una cavidad, que se une específicamente y por lo tanto es complementaria a una organización espacial y polar particular del otro miembro del par de moléculas. Por lo tanto, los miembros del par tienen la propiedad de unirse específicamente entre sí. Los ejemplos de tipos de pares de unión específica son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando y enzima-sustrato. La presente invención generalmente se refiere a reacciones de tipo antígeno-anticuerpo. La molécula de unión específica usada en la presente invención se une con mayor afinidad a la Anx-A1 que a otras moléculas, es decir, se une específicamente a la Anx-A1. Las moléculas de unión específica que se unen a la Anx-A1 incluyen anticuerpos y aptámeros anti-Anx-A1. La molécula de unión específica usada en la presente invención es generalmente un anticuerpo.

50

55

60

El término "anticuerpo" como se usa en la presente memoria se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno, ya sea natural o producido parcial o totalmente sintéticamente. El término también abarca cualquier polipéptido o proteína que tenga un dominio de unión que sea, o sea homólogo

65

a, un dominio de unión al anticuerpo. Estos pueden obtenerse de fuentes naturales, o pueden ser parcial o totalmente sintéticos. Los anticuerpos son polipéptidos que generalmente contienen dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, que son más pequeñas que las cadenas pesadas. En los mamíferos hay dos tipos de cadena ligera, que se llaman lambda (λ) y kappa (κ). Cada una de las cadenas pesadas y cada una de las cadenas ligeras están compuestas por una región variable y una región constante. La región variable de la cadena pesada se conoce como la región V_H y la región variable de la cadena ligera se conoce como la región V_L . Para las cadenas ligeras kappa, la región V_L también se conoce como la región V_K . Cada una de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR), CDR1, CDR2 y CDR3. Estas se denominan VLCDR1, VLCDR2, VLCDR3, VHCDR1, VHCDR2 y VHCDR3, respectivamente. Los ejemplos de anticuerpos son los isotipos de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) y sus subclases isotípicas; fragmentos que comprenden un dominio de unión al antígeno tal como Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, dAb, Fd y diacuerpos. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Un anticuerpo monoclonal se puede referir aquí como "mAb"

15 Descripción detallada de la invención

Las anexinas son un grupo de proteínas celulares de unión a calcio y fosfolípidos y también se conocen como lipocortinas. En los seres humanos, la familia de las anexinas tiene 13 miembros, que incluyen anexina A1, anexina A2 y anexina A5. La anexina-A1 también se conoce como anexina-1 y se denomina en la presente memoria "Anx-A1". La anexina-1 humana (Anx-A1) es una proteína de 37 kDa y se describió originalmente como un mediador de las acciones de los glucocorticoides. En los últimos años la evidencia ha demostrado que la Anx-A1 juega un papel homeostático en el sistema inmunitario adaptativo, en particular los linfocitos T, al modular la fuerza de la señalización del receptor de linfocitos T (TCR). La Anx-A1 actúa como un regulador a la baja endógeno de la inflamación en las células del sistema inmunitario innato *in vivo*. La Figura 1A es un diagrama de cinta que muestra la estructura tridimensional de la Anx-A1.

Hay ocho secuencias de nucleótidos humanos que codifican la Anx-A1. De estas, solo cuatro están traducidas y, por lo tanto, hay cuatro isoformas de la Anx-A1, designadas ANXA1-002, ANXA1-003, ANXA1-004 y ANXA1-006. Estas secuencias están disponibles en el sitio web de Ensembl (www.ensembl.org) y se designan ENSP00000257497 (ANXA1-002), ENSP00000366109 (ANXA1-003), ENSP00000412489 (ANXA1-004) y ENSP00000414013 (ANXA1-006). Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de una isoforma de la anexina 1 humana (Anx-A1), ANXA1-003, se muestran en la Figura 2A. Las secuencias de aminoácidos de las isoformas ANXA1-002, ANXA1-004 y ANXA1-006 se muestran en las Figuras 2B, 2C y 2D, respectivamente. Como se puede ver en la Figura 2, las isoformas ANXA1-002, ANXA1-004 y ANXA1-006 son variantes de corte y empalme cortas de la ANXA1-003 o variantes de la ANXA1-003 con un pequeño número de cambios de aminoácidos.

Una serie de estudios han demostrado que un péptido N-terminal de Anx-A1 denominado Ac.2-26 actúa como un sustituto bioactivo de la proteína completa (véase, p.ej., Lim et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 14535-9, 1998).

La Figura 1B es una representación esquemática de las repeticiones de anexina y la localización de esta secuencia bioactiva. El péptido Ac.2-26 es un péptido acetilado que tiene la secuencia de los restos de aminoácidos 2-26 de la secuencia de aminoácidos de longitud completa de Anx-A1 que se muestra en la Figura 2. La secuencia del péptido Ac.2-26 se muestra en la Figura. 1C y que es la siguiente:



La Anx-A1 y sus péptidos bioactivos derivados de N-terminal median sus efectos biológicos a través de miembros de la familia del receptor de péptidos formilados (FPR). La proteína de longitud completa Anx-A1 ejerce sus acciones contrarreguladoras sobre la extravasación de neutrófilos y la inmunidad innata por unión directa y activación de un miembro de esta familia, el receptor de péptidos formilados de tipo 1 (FPRL-1), también conocido como receptor de péptido formilado 2 (FPR-2/ALX). Los presentes inventores han encontrado previamente que la estimulación de los linfocitos T en presencia de hrAnx-A1 aumenta la activación de los linfocitos T a través de la estimulación de FPRL-1/FPR-2/ALX (D'Acquisto et al., Blood 109: 1095-1102, 2007).

El anticuerpo específico o fragmento del mismo usado en la presente invención se une a la anexina 1 (Anx-A1). La Anx-A1 a la que se une la molécula de unión específica es generalmente la Anx-A1 humana que tiene la secuencia polipeptídica mostrada en la Figura 2A, o una variante de la misma tal como una de las isoformas de la Anx-A1 humana que tiene la secuencia polipeptídica mostrada en la Figura 2B o La Figura 2C, o un fragmento de la misma tal como el polipéptido que tiene la secuencia mostrada en la figura 1C o la isoforma de la Anx-A1 humana que tiene la secuencia polipeptídica mostrada en la figura 2D. La Anx-A1 a la que se une la molécula de unión específica está codificada generalmente por la secuencia de nucleótidos que se muestra en la Figura 2A.

Los anticuerpos anti-Anx-A1 pueden obtenerse, por ejemplo, contra la Anx-A1 humana que tiene una secuencia polipeptídica expuesta en la Figura 2A, 2B, 2C o 2D, generalmente la secuencia polipeptídica expuesta en la Figura 2A. Como alternativa, los anticuerpos anti-Anx-A1 pueden dirigirse a un epítipo o epítopos particulares de la Anx-A1

humana que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en la Figura 2. Por ejemplo, los anticuerpos anti-Anx-A1 pueden dirigirse contra un fragmento N-terminal de Anx-A1, por ejemplo un fragmento N-terminal de al menos 188, 100, 50 o 25 restos de aminoácidos del extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Figura 2A. Como alternativa, el anticuerpo anti-Anx-A1 para su uso en la invención es un anticuerpo obtenido contra el fragmento N-terminal de la Anx-A1 denominado Ac2-26 y que tiene la secuencia mostrada en la Figura 1C, o contra un fragmento de al menos 6 aminoácidos de la misma. Las moléculas de unión específica que se unen a la Anx-A1 por lo tanto incluyen anticuerpos anti-Anx-A1 que son anticuerpos contra el fragmento Anx-A1 Ac2-26 que tiene la secuencia mostrada en la Figura 1C o un fragmento de al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23 o al menos 24 aminoácidos de la misma. En esta realización, el anticuerpo anti-Anx-A1 se obtiene contra un fragmento de la secuencia mostrada en la Figura 1C que es antigénico y capaz de estimular la producción de anticuerpos que, cuando se administra, pueden usarse en el tratamiento del TOC y enfermedades relacionadas.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una molécula de unión específica que se une a la anexina-1 (Anx-A1) para su uso en el tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo (TOC) o la ansiedad, donde la molécula de unión específica es un anticuerpo o fragmento del mismo. En una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión específica producida contra la proteína Anx-A1 humana que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2A para su uso en el tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo (TOC) o la ansiedad, donde la molécula de unión específica es un anticuerpo o fragmento del mismo.

Este aspecto de la invención también se extiende al uso de una molécula de unión específica que comprende las Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR) VLCDR1, VLCDR2, VLCDR3, VHCDR1, VHCDR2 y VHCDR3 de la molécula de unión específica como se define en relación con el primer aspecto de la invención o una secuencia de aminoácidos al menos un 70 % idéntica a cada una de las respectivas CDR. La molécula de unión específica es un anticuerpo o fragmento del mismo.

En una realización, el anticuerpo específico o fragmento del mismo comprende Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR) VLCDR1, VLCDR2, VLCDR3, VHCDR1, VHCDR2 y VHCDR3, cada una con una secuencia de aminoácidos respectiva de la siguiente manera

VLCDR1 es KASENVVITYVS
 VLCDR2 es GASNRYT
 VLCDR3 es GQGYSYPYT
 VHCDR1 es GYTFTNYWIG
 VHCDR2 es DIYPGGDYTNYNEKFKG
 VHCDR3 es WGLGYFDY

o una secuencia de aminoácidos al menos 70 % idéntica a la misma.

Las CDR se designan de acuerdo con una combinación de definición de secuencia conservada (Kabat et al en "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Nat'l. Inst. Health, Bethesda, MD (1987)) y la definición estructural (Chothia y Lesk J. Mol Biol. 196: 901-17 (1987)). Estas definiciones también se describieron posteriormente en Carter et al., Proc Nat'l Acad Sci USA. 89: 4285-9 (1992)).

La presente invención también se extiende al uso de variantes de secuencias de proteínas, polipéptidos y péptidos a las que se hace referencia en la presente memoria. Como se usa en la presente memoria, el término "variante" se refiere a proteínas, polipéptidos y péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos similar y/o que conservan la misma función. Por ejemplo, el término "variante" abarca proteínas, polipéptidos y péptidos que incluyen una o más adiciones, deleciones y sustituciones de aminoácidos o similares. Un ejemplo de una variante de la presente invención es una proteína, tal como una proteína de fusión, que comprende un péptido como se definió anteriormente, aparte de la sustitución de uno o más aminoácidos con uno o más aminoácidos diferentes. El experto es consciente de que varios aminoácidos tienen propiedades similares. Uno o más de tales aminoácidos de una sustancia a menudo pueden estar sustituidos con uno o más de tales aminoácidos sin eliminar la actividad deseada de esa sustancia.

Por lo tanto, los aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina a menudo se pueden sustituir entre sí (aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas). De estas posibles sustituciones, se prefiere que la glicina y la alanina se usen para sustituir una por otra (ya que tienen cadenas laterales relativamente cortas) y que la valina, la leucina y la isoleucina se usen para sustituir una por otra (ya que tienen cadenas laterales alifáticas más grandes que son hidrófobas). Otros aminoácidos que a menudo pueden sustituirse entre sí incluyen: fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas); lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas); aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas); asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales de amida); y cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

Las sustituciones de esta naturaleza a menudo se denominan sustituciones de aminoácidos “conservativas” o “semiconservativas”.

5 La presente invención por lo tanto se extiende al uso de un anticuerpo específico o fragmento del mismo que se une a la anexina-1 (Anx-A1) que tiene la secuencia polipeptídica mostrada en la Figura 2A, o a una variante de la misma que tiene la secuencia polipeptídica mostrada en la Figura 2B o Figura 2C, o a un fragmento del mismo que tiene la secuencia polipeptídica mostrada en la Figura 1C o la Figura 2D pero con una o más sustituciones conservativas en cualquiera de las secuencias respectivas.

10 La presente invención también se extiende al uso de un anticuerpo específico o fragmento del mismo que comprende CDR que tienen las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente pero con una o más sustituciones conservativas en las CDR, de forma que las secuencias de aminoácidos de las CDR tienen al menos 70 % de identidad con las descritas anteriormente. Por ejemplo, cada CDR puede tener 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones conservativas (dependiendo de la CDR) en comparación con las secuencias de aminoácidos de las CDR expuestas anteriormente. Por ejemplo, puede haber 1, 2 o 3 sustituciones conservativas en la secuencia de aminoácidos de VLCDR1 expuesta anteriormente, 1 o 2 sustituciones conservativas en la secuencia de aminoácidos de VLCDR2 expuesta anteriormente, 1 o 2 sustituciones conservativas en la secuencia de aminoácidos de VLCDR3 expuesta anteriormente, 1, 2 o 3 sustituciones conservativas en la secuencia de aminoácidos de VHCDR1 expuesta anteriormente, 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones conservativas en la secuencia de aminoácidos de VHCDR2 expuesta anteriormente y 1, 2 o 3 sustituciones conservativas en la secuencia de aminoácidos de VHCDR3 expuesta anteriormente, y la secuencia aún conservará al menos un 70 % de identidad con las secuencias de CDR expuestas anteriormente.

25 Usando los códigos de tres letras y una letra, los aminoácidos se pueden denominar de la siguiente manera: glicina (G o Gly), alanina (A o Ala), valina (V o Val), leucina (L o Leu), isoleucina (I o Ile), prolina (P o Pro), fenilalanina (F o Phe), tirosina (Y o Tyr), triptófano (W o Trp), lisina (K o Lys), arginina (R o Arg), histidina (H o His), ácido aspártico (D o Asp), ácido glutámico (E o Glu), asparagina (N o Asn), glutamina (Q o Gln), cisteína (C o Cys), metionina (M o Met), serina (S o Ser) y treonina (T o Thr). Cuando un resto puede ser ácido aspártico o asparagina, pueden usarse los símbolos Asx o B. Cuando un resto puede ser ácido glutámico o glutamina, se pueden usar los símbolos Glx o Z.
30 Las referencias al ácido aspártico incluyen aspartato y al ácido glutámico incluyen glutamato, a menos que el contexto especifique lo contrario.

35 Las deleciones o inserciones de aminoácidos también se pueden hacer con respecto a la secuencia de aminoácidos para la proteína, tal como una proteína de fusión, a la que se hace referencia anteriormente. Por lo tanto, por ejemplo, los aminoácidos que no tienen un efecto sustancial sobre la actividad del polipéptido, o al menos que no eliminan tal actividad, pueden eliminarse. Dichas deleciones pueden ser ventajosas ya que la longitud global y el peso molecular de un polipéptido se pueden reducir manteniendo la actividad. Esto puede permitir que se reduzca la cantidad de polipéptido requerida para un propósito particular; por ejemplo, se pueden reducir los niveles de dosificación.

40 Las inserciones de aminoácidos relativas a la secuencia de la proteína de fusión anterior también pueden realizarse. Esto se puede hacer para alterar las propiedades de una sustancia de la presente invención (por ejemplo, para ayudar en la identificación, purificación o expresión).

45 Los cambios de aminoácidos con respecto a la secuencia dada anteriormente se pueden hacer usando cualquier técnica adecuada, p.ej., mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio o síntesis en estado sólido.

50 Hay que señalar que las sustituciones o inserciones de aminoácidos dentro del alcance de la presente invención se pueden hacer usando aminoácidos naturales o que no existen en la naturaleza. Independientemente de si se usan o no aminoácidos naturales o sintéticos, se prefiere que solo estén presentes L-aminoácidos.

55 “Identidad”, como sabrá un experto en la materia, es la relación entre dos o más secuencias de polinucleótidos o dos o más secuencias de polipéptidos, según se determina comparando las secuencias, generalmente a lo largo de toda su longitud. En la técnica, la identidad también significa el grado de relación de secuencia entre las secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas, según sea el caso, tal como se determina mediante la coincidencia entre cadenas de tales secuencias. Si bien existen una serie de métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, los métodos comúnmente empleados para determinar la identidad se codifican en programas informáticos.

60 Los enfoques computacionales para la alineación de secuencias generalmente se dividen en dos categorías: alineaciones globales y alineaciones locales. Una alineación global intenta alinear cada resto en cada secuencia y, por lo tanto, obliga a la alineación a abarcar toda la longitud de todas las secuencias de consulta. Las alineaciones globales son más útiles cuando las secuencias en el conjunto de consultas son similares y de tamaño aproximadamente igual. Una técnica general de alineación global es el algoritmo Needleman-Wunsch, que se basa en la programación dinámica. Por el contrario, las alineaciones locales identifican regiones de similitud dentro de secuencias largas que pueden ser ampliamente divergentes en general. Las alineaciones locales a menudo son

preferibles, pero pueden ser más difíciles de calcular debido a la dificultad adicional de identificar las regiones de similitud. Las alineaciones locales son más útiles para secuencias diferentes que se sospecha que contienen regiones de similitud o motivos de secuencia similares dentro de una secuencia más grande. El algoritmo de Smith-Waterman es un método de alineación local general y también se basa en la programación dinámica. Con secuencias suficientemente similares, no hay diferencia entre las alineaciones locales y globales. Los métodos híbridos, conocidos como semiglobal o "glocal" (abreviatura de global-local), intentan encontrar la mejor alineación posible que incluya el inicio y el final de una u otra secuencia. Esto puede ser especialmente útil cuando la parte descendente de una secuencia se solapa con la parte ascendente de la otra secuencia.

Los programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no están limitados a, BLAST (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215, 403 (1990), disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), incluyendo BLASTp (para proteínas), BLASTn y BLASTx (para nucleótidos), Gapped BLAST y PSI-BLAST (para proteínas, Altschul et al., *Nucleic Acids Research* 25 (17): 3389-402, 1997), FASTA (disponible en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/>), ClustalW/ClustalX (Thompson et al., *Nucleic Acids Research* 22 (22): 4673 - 4680 (1994)), la última versión es 2.1) y el paquete del programa GCG (Devereux et al., *Nucleic Acids Research*, 12, 387 (1984)).

El programa Clustal puede usarse para comparar secuencias de nucleótidos y aminoácidos. Este programa compara secuencias y encuentra la alineación óptima al insertar huecos en cualquier secuencia, según corresponda. Es posible calcular la identidad o similitud de aminoácidos (identidad más conservación del tipo de aminoácido) para una alineación óptima. Un programa como BLASTx alineará el tramo más largo de secuencias similares y asignará un valor al ajuste. De este modo, es posible obtener una comparación donde se encuentran varias regiones de similitud, cada una con una puntuación diferente. Ambos tipos de análisis de identidad se contemplan en la presente invención.

El porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos puede determinarse alineando las secuencias con el fin de obtener una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en la primera secuencia para una mejor alineación con la secuencia) y comparar los restos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones correspondientes. La "mejor alineación" es una alineación de dos secuencias que da como resultado el mayor porcentaje de identidad. El porcentaje de identidad se determina por el número de restos de aminoácidos o nucleótidos idénticos en las secuencias que se comparan (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100).

Como se describió anteriormente, la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático conocido por los expertos en la materia. Un ejemplo de un algoritmo matemático para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877. Los programas BLASTn y BLASTx de Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 han incorporado tal algoritmo. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa BLASTn, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteína BLAST se pueden realizar con el programa BLASTp, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, Gapped BLAST se puede utilizar como se describe en Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. Como alternativa, PSI-Blast puede usarse para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden usar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, BLASTx y BLASTn). Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Otro ejemplo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). El programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineación de secuencias CGC tiene incorporado dicho algoritmo. Otros algoritmos para el análisis de secuencias conocidos en la técnica incluyen ADVANCE y ADAM como se describe en Torellis y Robotti (1994) *Comput. Appl. Biosci.*, 10:3-5; y FASTA descrito en Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 2444-8. Dentro de FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y la velocidad de la búsqueda.

Como se define en la presente memoria, las variantes de una proteína, polipéptido o péptido particular descritos en la presente memoria deben conservar la función de la proteína, polipéptido o péptido original. Como alternativa o además de retener la función de la proteína, polipéptido o péptido original, las variantes de las proteínas, polipéptidos o péptidos generalmente comparten al menos un 70 % de identidad de secuencia con las proteínas, polipéptidos o péptidos descritos en la presente memoria.

La presente invención por lo tanto se extiende al uso de un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad, usando los parámetros por defecto del programa informático BLAST (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990)) proporcionado por HGMP (Proyecto de Cartografía del Genoma Humano), a nivel de aminoácidos, a la secuencia polipeptídica mostrada en la Figura 2A, o a una variante de la misma que tiene la secuencia polipeptídica mostrada en la Figura 2B o Figura 2C, o a un fragmento de la misma que tiene la secuencia polipeptídica mostrada en la Figura 1C o en la Figura 2D. Más generalmente, la molécula de unión específica se une a una secuencia que tiene al menos 75 %, 80 %, 82 %, 83 %, 85 %, 90 %, 91

%, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos 99 % de identidad, a nivel de aminoácidos, con cualquiera de las secuencias mostradas en las Figuras 2A, 2B, 2C, 2D o 1C.

5 Generalmente, la secuencia de aminoácidos de las CDR de la molécula de unión específica usada en la invención tiene al menos 70 % de identidad, usando los parámetros por defecto del programa informático BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)) proporcionado por HGMP (Proyecto de Cartografía del Genoma Humano), a nivel de aminoácidos, a las secuencias de aminoácidos de las CDR descritas anteriormente. Más generalmente, la secuencia de CDR tiene al menos 75 %, 80 %, 82 %, 83 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos un 99 % de identidad, a nivel de aminoácido, con las secuencias mostradas anteriormente.

10 Generalmente, cada una de las secuencias de CDR de la molécula de unión específica usada en la invención tiene este nivel de identidad con las secuencias de aminoácidos de las CDR expuestas anteriormente. Como alternativa, cualquier 1, 2, 3 4 o 5 de las CDR de la molécula de unión específica usada en la invención tiene este nivel de identidad con las secuencias de aminoácidos de las CDR expuestas anteriormente.

15 La molécula de unión específica usada en la invención es generalmente un anticuerpo, más generalmente un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo monoclonal usado en la presente invención es humanizado.

20 El anticuerpo monoclonal usado en la presente invención se puede humanizar modificando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Los métodos para reducir la inmunogenicidad de las moléculas de unión específica de la invención incluyen el injerto de CDR en un andamio de armazón de anticuerpo adecuado o la remodelación de los restos de superficie variable, p.ej., mediante mutagénesis dirigida al sitio u otras técnicas de biología molecular comúnmente utilizadas (Roguska et al. Protein Eng. 9 895-904 (1996)).

25 Otros métodos aplicables pueden incluir la identificación de posibles epítopos de linfocitos T dentro de la molécula, y la subsiguiente eliminación de estos, por ej., por mutagénesis dirigida al sitio (desinmunización). La humanización de la molécula de unión específica puede desearse cuando la molécula se va a utilizar como agente terapéutico. La humanización de las regiones CDR o de la secuencia flanqueante circundante puede llevarse a cabo según se desee.

30

Es posible usar anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que conservan la especificidad del anticuerpo original. Tales técnicas pueden implicar la introducción de ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina, o las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un anticuerpo en las regiones constantes, o regiones constantes más regiones marco, de una inmunoglobulina diferente. Ver, por ejemplo, EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400, Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo puede estar sujeto a mutación genética u otros cambios, que pueden o no alterar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

35

40 Como los anticuerpos pueden modificarse de varias maneras, el término "anticuerpo" debe interpretarse como que cubre cualquier miembro de unión específica o sustancia que tiene un dominio de unión con la especificidad requerida. Por lo tanto, este término abarca fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, anticuerpos humanizados, que incluyen cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión a inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por lo tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o equivalente, fusionadas a otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023. Un anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo modificado que tiene las regiones variables de un anticuerpo no humano, p. ej., murino, y la región constante de un anticuerpo humano. Los métodos para fabricar anticuerpos humanizados se describen en, por ejemplo, la patente US-5225539.

45

50 La molécula de unión específica usada en la invención puede ser un fragmento de un anticuerpo. Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unión a antígenos. Ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_H1 ; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_H1 ; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al., Nature 341: 544-546 (1989)) que consiste en un dominio V_H ; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vii) moléculas Fv monocatenarias (scFv), donde un dominio V_H y un dominio V_L están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird et al., Science 242: 423-426 (1988)); Huston et al., PNAS USA 85:5879-5883 (1988)); (viii) dímeros de Fv de cadena única biespecíficos (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multispecíficos construidos por fusión génica (WO94/13804; PAG. Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444- 6448 (1993)). Generalmente, el fragmento es un Fab, $F(ab')_2$ o fragmento Fv o una molécula scFv.

55

60

Los diacuerpos son multímeros de polipéptidos, comprendiendo cada polipéptido un primer dominio que comprende una región de unión de una cadena ligera de inmunoglobulina y un segundo dominio que comprende una región de unión de una cadena pesada de inmunoglobulina, estando unidos los dos dominios (por ejemplo, mediante un conector peptídico) pero no asociados entre sí para formar un sitio de unión a antígeno: los sitios de unión a

65

antígeno se forman mediante la asociación del primer dominio de un polipéptido dentro del multímero con el segundo dominio de otro polipéptido dentro del multímero (WO94/13804).

5 Cuando se van a usar anticuerpos biespecíficos, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que se pueden fabricar de varias maneras (Hollinger & Winter, *Current Opinion Biotechnol.* 4: 446-449 (1993)), p.ej., preparado químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o puede ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpos biespecíficos mencionados anteriormente. Puede ser preferible usar dímeros de scFv o diacuerpos en lugar de anticuerpos completos. Los diacuerpos y scFv se pueden construir sin una región Fc, usando solo dominios variables, reduciendo potencialmente los efectos de la reacción antiidiotípica. Otras formas de anticuerpos biespecíficos incluyen la cadena única "Janusins" descrita en Traunecker et al., *EMBO Journal* 10: 3655-3659 (1991).

15 Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos enteros biespecíficos, también pueden ser útiles porque pueden construirse y expresarse fácilmente en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpos) con especificidades de unión apropiadas pueden seleccionarse fácilmente usando presentación en fagos (WO94/13804) de las bibliotecas. Si un brazo del diacuerpo debe mantenerse constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra el antígeno X, entonces se puede hacer una biblioteca donde se varíe el otro brazo y se seleccione un anticuerpo de especificidad apropiada.

20 Las Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR) VLCDR1, VLCDR2, VLCDR3, VHCDR1, VHCDR2 y VHCDR3 expuestas anteriormente son las del anticuerpo monoclonal VJ-4B6 producido por los presentes inventores. El anticuerpo monoclonal VJ-4B6 se describe y reivindica en la solicitud de patente internacional N.º PCT/GB2011/000876, publicada como WO 2011/154705 y que se incorpora aquí en su totalidad por referencia.

25 El anticuerpo monoclonal VJ-4B6 se produjo mediante un método descrito en la Figura 3A y en el Ejemplo 1 de la presente memoria. Brevemente, el ADNc que codifica la Anx-A1 humana de longitud completa que tiene la secuencia mostrada en la Figura 2A se clonó en un vector de expresión y se confirmó la expresión en la superficie celular. Varias aplicaciones intradérmicas del ADN del vector adsorbido a partículas de oro se administraron luego a los ratones. Las células de ratón absorbieron el vector de inmunización y expresaron la proteína codificada por el ADNc, estimulando una respuesta inmunitaria. Los linfocitos de ratón se fusionaron luego con células de mieloma murino para producir hibridomas. A continuación se llevó a cabo la prueba de especificidad, se clonaron los hibridomas y se produjo el anticuerpo monoclonal.

35 El anticuerpo monoclonal VJ-4B6 es secretado por la línea celular de hibridoma VJ-4B6-E5-B10-D4 depositada el 3 de junio de 2010 en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), Agencia de Protección de la Salud, Centro de Preparación y Respuesta ante Emergencias, Porton Down, Salisbury, SP4 0JG, Reino Unido, en virtud del Tratado de Budapest, y designado por el número de acceso N.º 10060301.

40 El depósito fue realizado por Fulvio D'Acquisto, Queen Mary y Westfield College, Centro de Farmacología Bioquímica, Charterhouse Square, Londres EC1M 6BQ. El depositante ha autorizado al solicitante a referirse al material depositado en la solicitud y ha dado su consentimiento sin reservas e irrevocable para que el material depositado se ponga a disposición del público de acuerdo con la Regla 31 (1)(d) del Convenio de la Patente Europea.

45 La línea celular de hibridoma VJ-4B6-E5-B10-D4 produce el anticuerpo monoclonal VJ-4B6 que se une específicamente a la anexina-A1. El anticuerpo monoclonal VJ-4B6 es del isotipo IgG2b.

50 El anticuerpo VJ-4B6 se generó contra la proteína Anx-A1 humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2A.

55 El ADN y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo VJ-4B6 se muestran en la Figura 4. La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de VJ-4B6 con las CDR anotadas. La Figura 5 también muestra los primeros pocos aminoácidos de la región constante de la cadena ligera de VJ-4B6.

60 El ADN y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo VJ-4B6 se muestran en la Figura 6. La Figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de VJ-4B6 con las CDR anotadas. La Figura 7 también muestra los primeros pocos aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de VJ-4B6.

Las CDR del anticuerpo VJ-4B6 son las siguientes:

65 VLCDR1 es KASENVVTVS
VLCDR2 es GASNRYT
VLCDR3 es GQGYSYPYT
VHCDR1 es GYTFTNYWIG

VHCDR2 es DIYPGGDYTNNEKFKG
 VHCDR3 es WGLGYFFDY

- 5 La presente invención se extiende al uso de anticuerpos específicos o fragmentos de los mismos que tienen las CDR del anticuerpo VJ-4B6, como se describe en la presente memoria, y también al uso de moléculas de unión específicas que tienen CDR con al menos 70 % de identidad, preferiblemente al menos 75 % , 80 %, 82 %, 83 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos 99 % de identidad, a una o más de las CDR del anticuerpo VJ-4B6, como se describe en la presente memoria.
- 10 La presente invención también se extiende al uso de anticuerpos específicos o fragmentos de los mismos que tienen la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada o tanto la región variable de la cadena ligera como la región variable de la cadena pesada del anticuerpo VJ-4B6 y a las variantes y fragmentos de la región variable de la cadena ligera y/o la región variable de la cadena pesada de la misma, como se describe en la presente memoria.
- 15 En una realización específica, la presente invención proporciona por lo tanto un anticuerpo específico o fragmento del mismo para usar de acuerdo con el primer aspecto de la invención que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 4 y/o Figura 6 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 82 %, 83 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos 99 % de identidad con cualquiera de los dos.
- 20 Esta realización de la invención también se extiende al uso de ciertos fragmentos de anticuerpos que contienen la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 4 y/o la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 6 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 82 %, 83 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos 99 % de identidad con cualquiera de estos fragmentos. Por ejemplo, esta realización se extiende al uso de fragmentos Fab, F(ab')₂ o Fv y moléculas scFv que contienen las regiones variables de la cadena ligera y/o pesada que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en la Figura 4 y/o Figura 6 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 82 %, 83 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos 99 % de identidad con cualquiera de las dos.
- 25 En una realización específica, la presente invención proporciona un anticuerpo específico o fragmento del mismo para usar de acuerdo con el primer aspecto de la invención que está codificado por un polinucleótido que tiene una secuencia como se muestra en la Figura 4 y/o la Figura 6 o una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 82 %, 83 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos 99 % de identidad con cualquiera de las dos.
- 30 La presente invención también abarca el uso de anticuerpos específicos o fragmentos de los mismos de acuerdo con el primer aspecto de la invención que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 5 y/o la Figura 7 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % , 80 %, 82 %, 83 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos 99 % de identidad con cualquiera de las dos.
- 35 En una realización específica, la presente invención proporciona un anticuerpo específico para su uso de acuerdo con el primer aspecto de la invención producido por la línea celular de hibridoma depositada en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) el 3 de junio de 2010 como N° de Acceso 10060301.
- 40 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo específico o fragmento del mismo como se define en relación con el primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo (TOC) o una enfermedad relacionada con el TOC.
- 45 La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con este aspecto de la invención puede formularse para su uso por cualquier ruta conveniente. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con este aspecto de la invención incluirá normalmente un vehículo, excipiente, diluyente, adyuvante, vehículo, tampón o estabilizador farmacéuticamente aceptable además de una molécula de unión específica como se define en relación con el primer aspecto de la invención. Dichos vehículos incluyen, pero no se limitan a, solución salina, solución salina tamponada tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS), dextrosa, liposomas, agua, glicerol, polietilenglicol, etanol y combinaciones de los mismos. Esta composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada dependiendo del método deseado de administración a un paciente.
- 50 Se puede proporcionar en forma de dosificación unitaria, generalmente se proporcionará en un recipiente sellado y se puede proporcionar como parte de un kit. Tal kit normalmente (aunque no necesariamente) incluye instrucciones de uso. Puede incluir una pluralidad de dichas formas de dosificación unitarias.
- 55 La composición farmacéutica puede adaptarse para administración por cualquier ruta apropiada, por ejemplo, por vía oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o
- 60
- 65

parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal o intradérmica), aunque generalmente se adaptará para la administración oral. Tales composiciones se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica de la farmacia, por ejemplo, mezclando el principio activo con el vehículo o vehículos o excipiente o excipientes en condiciones estériles.

5 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas o comprimidos; como polvos o gránulos; como soluciones, jarabes o suspensiones (en líquidos acuosos o no acuosos, o como espumas o batidos comestibles, o como emulsiones). Los excipientes adecuados para comprimidos o cápsulas de gelatina dura incluyen lactosa, almidón de maíz o sus derivados, ácido esteárico o sales de los mismos. Los excipientes adecuados para su uso con cápsulas de gelatina blanda incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos o líquidos, etc. Para la preparación de soluciones y jarabes, los excipientes que se pueden usar incluyen, por ejemplo, agua, polioles y azúcares. Para la preparación de suspensiones, se pueden usar aceites (por ejemplo, aceites vegetales) para proporcionar suspensiones de aceite en agua o agua en aceite.

15 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período prolongado de tiempo. Por ejemplo, el principio activo puede administrarse desde el parche por iontoforesis como se describe generalmente en *Pharmaceutical Research*, 3 (6):318 (1986).

20 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica se pueden formular como ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, aerosoles o aceites.

25 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración rectal se pueden presentar como supositorios o enemas.

30 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración nasal donde el vehículo es un sólido incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula por ejemplo en el intervalos de 20 a 500 micras que se administra de la misma manera en que se toma el tabaco, es decir, por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente del polvo sostenido cerca de la nariz. Las composiciones adecuadas donde el vehículo es un líquido, para la administración como una pulverización nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del principio activo.

35 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración por inhalación incluyen polvos o nieblas de partículas finas que pueden generarse por medio de varios tipos de aerosoles, nebulizadores o insufladores presurizados a dosis medidas.

40 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización.

45 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen solución para inyectable estéril acuosa y no acuosa que puede contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea sustancialmente isotónica con la sangre del receptor deseado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Los excipientes que se pueden usar para soluciones inyectables incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Las composiciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en un estado liofilizado (liofilizado) que requiere solo la adición del líquido estéril transportado, por ejemplo, agua para inyectables, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

50 Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes conservantes, solubilizantes, estabilizadores, humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, aromatizantes, sales, tampones, agentes de revestimiento o antioxidantes.

55 Las composiciones farmacéuticas para su uso en la invención también pueden contener uno o más agentes terapéuticamente activos adicionales además de la molécula de unión específica como se define en relación con el primer aspecto de la presente invención. En una realización, las composiciones farmacéuticas para su uso en la invención contienen uno o más fármacos antiinflamatorios o inmunomoduladores además de la molécula de unión específica como se define en relación con el primer aspecto de la invención. Los fármacos antiinflamatorios o inmunomoduladores incluyen (i) esteroides como glucocorticoides, por ejemplo, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, cortisona, hidrocortisona, betametasona, dexametasona y triamcinolona, (ii) fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) como la aspirina, ibuprofeno, celecoxib y naproxeno, y (iii) péptidos antiinflamatorios tales como derivados antiinflamatorios inmunoselectivos (ImSAID).

60

Las dosis del anticuerpo específico o fragmento del mismo y/o composición farmacéutica para su uso en la presente invención pueden variar entre amplios límites, dependiendo de la enfermedad o trastorno a tratar, la edad y el estado del individuo a tratar, etc. y el médico finalmente determinará las dosis apropiadas que se utilizarán.

5 Esta dosificación se puede repetir tantas veces como sea apropiado. Si se desarrollan efectos secundarios, la cantidad y/o frecuencia de la dosificación puede reducirse, de acuerdo con la práctica clínica habitual.

10 Para la administración a mamíferos, y particularmente humanos, se espera que la dosificación diaria del agente activo sea de 1 µg/kg a 10 mg/kg de peso corporal, generalmente de alrededor de 10 µg/kg a 1 mg/kg de peso corporal. En cualquier caso, el médico determinará la dosis real que será la más adecuada para un individuo que dependerá de factores que incluyen la edad, el peso, el sexo y la respuesta del individuo. Las dosificaciones anteriores son ilustrativas del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos en los que se necesiten dosis mayores o menores, y tales están dentro del alcance de esta invención.

15 Las moléculas de unión específica y/o las composiciones farmacéuticas como se definen en la presente memoria se usan en el tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo (TOC) o una enfermedad relacionada con el TOC.

20 La invención por lo tanto también se extiende al uso de un anticuerpo específico o fragmento del mismo como se define en relación con el primer aspecto de la invención o a una composición farmacéutica como se define en relación con el segundo aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo (TOC) o la ansiedad, o como alternativa al uso de un anticuerpo específico o fragmento del mismo como se define en relación con el primer aspecto de la invención o a una composición farmacéutica como se define en relación con el segundo aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo (TOC) o la ansiedad.

25 La divulgación también incluye un método para el tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo (TOC) o una enfermedad relacionada con el TOC en un sujeto, generalmente un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una molécula de unión específica como se define en relación con el primer aspecto de la invención o una composición farmacéutica como se define en relación con el segundo aspecto de la invención. El método de tratamiento puede ser de un ser humano o un animal y la invención se extiende igualmente a los usos en medicina humana y/o veterinaria. El anticuerpo específico o fragmento del mismo y/o la composición farmacéutica para su uso en la invención se administra preferiblemente a un individuo en una "cantidad terapéuticamente eficaz", que es suficiente para mostrar el beneficio al individuo y/o para mejorar, eliminar o prevenir uno o más síntomas del TOC o la ansiedad. Como se usa en la presente memoria, "tratamiento" incluye cualquier régimen que pueda beneficiar a un animal humano o no humano, preferiblemente un mamífero. El tratamiento puede ser con respecto a
35 una afección existente o puede ser profiláctico (tratamiento preventivo).

40 Por "una enfermedad relacionada con TOC", como se utiliza en la presente memoria en relación con todos los aspectos de la divulgación se entiende generalmente una o más de las siguientes enfermedades: tricotilomanía, dermatilomanía, síndrome de Tourette (TS), síndrome de Asperger, anorexia, bulimia, depresión, trastorno de pánico, ataques de pánico, trastorno bipolar, hipocondriasis, trastorno de estrés postraumático (TEPT), trastorno de ansiedad social, esquizofrenia, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) y trastorno dismórfico corporal (TDC). Las características preferidas para el segundo y posteriores aspectos de la invención son como para el primer aspecto *mutatis mutandis*.

45 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo específico o fragmento del mismo producido contra la proteína Anx-A1 humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2A para su uso en el tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo (TOC) o una enfermedad relacionada con el TOC. Un ejemplo de dicho anticuerpo específico es el anticuerpo monoclonal VJ-4B6 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) el 3 de junio de 2010 como
50 número de acceso 10060301.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo específico o fragmento del mismo que tiene las CDR del anticuerpo monoclonal VJ-4B6, que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

55 VLCDR1 es KASENVVTVYS
VLCDR2 es GASNRYT
VLCDR3 es GQGYSYPYT
VHCDR1 es GYTFTNYWIG
VHCDR2 es DIYPGGDYTNNEKFKG
60 VHCDR3 es WGLGYFFDY

para su uso en el tratamiento del TOC o la ansiedad.

65 En una realización específica, la presente invención proporciona un anticuerpo específico o fragmento del mismo que tiene las regiones V_L y/o V_H del anticuerpo monoclonal VJ-4B6, que se muestran en las Figuras 4 y 6, respectivamente, para su uso en el tratamiento del TOC. En una realización, el anticuerpo monoclonal VJ-4B6 se

diluye en solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de la administración. En una realización, el anticuerpo monoclonal VJ-4B6 se administra por vía intraperitoneal.

5 La presente invención se describirá ahora adicionalmente a modo de referencia a los siguientes ejemplos que se presentan solo con fines de ilustración. En los ejemplos, se hace referencia a una serie de figuras en las que:

10 La FIGURA 1A es un diagrama de cinta de la estructura de la anexina-1 que muestra las cuatro repeticiones de anexina y el dominio N-terminal. La Figura 1B es una representación esquemática de las repeticiones de la anexina y la localización de la secuencia bioactiva, el péptido anexina-1 Ac.2-26. La Figura 1C muestra la secuencia de aminoácidos del péptido Ac.2-26, que es un fragmento del péptido N-terminal acetilado de la Anx-A1.

15 La FIGURA 2A muestra (i) la secuencia de aminoácidos y (ii) la secuencia de nucleótidos de la anexina-1 (Anx-A1) humana, isoforma ANXA1-003. La Figura 2B muestra la secuencia de aminoácidos de la anexina 1 humana (Anx-A1), isoforma ANXA1-002. La Figura 2C muestra la secuencia de aminoácidos de la anexina 1 humana (Anx-A1), isoforma ANXA1-004. La Figura 2D muestra la secuencia de aminoácidos de la anexina 1 humana (Anx-A1), isoforma ANXA1-006.

20 La FIGURA 3 muestra la generación de VJ-4B6. (A) Representación esquemática de la estrategia utilizada para aislar y producir VJ-4B6. (B) El histograma muestra la tinción de las líneas celulares transfectadas establemente con el ADNc de la anexina-1 (línea verde, pico de la derecha) o un ADNc de control irrelevante (línea roja, pico de la izquierda) con VJ-4B6.

25 La FIGURA 4 muestra el ADN y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de VJ-4B6.

30 La FIGURA 5 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de VJ-4B6 con las CDR anotadas. CDR1, CDR2, CDR3 y el comienzo de la región constante están resaltados. Numeración y CDR según Kabat.

La FIGURA 6 muestra el ADN y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de VJ-4B6.

35 La FIGURA 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de VJ-4B6 con las CDR anotadas. CDR1, CDR2, CDR3 y el comienzo de la región constante están resaltados. Numeración y CDR según Kabat. En la cadena pesada, los restos 26 a 29 de la región variable, aunque no forman parte de la región hipervariable definida por Kabat, son parte del bucle CDR definido por Chothia (Chothia y Lesk, 1987). Las posiciones en las inserciones 52, 52a, 82, 82a, 82b, 82c, 100 y 100a, se indican como 52a, 82abc, 100a.

40 La FIGURA 8 muestra el efecto VJ-4B6 sobre la ansiedad. Ratones C57/BL6 macho (n = 6) (5-6 semanas de edad) recibieron una inyección i.p. de VJ-4B6 (100 ng/100 ml) o control de IgG2b (100 ng/100 ml). Seis días después, los ratones se sometieron a la prueba del laberinto elevado en cruz. El gráfico en A muestra el número de entradas en el brazo abierto (OA) o cerrado (CA) del laberinto, mientras que el gráfico en B muestra los resultados acumulativos (OA + CA) de la prueba. Número de entradas. *** P <0,001; ** P <0,005 frente a control de IgG

45 La FIGURA 9 muestra el efecto de VJ-4B6 en el comportamiento de evaluación de riesgos. Ratones C57/BL6 macho (n = 6) (5-6 semanas de edad) recibieron una inyección i.p. de VJ-4B6 (100 ng/100 ml) o IgG2b (100 ng/100 ml). Seis días después, los ratones se sometieron a la prueba del laberinto elevado en cruz. El gráfico en A muestra la latencia para: entrada en el brazo abierto (RE-OA), la postura de estiramiento (SAP), la exploración de orificios (HD) mientras que el gráfico en B muestra el número total de acontecimientos para cada actividad específica. *** P <0,001; ** P <0,005 frente al control de IgG

50 La FIGURA 10 muestra el efecto de VJ-4B6 en la interacción social. Ratones C57/BL6 macho (n = 6) (5-6 semanas de edad) recibieron una inyección i.p. de VJ-4B6 (100 ng/100 ml) o IgG2b (100 ng/100 ml). Seis días después, los ratones se sometieron a la prueba de interacción social en el laberinto en Y. El gráfico en A muestra la duración total de la interacción con un objeto, un ratón, así como el tiempo pasado en el centro del laberinto en Y o en posición neutra. El gráfico en B muestra el número total de acontecimientos para cada actividad específica. *** P <0,001; ** P <0,005 frente al control de IgG.

55 La FIGURA 11 muestra el efecto de VJ-4B6 sobre la depresión y la desesperación. Ratones C57/BL6 macho (n = 6) (5-6 semanas de edad) recibieron una inyección i.p. de VJ-4B6 (100 ng/100 ml) o IgG2b (100 ng/100 ml). Seis días después, los ratones se analizaron con la prueba de suspensión de la cola. El gráfico en A muestra el número de inmovilidad, mientras que el gráfico en B muestra el tiempo en segundos hasta el primer evento de escalada. *** P <0,001; ** P <0,005 frente al control de IgG

60

La FIGURA 12 muestra el efecto de VJ-4B6 sobre el comportamiento de excavación. Ratones C57/BL6 macho (n = 6) (5-6 semanas de edad) recibieron una inyección i.p. de VJ-4B6 (100 ng/100 ml) o IgG2b (100 ng/100 ml). Seis días más tarde, los ratones se sometieron a una prueba para determinar el comportamiento de excavación. El gráfico en A muestra el número de episodios mientras que el gráfico en B muestra el tiempo en segundos hasta el primer evento de excavación. ** P <0,005; * P <0,05 frente al control de IgG.

La FIGURA 13 muestra el efecto de VJ-4B6 sobre la actividad motora. Ratones C57/BL6 macho (n = 6) (5-6 semanas de edad) recibieron una inyección i.p. de VJ-4B6 (100 ng/100 ml) o IgG2b (100 ng (100 ml)). Seis días después, los ratones se sometieron a la prueba de rendimiento en Rotarod. El gráfico muestra la velocidad promedio de los ratones después del tratamiento.

Ejemplo 1 - Producción del anticuerpo VJ-4B6

Se generó un nuevo anticuerpo anti-AnxA1 mediante inmunización genética como se indica en el esquema de la Figura 3A (Genovac GmbH, Alemania). Se analizaron los sueros de varios ratones inmunizados y tres resultaron positivos para células que reconocen IgG transfectadas con el ADNc de AnxA1. Los esplenocitos de estos ratones se fusionaron con células de mieloma para generar células de hibridoma. Solamente uno de los tres clones de células de hibridoma se subclonó y expandió con éxito. Estas células de hibridoma se llaman VJ-4B6-E5-B10-D4. La fracción de IgG2b purificada de las células de hibridoma reconoce células transfectadas con ADNc de la AnxA1 (Figura 3B, línea verde, pico de la derecha) pero no transfectadas con un ADNc irrelevante (Figura 3B, línea roja, pico de la izquierda).

Ejemplo 2 - Secuenciación de VJ-4B6

El objetivo de este ejemplo fue clonar los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera del anticuerpo a partir de las células de hibridoma y determinar la secuencia de ADN y la ubicación de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y otras características.

Clonación y secuenciación de regiones variables de anticuerpos

El ARN total se preparó a partir de 1 vial de células de hibridoma usando el Qiagen RNeasy mini kit (N.º de catálogo: 74104). El ARN se eluyó en 50 µl de agua y se comprobó en un gel de agarosa al 1,2 %.

Se prepararon los ADNc de V_H y V_K (cadena ligera kappa variable) utilizando la transcriptasa inversa con cebadores de IgG y de la región constante kappa. Las primeras cadenas de ADNc se amplificaron por PCR usando un gran conjunto de cebadores de la secuencia señal. Los ADNc amplificados se purificaron en gel y se clonaron en el vector pGem® T Easy (Promega). Los clones de V_H y V_K obtenidos se cribaron para inserciones del tamaño esperado. La secuencia de ADN de los clones seleccionados se determinó en ambas direcciones mediante secuenciación de ADN automática. Las ubicaciones de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en las secuencias se determinaron con referencia a otras secuencias de anticuerpos (Kabat EA. et al., 1991).

Resultados

Cadena ligera de VJ-4B6

Se identificó una única secuencia de V_K . La secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos deducida para la V_K de VJ-4B6 se muestra en la Figura 4. La secuencia de proteínas deducida con las CDR anotadas se muestra en la Figura 5. Nueve clones (siete independientes) de dos etapas de amplificación separadas dieron una secuencia de la región V idéntica. La secuencia de V_K aberrante no productiva que surge del compañero de fusión del hibridoma también estuvo presente en varios clones y hubo un clon con una delección dentro de la secuencia.

Cadena pesada de VJ-4B6

Se identificó una sola secuencia de V_H . La secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos deducida para la V_H de VJ-4B6 se muestran en la Figura 6. Se encontró la misma secuencia de la región V en nueve clones independientes. Dos clones tenían un cambio de un solo par de bases, un clon tuvo una delección de un solo par de bases y un cambio de un solo par de bases, y un clon tuvo dos cambios de un solo par de bases. Cada uno de los cinco cambios de pares de bases únicos se produjo en un solo clon. Los cinco clones restantes tenían una secuencia idéntica. La secuencia de proteína deducida con las CDR anotadas se muestra en la Figura 7.

Referencias

Chothia C and Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J Mol Biol. 196: 901-17, 1987.

Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991.

Ejemplo 3 - Efectos de VJ-4B6 en el modelo de ratón de trastorno obsesivo compulsivo (TOC) *in vivo*

Los presentes inventores han desarrollado un modelo de ratón transgénico de trastorno obsesivo compulsivo en el que la Anx-A1 está sobreexpresada en linfocitos T. Este es el objeto de la solicitud de patente del Reino Unido en trámite con la presente N.º 1121561.3 que se presentó el mismo día que la presente solicitud.

Los ratones transgénicos que sobreexpresan Anx-A1 (Anx-A1^{tg}) en los linfocitos T se generaron insertando Anx-A1 etiquetada con FLAG en el extremo C terminal en el genoma del ratón utilizando un vector de casete VACD2 y la técnica de microinyección pronuclear. Brevemente, el gen de Anx-A1 murino se amplificó y se etiquetó con el epítipo FLAG y luego se clonó en el vector pcDNA3.1. La Anx-A1 FLAG se recuperó del vector pcDNA3.1 y luego se ligó en un vector VACD2 linealizado. La construcción VACD2 Anx-A1 FLAG se modificó y purificó a continuación, y luego se insertó en el genoma del ratón mediante inyección pronuclear. Estos ratones se usaron en el presente ejemplo de la siguiente manera.

Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de VJ-4B6 o IgG de control en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Seis días después, los ratones se analizaron como se detalla a continuación.

Figuras 8 y 9. Prueba del laberinto elevado en cruz

Antecedentes. La prueba de laberinto elevado en cruz es una de las pruebas más utilizadas para medir el comportamiento similar a la ansiedad. La prueba se basa en la aversión natural de los ratones por las áreas abiertas y elevadas, así como en su comportamiento exploratorio espontáneo natural en entornos novedosos. El aparato consiste en brazos abiertos y brazos cerrados, cruzados en el medio perpendicularmente entre sí, y un área central. Los ratones tienen acceso a todos los brazos y se les permite moverse libremente entre ellos. El número de entradas en los brazos abiertos y el tiempo pasado en los brazos abiertos se utilizan como índices de ansiedad inducida por el espacio abierto en ratones.

Prueba. Cada ratón se colocó en el cuadrado central del laberinto (5 cm × 5 cm), frente a uno de los brazos cerrados. El comportamiento del ratón se registró durante un período de prueba de 10 minutos. Se registró el número de entradas y el tiempo dedicado a brazos abiertos y cerrados. La adquisición de datos y el análisis se realizaron automáticamente utilizando el software Image EP.

Las posturas de estiramiento y las exploraciones de orificios se registraron como medidas de los comportamientos de evaluación de riesgos, que son medidas de ansiedad más sensibles en el laberinto elevado en el cruz que en tiempo en el brazo abierto (Rodgers, RJ, Cole, JC, *Physiol Behav* 53: 383-388 (1993); Rodgers RJ, Haller J, Holmes A, Halasz J, Walton TJ, Brain PF, *Physiology & Behavior* 68: 47-53 (1999)). Una postura de estiramiento era una postura en la que los ratones se estiraban hacia delante hasta alcanzar la longitud de su cuerpo completo sin mover las patas traseras y luego volvían a su posición original. Se consideraba una exploración de orificios cuando los ratones estiraban la cabeza y los hombros sobre el borde del laberinto y bajaban la vista al suelo.

Resultados. Las Figuras 8 y 9 muestran que los ratones tratados con VJ-4B6 son menos ansiosos independientemente del tipo de condición temerosa: siendo ésta muy temerosa (brazo abierto) o menos temerosa (brazo cerrado). También "disfrutaban de la vida" (aumento de las entradas en el brazo abierto) y son más curiosos/aventureros (aumento de las exploraciones de orificios) debido a la menor ansiedad.

Figura 10. Laberinto en Y

Antecedentes. El laberinto en Y es una prueba de comportamiento utilizada para evaluar la función de la memoria y la disposición de los roedores para explorar nuevos entornos. El laberinto en Y es particularmente útil para evaluar los efectos de los fármacos sobre la cognición. Como los ratones y las ratas generalmente prefieren explorar un nuevo brazo del laberinto en lugar de volver a uno que fue visitado previamente, los datos se analizan para determinar el número de entradas en los brazos sin repetición. Los animales normales (control) reflejarán una alta tasa de alternancia que indica que el animal puede recordar en qué brazo entró por última vez. El laberinto en Y también se puede usar para la prueba de interacción social para determinar si un ratón prefiere pasar tiempo con un objeto o ratón nuevo o conocido.

Prueba. El aparato de prueba utilizado es un laberinto en forma de Y con tres brazos idénticos en un ángulo de 120° entre sí. Los giros graduales del laberinto en Y disminuyen el tiempo de aprendizaje en comparación con los giros bruscos del laberinto en Y. El animal se coloca en el centro del laberinto en Y, y se registra el número total de entradas individuales en el brazo, así como la secuencia de entradas

Resultados. La Figura 10 muestra que el tratamiento con VJ-4B6 hace que los ratones sean "más inteligentes", ya que pasan menos tiempo con un objeto no animado mientras mantienen la misma atención a los estímulos

animados (otro ratón). También son más sociables y amigables ya que atraviesan menos el centro del laberinto en Y y, por lo tanto, pasan más tiempo en los brazos.

Figura 11. Prueba de suspensión por la cola.

5 Antecedentes. La prueba de suspensión por la cola (STS) se basa en la observación de que los roedores, después de los movimientos iniciales orientados al escape, desarrollan una postura inmóvil cuando se los coloca en una situación estresante ineludible. En el caso de la TST, la situación estresante implica el estrés hemodinámico de ser colgado de manera incontrolable por la cola. Si se administran tratamientos antidepresivos antes de la prueba, los sujetos activamente persistirán en comportamientos dirigidos al escape por periodos de tiempo más largos.

10 Prueba. El día de la prueba, los ratones se transfirieron a la sala de experimentación y se dejaron aclimatar durante 1 hora. Se utilizó un aparato de suspensión por la cola automatizado con un colgador de cola conectado a una celda de carga lineal de precisión. En total, 1 cm de la cola del ratón se insertó en el colgador de cola y se aseguró con cinta adhesiva no irritante. Los ratones permanecieron suspendidos por la cola, a una altura de 35 cm de la mesa, durante 6 minutos. Durante este tiempo, la celda de carga registró los movimientos del ratón y transmitió la información a un ordenador central, que luego registró la tasa de inmovilidad en el transcurso de la sesión y calculó la duración total de la inmovilidad. La disminución de los niveles de inmovilidad es altamente predictiva de la eficacia antidepresiva (Cryan et al., Neurosci Biobehav Rev 29 (4-5):571-625 (2005)).

15 Resultados. La administración de VJ-4B6 hace que los ratones se desesperen menos porque luchan más contra la situación estresante (suspensión de la cola) al ser más móviles (Figura 11A). Al mismo tiempo, son más pacientes, ya que les lleva más tiempo hasta que intentan luchar contra la situación estresante golpeándose la cola (Fig. 11B).

20 Figura 12. Prueba de enterramiento de canicas y comportamiento de excavación

25 Antecedentes. Estas pruebas miden el comportamiento relacionado con la ansiedad del ratón. En las últimas décadas, la supresión de la excavación y el enterramiento espontáneo de canicas por ratones se ha utilizado como un índice de acción de un fármaco ansiolítico, es decir, en las pruebas de enterramiento de canicas y excavación, la administración aguda de benzodiazepinas y diferentes clases de antidepresivos inhibe la excavación y el enterramiento de canicas.

30 Prueba. El día de la prueba, los ratones se transfirieron a la sala de experimentación y se dejaron aclimatar durante 1 hora. Cada ratón se colocó en una jaula de plástico (aproximadamente 20 x 30 cm) con quince canicas colocadas uniformemente espaciadas en 5 filas de 3 sobre una capa de 5 cm de lecho de serrín, ligeramente presionada hacia abajo para formar una superficie uniforme y plana. Las mediciones incluyeron la latencia para comenzar a cavar y el número de episodios de excavación individuales. La duración de la prueba fue de 15 min.

35 Resultados. Los resultados en la Figura 12A muestran que la administración de VJ-4B6 a ratones redujo el número de episodios en comparación con los animales tratados con IgG2b de control en la prueba de enterramiento de canicas, lo que sugiere un efecto ansiolítico del anticuerpo. De acuerdo con esta hipótesis, la latencia hasta el primer episodio (otro índice de comportamiento de la ansiedad) también fue significativamente mayor.

40 Figura 13. Rotarod.

45 Antecedentes. La prueba de rendimiento en Rotarod es una prueba de rendimiento basada en una barra giratoria a la que se aplica actividad motora forzada, generalmente por un roedor. El Rotarod acelerado, donde una barra o tambor giratorio funciona como una cinta ergométrica para el roedor colocado en la parte superior, se usa ampliamente para evaluar los efectos farmacológicos y genéticos en la coordinación motora en roedores.

50 Prueba. El día de la prueba, los ratones se transfirieron a la sala de experimentación y se dejaron aclimatar durante 1 hora. Cada ratón se colocó en una barra estacionaria que comienza a girar con un aumento suave de la velocidad de 5 rpm a 70 rpm durante 3 minutos. Se registró la velocidad requerida para saltar del Rotarod.

55 Resultados. Los resultados de estas pruebas muestran que los efectos mostrados en las pruebas anteriores no son inespecíficos o se deben a un deterioro general de la función cognitiva o motora ya que el tratamiento con VJ-4B6 no tiene ningún efecto en la prueba de Rotarod.

60 Resumen

Estos resultados muestran que los anticuerpos que se unen a la Anx-A1, tales como el anticuerpo VJ-4B6, son útiles en el tratamiento del TOC y trastornos relacionados tales como la depresión.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de unión específica que se une a la anexina-1 (Anx-A1) para su uso en el tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo (TOC) o la ansiedad, en la que la molécula de unión específica es un anticuerpo o fragmento del mismo.
2. Una molécula de unión específica para su uso según la reivindicación 1, en la que la molécula de unión específica se obtiene contra la proteína Anx-A1 humana que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2A.
- 10 3. Una molécula de unión específica para su uso según la reivindicación 1 o 2, en la que la molécula de unión específica es un anticuerpo o fragmento del mismo, que comprende las Regiones Determinantes de la complementariedad (CDR) VLCDR1, VLCDR2, VLCDR3, VHCDR1, VHCDR2 y VHCDR3, teniendo cada una las respectivas secuencias de aminoácidos indicadas a continuación, en las cuales
- 15 VLCDR1 es KASENVVTVYS
 VLCDR2 es GASNRYT
 VLCDR3 es GQGYSYPYT
 VHCDR1 es GYTFTNYWIG
 VHCDR2 es DIYPGGDYTYNEKFKG
 20 VHCDR3 es WGLGYFFDY
- o una secuencia de aminoácidos al menos 70 % idéntica con la misma.
- 25 4. Una molécula de unión específica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
5. Una molécula de unión específica para su uso según la reivindicación 4, en la que el anticuerpo monoclonal está humanizado.
- 30 6. Una molécula de unión específica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el fragmento es un fragmento Fab, F(ab')₂ o Fv o una molécula scFv.
- 35 7. Una molécula de unión específica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 6 que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 4 y/o la Figura 6 o una secuencia al menos 70 % idéntica a cualquiera de estas.
- 40 8. Una molécula de unión específica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 7 producida por la línea celular de hibridoma depositada en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) el 3 de junio de 2010 con el N.º de Registro 10060301.
9. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión específica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo (TOC) o la ansiedad.
- 45 10. Una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 9, que comprende adicionalmente otro agente terapéuticamente activo.

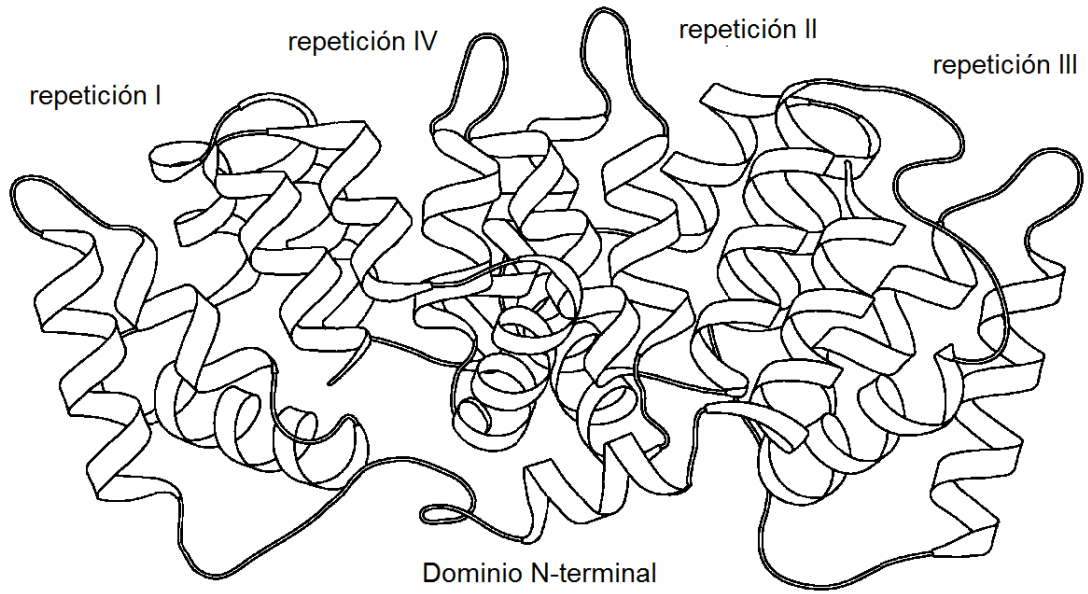


FIG. 1A

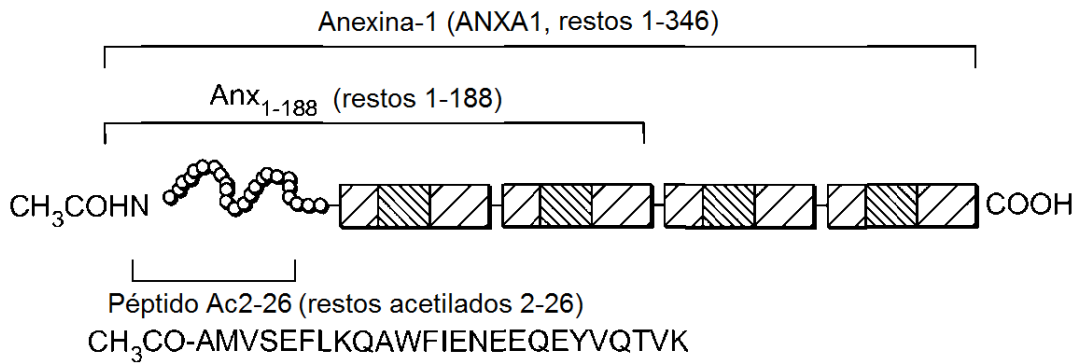


FIG. 1B



FIG. 1C

(i)

1	MAMVSEFLKQ	AWFIENEEQE	YVQTVKSSKG	GPGSAVSPYP
41	TFNPSSDVAA	LHKAIMVKGV	DEATIIDILT	KRNNAQRQQI
81	KAAYLQETGK	PLDETLKKAL	TGHLEEVVLA	LLKTPAQFDA
121	DELRAAMKGL	GTDEDTLIEI	LASRTNKEIR	DINRVYREEL
161	KRDLAKDITS	DTSGDFRNAL	LSLAKGDRSE	DFGVNEDLAD
201	SDARALYEAG	ERRKGTDVNV	FNTILTTRSY	PQLRRVFQKY
241	TKYSKHD MNK	VLDLELKGDI	EKCLTAIVKC	ATSKPAFFAE
281	KLHQAMKGVG	TRHKALIRIM	VSRSEIDMND	IKAFYQKMYG
321	ISLCQAILDE	TKGDYEKILV	ALCGGN	

(ii)

1	ATGGCAATGG	TATCAGAATT	CCTCAAGCAG	GCCTGGTTTA
41	TTGAAAATGA	AGAGCAGGAA	TATGTTCAAA	CTGTGAAGTC
81	ATCCAAAGGT	GGTCCCGGAT	CAGCGGTGAG	CCCCTATCCT
121	ACCTTCAATC	CATCCTCGGA	TGTCGCTGCC	TTGCATAAGG
161	CCATAATGGT	TAAAGGTGTG	GATGAAGCAA	CCATCATTGA
201	CATTCTAACT	AAGCGAAACA	ATGCACAGCG	TCAACAGATC
241	AAAGCAGCAT	ATCTCCAGGA	AACAGGAAAG	CCCCTGGATG
281	AAACACTGAA	GAAAGCCCTT	ACAGGTCACC	TTGAGGAGGT
321	TGTTTTGGCT	CTGCTAAAAA	CTCCAGCGCA	ATTTGATGCT
361	GATGAACTTC	GTGCTGCCAT	GAAGGGCCTT	GGAAGTATG
401	AAGATACTCT	AATTGAGATT	TTGGCATCAA	GAAC TAACAA
441	AGAAATCAGA	GACATTAACA	GGGTCTACAG	AGAGGAACTG
481	AAGAGAGATC	TGGCCAAAGA	CATAACCTCA	GACACATCTG
521	GAGATTTTCG	GAACGCTTTG	CTTTCTCTTG	CTAAGGGTGA
561	CCGATCTGAG	GACTTTGGTG	TGAATGAAGA	CTTGGCTGAT
601	TCAGATGCCA	GGGCCTTGTA	TGAAGCAGGA	GAAAGGAGAA
641	AGGGGACAGA	CGTAAACGTG	TTCAATACCA	TCCTTACCAC
681	CAGAAGCTAT	CCACAACCTC	GCAGAGTGT	TCAGAAATAC
721	ACCAAGTACA	GTAAGCATGA	CATGAACAAA	GTTCTGGACC
761	TGGAGTTGAA	AGGTGACATT	GAGAAATGCC	TCACAGCTAT
801	CGTGAAGTGC	GCCACAAGCA	AACCAGCTTT	CTTTGCAGAG
841	AAGCTTCATC	AAGCCATGAA	AGGTGTTGGA	ACTCGCCATA
881	AGGCATTGAT	CAGGATTATG	GTTTCCCGTT	CTGAAATTGA
921	CATGAATGAT	ATCAAAGCAT	TCTATCAGAA	GATGTATGGT
961	ATCTCCCTTT	GCCAAGCCAT	CCTGGATGAA	ACCAAAGGAG
1001	ATTATGAGAA	AATCCTGGTG	GCTCTTTGTG	GAGGAAACTA
1041	A			

FIG. 2A

1 MAMVSEFLKQ AWFIEENEEQE YVQTVKSSKG GPGSAVSPYP
41 TFNPSSDVAA LHKAIMVKGV DEATIIDILT KRNNNAQRQQI
81 KAAYLQETGK PLDETLKKAL TGHLEEVVLA LLKTPAQFDA
121 DELRAAMKGL GTDEDTLIEI LASRTNKEIR DINRVYREEL
161 KRDLAKDITS DTSGDFRNAL LSLAKGDRSE DFGVNEDLAD
201 SDARALYEAG ERRKGTDVNV FNTILTTRSY PQLRRVFQKY
241 TKYSKHD MNK VLDLELKGDI EKCLTAIVKC ATSKPAFFAE
281 KLHQAMKGVG TRHKALIRIM VSRSEIDMND IKAFYQKMYG
321 ISLCQAILDE TKGDYEKILV ALCGGN

FIG. 2B

1 MNLILRYTFS KMAMVSEFLK QAWFIEENEEQ EYVQTVKSSK
41 GPGSAVSPY PTFNPSSDVA ALHKAIMVKG VDEATIIDIL
81 TKRNNNAQRQQ IKAAYLQETG KPLDETLKKA LTGHLEEVVL
121 ALLKTPAQFD ADELRAAMKG LGTDEDTLIE ILASRTNKEI
161 RDINRVYREE LKRDLAKDIT SDTSGDFRNA LLSLAKGDRS
201 EDFG

FIG. 2C

1 MAMVSEFLKQ AWFIEENEEQE YVQTVKSSKG GPGSAVSPYP
41 TFNPSSDVAA LHKAIMVKGV DEATIIDILT KRNNNAQRQQI
81 KAAYLQETGK PLDETLKKAL TGHLEEVVLA LLKTP

FIG. 2D


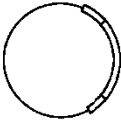
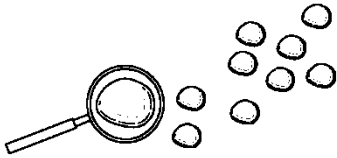

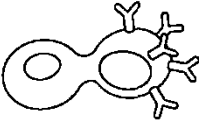
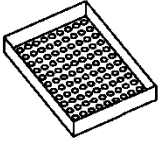
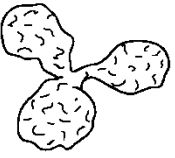
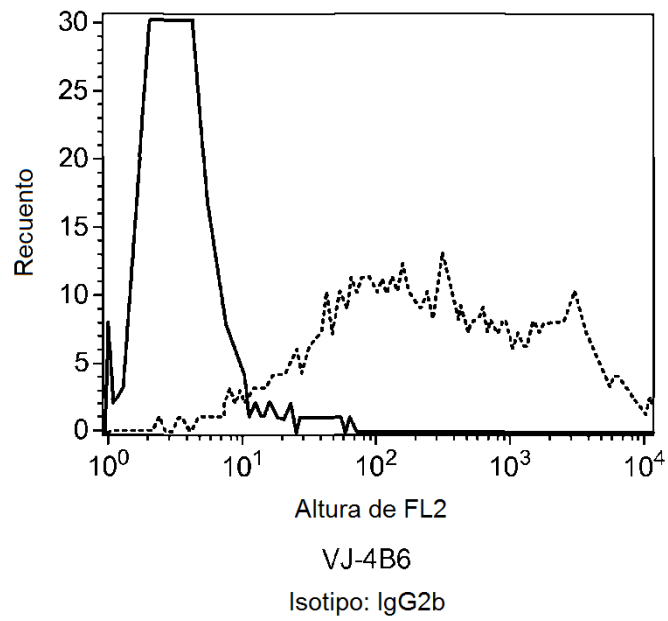
Producción de anticuerpos por inmunización genética - la vía directa del gen al anticuerpo		
✓		
✓		► Clonación del ADNc en un vector de expresión GENOVAC y confirmación de la expresión en la superficie celular
		► Varias aplicaciones intra-dérmicas del ADN vector absorbido en partículas de oro
		► Las células de ratón incorporan el vector de inmunización y expresan la proteína extraña codificada por el ADNc, estimulando una respuesta inmunitaria
		► Fusión de los linfocitos de ratón con células de mieloma murino para producir hibridomas
		► Prueba de especificidad, clonación de hibridomas y producción de anticuerpos monoclonales
		

FIG. 3A



Leyenda:

..... Sobrenadante del hibridoma en células transfectadas con pB1-Anexina1

———— Sobrenadante del hibridoma en células transfectadas con un ADN control irrelevante

FIG. 3B

ES 2 670 999 T3

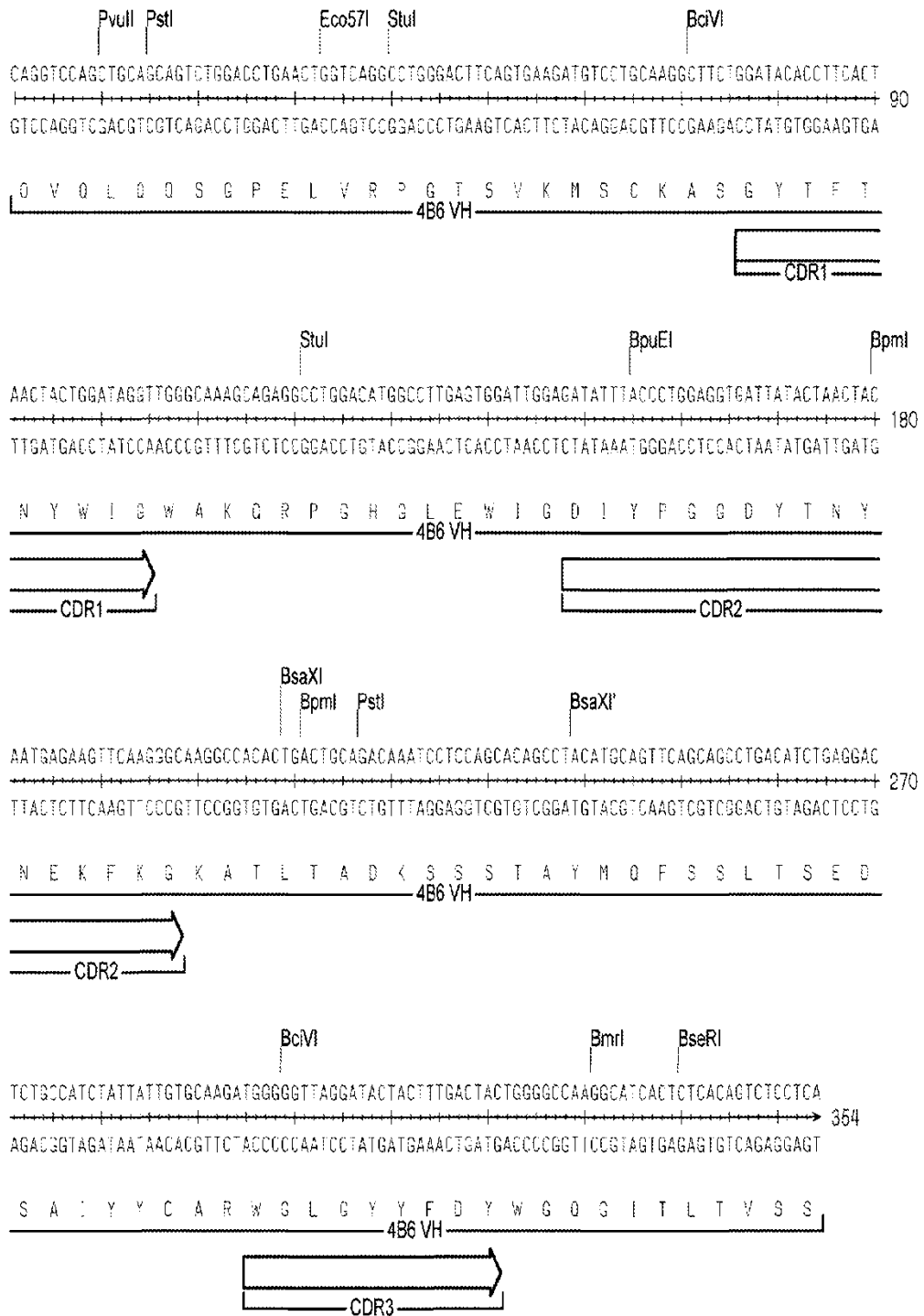


FIG. 6

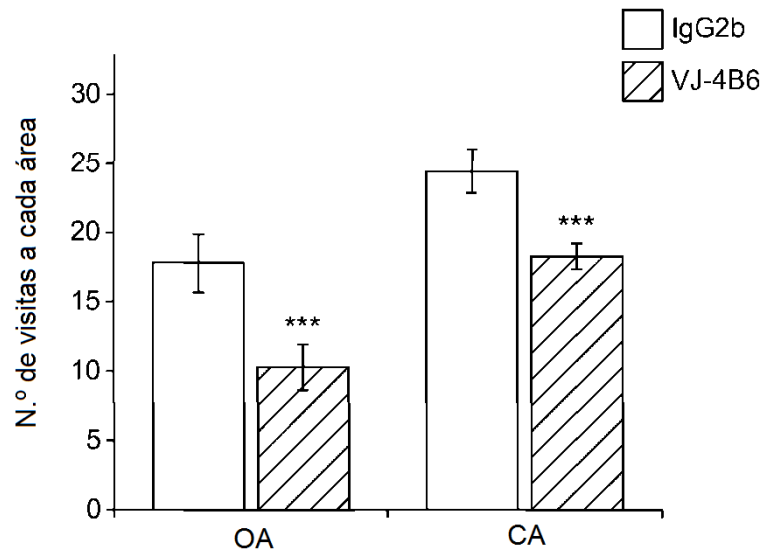


FIG. 8A

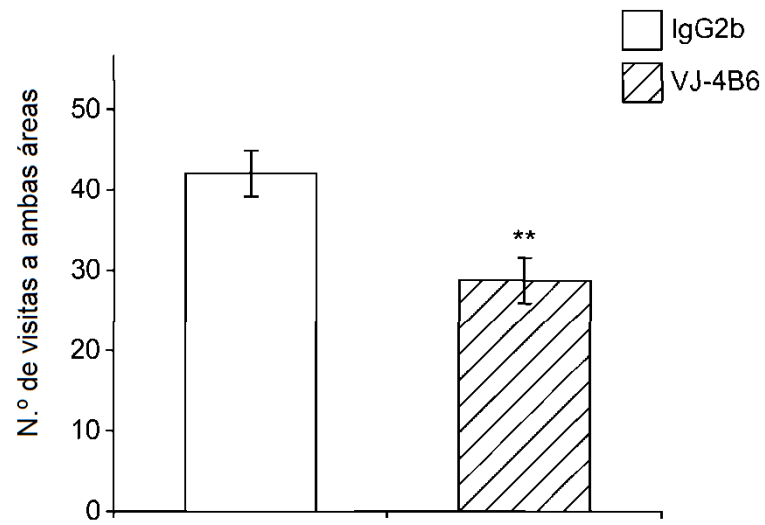


FIG. 8B

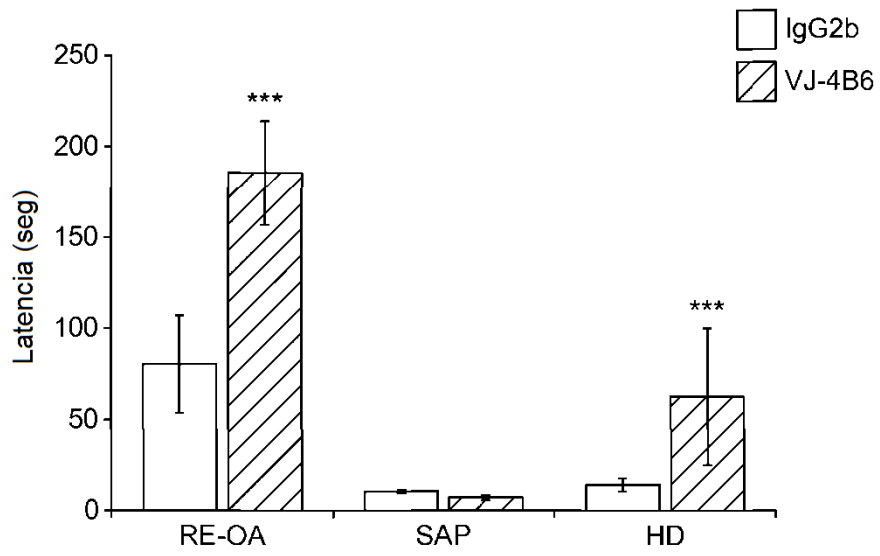


FIG. 9A

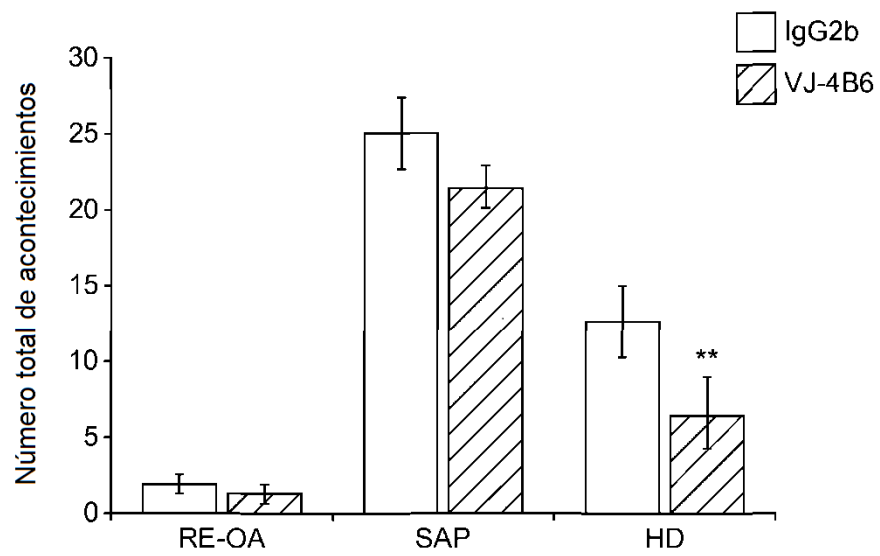


FIG. 9B

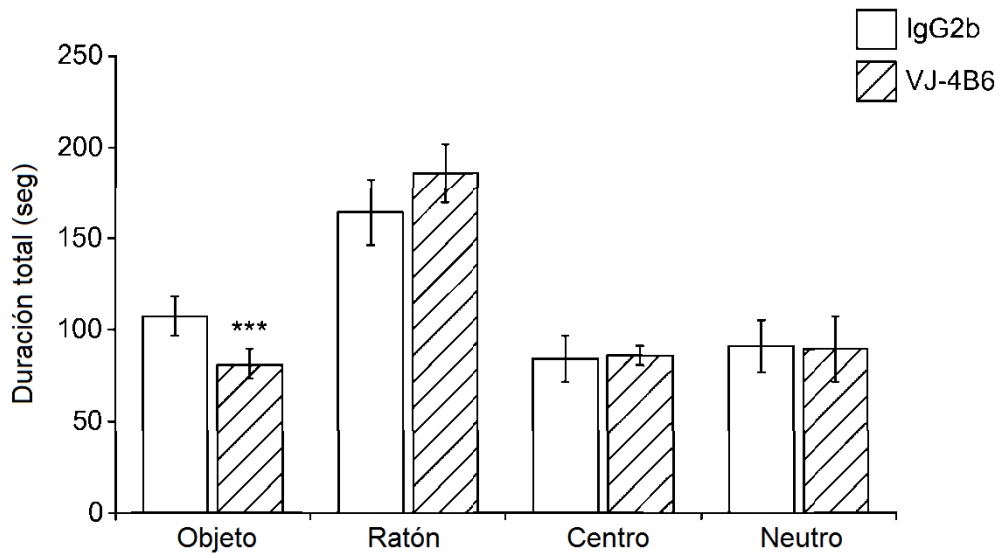


FIG. 10A

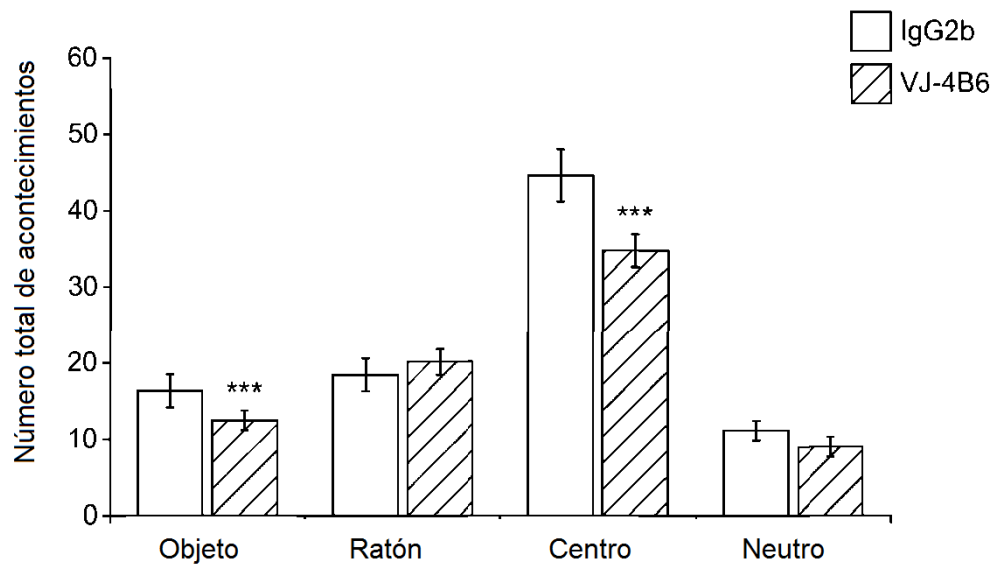


FIG. 10B

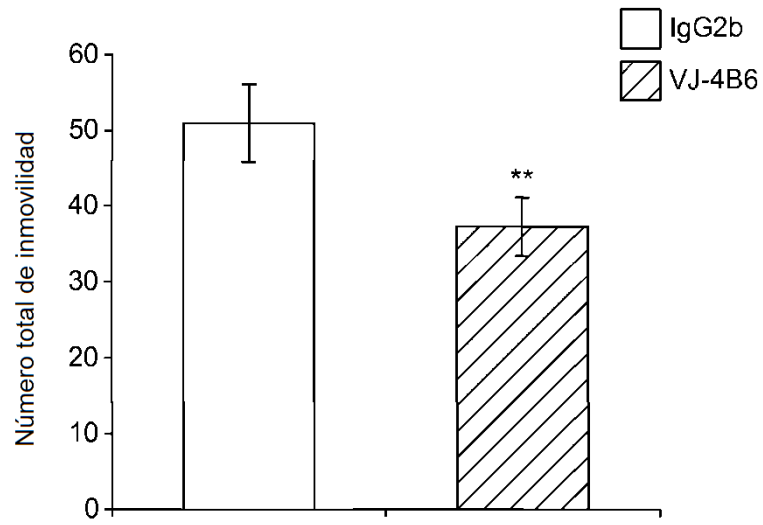


FIG. 11A

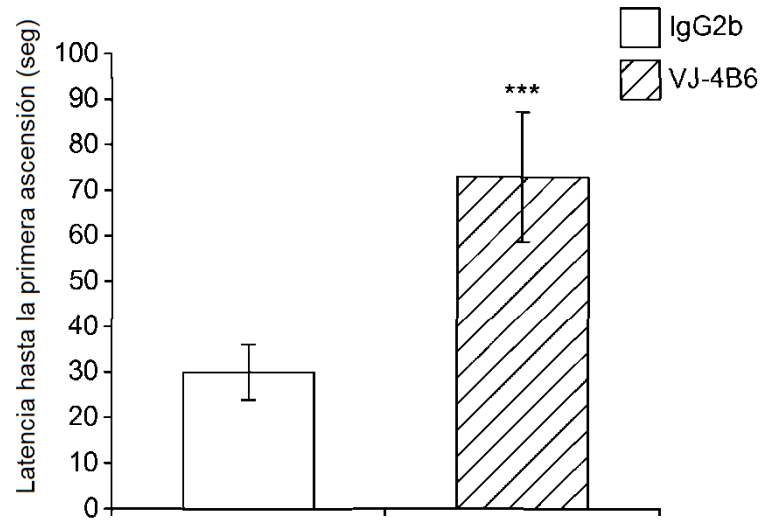


FIG. 11B

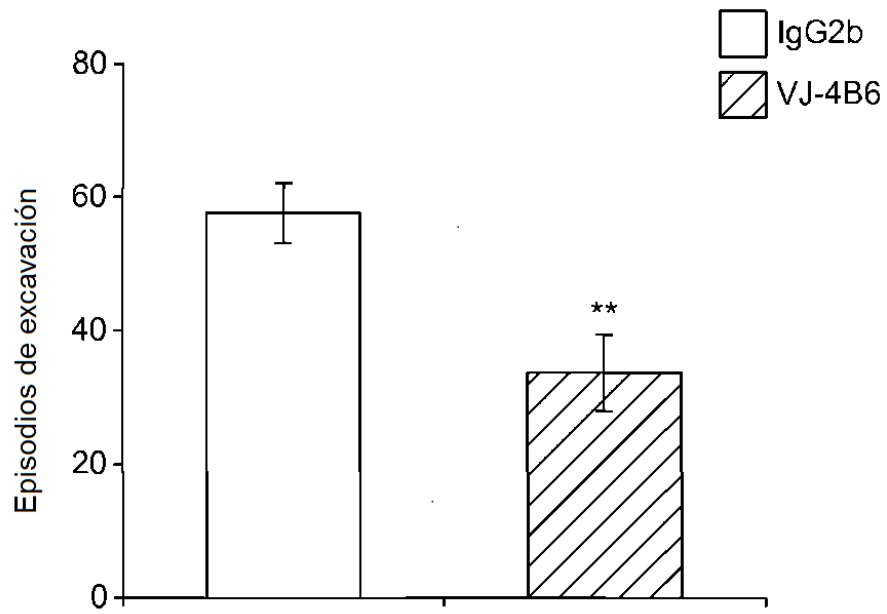


FIG. 12A

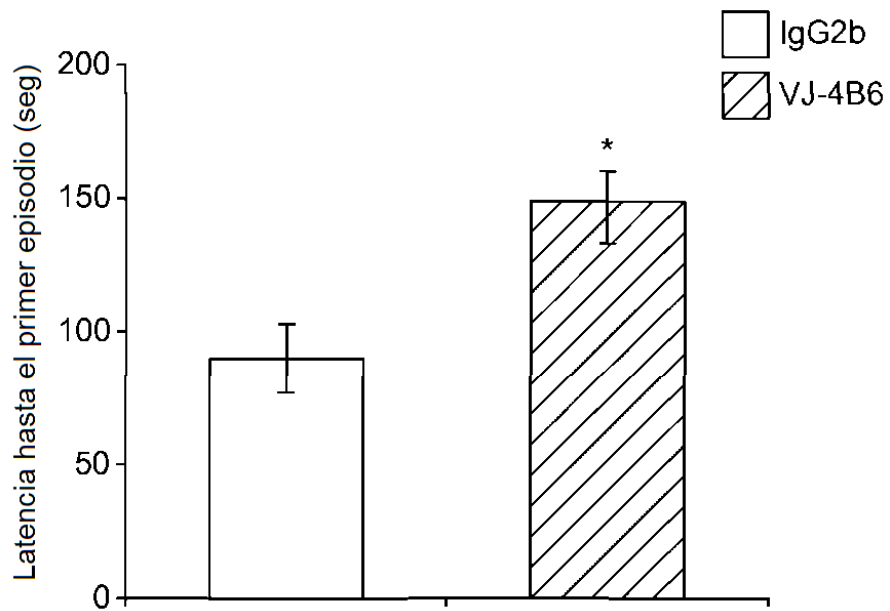


FIG. 12B

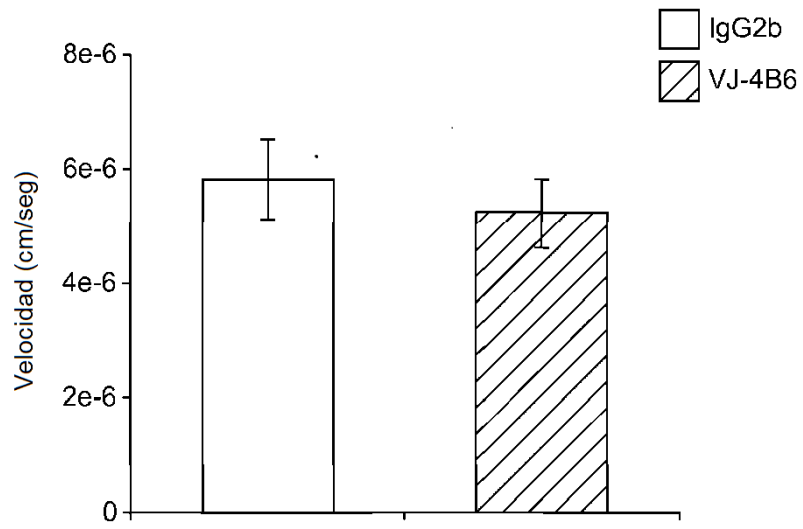


FIG. 13