

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 141**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/40** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2008 E 12172222 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2537529**

54 Título: **Anticuerpos inhibidores LOXL2 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**02.08.2007 US 963214 P**

**02.08.2007 US 963246 P**

**02.08.2007 US 963282 P**

**02.08.2007 US 963249 P**

**02.08.2007 US 963248 P**

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

**14.02.2019**

73 Titular/es:

**GILEAD BIOLOGICS, INC. (100.0%)**

**333 Lakeside Drive**

**Foster City, CA 94404, US**

72 Inventor/es:

**SMITH, VICTORIA;**

**GARCIA, CARLOS AURELIO;**

**BIERMANN, DONNA HIROKO TOKUOKA;**

**OGG, SCOTT;**

**VAN VLASSELAER, PETER;**

**BARRY, VIVIAN E.;**

**MARSHALL, DEREK;**

**HOLZER, ALISON KAY;**

**RODRIGUEZ, HECTOR;**

**OYASU, MIHO y**

**MCCAULEY, SCOTT ALAN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 700 141 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 inhibidores LOXL2 y usos de los mismos

Antecedentes de la invención

5 El cáncer es un grave problema de salud pública en los Estados Unidos y otros países desarrollados. Actualmente, una de cada cuatro muertes en los Estados Unidos se debe al cáncer. La terapia contra el cáncer consiste en tratar a los pacientes con fármacos quimioterapéuticos para destruir las células tumorales. Sin embargo, los subconjuntos de células tumorales con frecuencia son resistentes a la terapia con medicamentos y sobreviven para volver a poblar en los sitios de origen y en los sitios metastásicos distantes, lo que lleva a una recurrencia y morbilidad detectables de la enfermedad. Se piensa que muchas células tumorales de carcinoma que tienen propiedades de mayor capacidad  
10 invasiva y metastásica, y resistencia alterada a fármacos, han sufrido una transformación morfológica que abarca o es similar a la EMT (transición epiteliomesenquimal). Las células sometidas a EMT pierden las propiedades adhesivas normales de las células epiteliales y experimentan un espectro de cambios que incluyen la pérdida de la expresión de E-cadherina y la expresión de marcadores mesenquimatosos, aumento de la motilidad, aumento de la invasividad y aumento de la resistencia a la muerte celular.

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

20 La angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes, es una secuencia de eventos que es de importancia clave en una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos. El crecimiento normal del tejido, como en el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas y el ciclo menstrual, se caracteriza por la dependencia de la formación de nuevos vasos para el suministro de oxígeno y nutrientes, así como la eliminación de productos de desecho. Un gran número de enfermedades diferentes y no relacionadas también se asocian con la formación de nueva vasculatura. Entre ciertas patologías se encuentran las condiciones en las que la angiogénesis es  
25 baja y se debe mejorar para mejorar las condiciones de la enfermedad. Sin embargo, con mayor frecuencia, la angiogénesis excesiva es una característica importante de diversas patologías, incluidas las patologías caracterizadas o asociadas con una proliferación anormal o incontrolada de células. Las patologías que implican una angiogénesis excesiva incluyen, por ejemplo, cáncer (tumores sólidos y hematológicos), enfermedades cardiovasculares (como aterosclerosis y reestenosis), inflamación crónica (artritis reumatoide, enfermedad de Crohn), diabetes (retinopatía diabética), psoriasis, endometriosis, glaucoma neovascular y adiposidad (3). Estas condiciones pueden beneficiarse de la inhibición quimioterapéutica de la angiogénesis.

30 En términos generales, el proceso angiogénico conlleva la proliferación y migración de un endotelio normalmente inactivo, la proteólisis controlada de la matriz pericelular y la síntesis de nuevos componentes de la matriz extracelular mediante el desarrollo de capilares. El establecimiento de nuevos contactos intra e intercelulares y la diferenciación morfológica de las células endoteliales a redes tubulares de tipo capilar proporcionan apoyo para su posterior maduración, ramificación, remodelación y regresión selectiva para formar una red microvascular funcional altamente organizada. Las interacciones autocrinas, paracrinas y anficrinas del endotelio vascular con sus componentes estromales circundantes, así como con las citoquinas proangiogénicas y angiostáticas y los factores de crecimiento que orquestan la angiogénesis fisiológica, normalmente están reguladas tanto espacial como temporalmente.  
35

40 La angiogénesis es crucial para el crecimiento de tejidos neoplásicos. Durante más de 100 años, se ha observado que los tumores son más vasculares que los tejidos normales. Varios estudios experimentales han sugerido que tanto el crecimiento del tumor primario como la metástasis requieren neovascularización. En contraste con el proceso bien orquestado descrito anteriormente para el crecimiento normal del tejido, la angiogénesis patológica necesaria para el crecimiento activo del tumor es generalmente sostenida y persistente, siendo la adquisición inicial del fenotipo angiogénico un mecanismo común para el desarrollo de una variedad de tipos de tumores sólidos y hematopoyéticos. Los tumores que no pueden reclutar y mantener una red vascular generalmente permanecen inactivos como lesiones asintomáticas in situ. La metástasis también depende de la angiogénesis: para que una célula tumoral produzca metástasis con éxito, generalmente debe acceder a la vasculatura en el tumor primario, sobrevivir a la circulación,  
45 detenerse en la microvasculatura del órgano objetivo, salir de esta vasculatura, crecer en el órgano objetivo, e inducir la angiogénesis en el sitio de destino. Por lo tanto, la angiogénesis parece ser necesaria al principio, así como a la finalización de la cascada metastásica.

50 La criticidad de la angiogénesis para el crecimiento y la metástasis de las neoplasias proporciona así un objetivo potencial óptimo para los esfuerzos de quimioterapia. Los agentes antiangiogénicos apropiados pueden actuar directa o indirectamente para influir en la angiogénesis asociada con el tumor, ya sea retrasando su inicio (es decir, bloqueando un "interruptor angiogénico") o bloqueando la neovascularización sostenida y focal que es característica de muchos tipos de tumores. Las terapias contra la angiogénesis dirigidas contra el endotelio asociado a tumores y los múltiples procesos moleculares y celulares y los objetivos implicados en la angiogénesis patológica sostenida se están evaluando activamente para determinar su seguridad y eficacia en múltiples ensayos clínicos. Sin embargo,  
55

hasta la fecha ha habido un éxito limitado con el descubrimiento y/o la identificación de agentes antiangiogénicos seguros y/o efectivos.

5 La fibrosis es la acumulación anormal de tejido fibroso que puede ocurrir como parte del proceso de curación de la herida en el tejido dañado. Dicho daño tisular puede resultar de lesiones físicas, inflamación, infección, exposición a toxinas y otras causas.

10 La fibrosis del hígado (hepática), por ejemplo, se produce como parte de la respuesta de curación de la herida a una lesión hepática crónica. La fibrosis ocurre como una complicación de la hemocromatosis, la enfermedad de Wilson, el alcoholismo, la esquistosomiasis, la hepatitis viral, la obstrucción del conducto biliar, la exposición a toxinas y los trastornos metabólicos. Se cree que esta formación de tejido cicatricial representa un intento del cuerpo por encapsular el tejido lesionado. La fibrosis hepática se caracteriza por la acumulación de matriz extracelular que puede distinguirse cualitativamente de la del hígado normal. Si no se controla, la fibrosis hepática progresa a cirrosis (definida por la presencia de nódulos encapsulados), insuficiencia hepática y muerte.

15 Según lo resumido por Li and Friedman (Gastroenterol. Hepatol. 14: 618-633, 1999), las estrategias terapéuticas reales y propuestas para la fibrosis hepática incluyen la eliminación de la causa subyacente (por ejemplo, toxina o agente infeccioso), la supresión de la inflamación (usando, por ejemplo, corticosteroides, antagonistas del receptor de IL-1 u otros agentes), regulación a la baja de la activación de células en estrella usando, por ejemplo, interferón gamma o antioxidantes, promoción de la degradación de la matriz o promoción de la apoptosis de células en estrella. A pesar del progreso reciente, muchas de estas estrategias todavía están en la etapa experimental, y las terapias existentes están dirigidas a suprimir la inflamación en lugar de abordar los procesos bioquímicos subyacentes. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad en la técnica de materiales y métodos para tratar la fibrosis, incluyendo fibrosis hepática y pulmonar.

25 Los tejidos fibróticos se acumulan en el corazón y los vasos sanguíneos como resultado de hipertensión, enfermedad cardíaca hipertensiva, aterosclerosis e infarto de miocardio. La presión arterial alta, o hipertensión, puede ser causada por una variedad de factores y, a menudo, conduce al desarrollo de enfermedad cardíaca hipertensiva (HHD) con progresión a paro cardíaco e infarto de miocardio. De manera similar, la aterosclerosis y otras enfermedades cardíacas isquémicas a menudo también resultan en un paro cardíaco. Todas estas enfermedades cardiovasculares exhiben una acumulación de matriz extracelular o deposición fibrótica que da como resultado la rigidez de la vasculatura y la rigidez del propio tejido cardíaco. Esta deposición de material fibrótico es una respuesta al daño inducido por el estado hipertenso y/o esclerótico, pero los efectos de esta respuesta también dan como resultado los efectos negativos de la rigidez vascular y cardíaca, así como el agrandamiento del ventrículo. Además, se cree que el aumento de la fibrosis cardíaca que se observa en las enfermedades cardiovasculares perturba o altera las señales transmitidas a los cardiomiocitos a través del andamiaje tisular del corazón, lo que conduce a una alteración de la función cardíaca eficiente y promueve el paro cardíaco y el infarto de miocardio.

30 Peinado et al., EMBO J., vol. 24(19), 2005, páginas 3446-3458, y Peinado et al., Cancer Res., vol. 68(12), 2008, páginas 4541-4550, se relacionan con LOXL2 y su uso como marcador pronóstico del carcinoma de células escamosas.

#### Resumen de la invención

40 La transición epitelial a mesenquimática (EMT) se refiere al proceso mediante el cual una célula con una expresión génica/fenotipo característica de la célula epitelial (es decir, que expresa proteínas, factores y moléculas específicas) cambia o altera los genes o su nivel de expresión que resulta en un cambio en el fenotipo de la célula como se muestra por la alteración o cambio en los genes expresados.

Se necesitan composiciones que eviten la EMT y que sean efectivas para bloquear la actividad de LOXL2. Tales inhibidores son útiles en el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con niveles aberrantes de LOXL2.

45 La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a una proteína de tipo lisil oxidasa 2 (LOXL2), e inhibe la actividad enzimática de la proteína LOXL2, en donde la inhibición no es competitiva, que es un anticuerpo aislado, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo compite por la unión a LOXL2 con otro anticuerpo que se une específicamente a una región de LOXL2 que comprende la SEQ ID NO: 6. En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado que comprende (a) CDR de cadena pesada variable que tienen las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 41, 42 y 70; y (b) CDR de cadena ligera variable que tienen las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 57, 58 y 59. En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo es humanizado o humano y/o es un Fv, un scFv, un Fab, un F(ab')<sub>2</sub>, un anticuerpo artificial o monoclonal. En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo está marcado con una etiqueta terapéutica, de diagnóstico o detectable.

55 Además, la presente invención proporciona el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de la invención para su uso en un método para reducir el crecimiento tumoral, reducir la metástasis, inhibir la angiogénesis, tratar la fibrosis o disminuir la formación de matriz extracelular. En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo se usa en combinación con un segundo agente terapéutico.

La presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de la invención.

5 La presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-LOXL2 humanizado o fragmento del mismo que se une específicamente a LOXL2, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo inhibe la actividad enzimática de la proteína LOXL2, en donde la inhibición no es competitiva y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: (1) (a) CDR de cadena pesada variable que tienen las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 41, 42 y 70; y (b) CDR de cadena ligera variable que tienen las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 57, 58 y 59; (2) (a) una cadena pesada variable que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28; y (b) una cadena ligera variable que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO: 30, 31 y 32; y (3) (a) una cadena pesada variable que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28; y (b) una cadena ligera variable que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NOs: 30, 31 y 32. En una realización, el anticuerpo anti-LOXL2 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO: 27 y una cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 31.

La presente invención proporciona un vector que comprende el ácido nucleico de la invención.

La presente invención proporciona un método *in vitro*, que comprende: detectar un nivel de LOXL2 en una muestra de un sujeto, en donde el nivel de LOXL2 en la muestra en comparación con una muestra de referencia indica la presencia de un tumor, metástasis, angiogénesis, o fibrosis en el sujeto y la detección se lleva a cabo poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la invención. En una realización, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (1) (a) CDR de cadena pesada variable que tienen las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 41, 42 y 70; y (b) CDR de cadena ligera variable que tienen las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 57, 58 y 59; (2) (a) una cadena pesada variable que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28; y (b) una cadena ligera variable que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO: 30, 31 y 32; y (3) (a) una cadena pesada variable que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28; y (b) una cadena ligera variable que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NOs: 30, 31 y 32. En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO: 27 y una cadena ligera variable de ID SEQ NO: 31.

30 La presente invención proporciona una célula huésped transfectada con el vector de la invención.

La presente invención también proporciona un anticuerpo recombinante o fragmento del mismo producido por la célula huésped de la invención.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención.

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

45 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden unirse específicamente a LOXL2 con una afinidad de unión de al menos 2, 5, 10, 50, 100, 500 o 1000 veces mayor que a al menos uno de LOX, LOXL1, LOXL3 o LOXL4.

En una realización, el anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a LOXL2, comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera,

50 en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una cadena pesada FR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33, pero para una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) una sustitución de glutamina (Q) por valina (V) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 24;

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

## ES 2 700 141 T3

- (c) una sustitución de valina (V) por lisina (K) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 31;
- (d) una sustitución de arginina (R) por lisina (K) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 32; y
- (e) una sustitución de treonina (T) por alanina (A) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 35;
- y una eliminación de los residuos de aminoácidos 1-19;
- 5 (ii) una cadena pesada FR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34, pero para una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:
- (a) una sustitución de lisina (K) por arginina (R) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 3;
- (b) una sustitución de arginina (R) por alanina (A) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 5, y
- 10 (iii) una cadena pesada FR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, pero para una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:
- (a) una sustitución de lisina (K) por arginina (R) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 1;
- (b) una sustitución de alanina (A) por valina (V) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 2;
- (c) una sustitución de leucina (L) por isoleucina (I) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 4;
- (d) una sustitución de serina (S) por treonina (T) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 10;
- 15 (e) una sustitución de glutamina (Q) por ácido glutámico (E) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 16;
- (f) una sustitución de treonina (T) por arginina (R) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 21;
- (g) una sustitución del ácido aspártico (D) por ácido glutámico (E) o una sustitución conservadora del mismo en la posición 23;
- 20 (h) una sustitución de serina (S) por treonina (T) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 25; y
- (i) una sustitución de fenilalanina (F) por tirosina (Y) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 29;
- y
- (iv) una cadena pesada FR4 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, pero para una sustitución de lisina (K) por valina (V) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 7,
- 25 y en donde dicha región variable de cadena ligera comprende:
- (i) una cadena ligera FR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49, pero para una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:
- (a) una sustitución de alanina (A) por treonina (T) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 27;
- 30 (b) una sustitución de alanina (A) por prolina (P) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 28;
- (c) una sustitución de prolina (P) por leucina (L) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 29;
- (d) una sustitución de valina (V) por leucina (L) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 31;
- (e) una sustitución del ácido glutámico (E) por glutamina (Q) o una sustitución conservadora del mismo en la posición 37;
- 35 (d) una sustitución de serina (S) por prolina (P) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 38;
- (f) una sustitución de valina (V) por alanina (A) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 39;
- y una eliminación de los residuos de aminoácidos 1-20;
- (ii) una cadena ligera FR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50, pero para una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:
- 40 (a) una sustitución de fenilalanina (F) por tirosina (Y) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 2; y
- (b) una sustitución de arginina (R) por lisina (K) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 5;

(iii) una cadena ligera FR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51, pero para una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

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

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

y

(iv) una cadena ligera FR4 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52, pero para una sustitución de leucina (L) por valina (V) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 7;

10 En una realización, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada FR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 33, 37 o 44; una región variable FR2 de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 34, 38 o 45; una región variable FR3 de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 35, 39, 46, 47 o 48; una región variable FR4 de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 36 o 40; una región variable de la cadena ligera FR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 49 o 53; una región variable de la cadena ligera FR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 50, 54 o 60; una región variable de la cadena ligera FR3 que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 51, 55 o 61; y una región variable de la cadena ligera FR4 que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 52 o 56.

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

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

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

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

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

50 La inhibición de LOXL2 puede reducir el crecimiento del tumor en un sujeto ya sea parcial o completamente. La inhibición de LOXL2 puede reducir la angiogénesis en un sujeto de manera que se produzca un beneficio terapéutico. La inhibición de LOXL2 puede reducir la fibrosis en un sujeto de manera que se produzca un beneficio terapéutico.

55 En el presente documento se describe un método para reducir el crecimiento de un tumor en un sujeto, que comprende administrar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento. Un tumor puede ser un tumor primario o un tumor metastásico. En un aspecto, un tumor es, por ejemplo, cáncer de pulmón (incluido adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, carcinoma

5 bronquioloalveolar, carcinoma de células no pequeñas, carcinoma de células pequeñas, mesotelioma); cáncer de  
mama (incluyendo carcinoma ductal, carcinoma lobular, cáncer de mama inflamatorio, carcinoma de células claras,  
carcinoma mucinoso); cáncer colorrectal (cáncer de colon, cáncer de recto); cáncer anal; cáncer pancreático  
10 (incluyendo adenocarcinoma pancreático, carcinoma de células de los islotes, tumores neuroendocrinos); cáncer de  
próstata; carcinoma de ovario (carcinoma epitelial de ovario o tumor del estroma epitelial de superficie, que incluye  
tumor seroso, endometriode y cistoadenocarcinoma mucinoso, tumor del estroma del cordón sexual); carcinoma del  
15 conducto biliar y del hígado (incluido carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, hemangioma); carcinoma esofágico  
(incluido adenocarcinoma esofágico y carcinoma de células escamosas); linfoma no-Hodgkin; carcinoma de vejiga;  
carcinoma del útero (incluido adenocarcinoma endometrial, carcinoma uterino seroso papilar, carcinoma uterino de  
20 células claras, sarcomas uterinos y leiomiomas, tumores mullerianos mixtos); glioma, glioblastoma,  
meduloblastoma y otros tumores del cerebro; cánceres de riñón (incluyendo carcinoma de células renales, carcinoma  
de células claras, tumor de Wilms); cáncer de cabeza y cuello (incluidos carcinomas de células escamosas); cáncer  
de estómago (adenocarcinoma de estómago, tumor del estroma gastrointestinal); mieloma múltiple; cáncer testicular;  
25 tumor de células germinales; tumor neuroendocrino; cáncer de cuello uterino; carcinoides del tracto gastrointestinal,  
mama y otros órganos; carcinoma de células en anillo de sello; tumores mesenquimatosos, incluidos sarcomas,  
fibrosarcomas, hemangioma, angiomatosis, hemangiopericitoma, hiperplasia estromal pseudoangiomatosa,  
miofibroblastoma, fibromatosis, tumor miofibroblástico inflamatorio, lipoma, angioliipoma, tumor de células granulares,  
neurofibroma, schwannoma, angiosarcoma, liposarcoma, rabdomyosarcoma, osteosarcoma, leiomioma o un  
30 leiomyosarcoma. En una realización, un tumor es, por ejemplo, un tumor de colon, un tumor de ovario, un tumor de  
pulmón, un tumor de esófago, un tumor de mama, un tumor de próstata, un carcinoma. El tamaño del tumor en el  
sujeto se puede reducir al menos en un 10%, 25%, 50%, 70%, 90%, 95% o más después del tratamiento en  
comparación con el tumor en el sujeto antes del tratamiento. En un aspecto, la supervivencia de un sujeto con un  
tumor se incrementa en al menos 10 días, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más en  
35 comparación con un sujeto que no se administra el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo. La carga  
tumoral metastásica de un sujeto puede estabilizarse después de la administración de un anticuerpo o fragmento de  
unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento. Por ejemplo, la carga tumoral metastásica se puede  
estabilizar durante al menos 10 días, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más.

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

30 En el presente documento se describe un método para inhibir una enfermedad fibrótica en un sujeto mediante la  
administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento. Las  
enfermedades fibróticas incluyen, pero no se limitan a, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis  
cardíaca y escleroderma. En una realización, la fibrosis renal incluye, pero no se limita a, nefropatía diabética, reflujo  
vesicoureteral, fibrosis renal tubulointersticial; glomerulonefritis o nefritis glomerular, que incluye glomeruloesclerosis  
35 focal segmentaria y glomerulonefritis membranosa, y nefritis glomerular mesangiocapilar. En una realización, la fibrosis  
hepática produce cirrosis y afecciones asociadas, como hepatitis viral crónica, enfermedad del hígado graso no  
alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis alcohólica (ASH), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis biliar primaria  
(PBC), cirrosis biliar y hepatitis autoinmune.

40 En el presente documento se describe un método para disminuir la formación de matriz extracelular poniendo en  
contacto una muestra o tejido celular con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el  
presente documento. La administración o el contacto pueden ocurrir, en un ejemplo, por administración parenteral.

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

45 En una realización, dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, se marca con una etiqueta  
terapéutica.

En este documento se contempla una terapia de combinación en la que los métodos comprenden además la  
administración conjunta de un segundo agente terapéutico. En una realización, el segundo agente terapéutico es un  
anticuerpo o un agente quimioterapéutico.

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

55 Se describe aquí un uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente  
documento en la preparación de una formulación para diagnosticar un tumor o metástasis que comprende evaluar los  
niveles de LOXL2 en una muestra de un paciente, en donde un cambio en los niveles de LOXL2 en la muestra en  
comparación con una muestra de referencia indica la presencia de un tumor o metástasis o un aumento en el

crecimiento tumoral o metastásico. En una realización, dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está marcado con una etiqueta de diagnóstico.

Breve descripción de los dibujos

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

La Figura 1 ilustra la Enzimología de Lisil Oxidasa. Las enzimas LOX/L actúan a través de un mecanismo de *ping-pong* que puede ser descrito por la cinética de Michaelis-Menten.

10 La Figura 2 ilustra modos comunes de inhibición enzimática.

La Figura 3 ilustra que  $\beta$ APN es un inhibidor competitivo de LOXL2.

La Figura 4 ilustra modos de inhibición enzimática: LOXL2.

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

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

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

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

La Figura 9 ilustra la actividad enzimática del Anticuerpo AB0023 anti-LOXL2.

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

25 La Figura 11 ilustra la afinidad de unión y la tasa de desactivación del Anticuerpo AB0023 anti-LOXL2.

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

30 La Figura 13 muestra que el Anticuerpo AB0023 anti-LOXL2 demuestra una inhibición constante de la migración/invasión en el colágeno I y el colágeno IV, desde sobrenadantes hasta 10 ml de material de preparación y 100 ml de preparación de escala y material de ascitis. También se observa inhibición parcial en los ensayos de adhesión celular. En las muestras de prueba, las células en el ensayo migran hacia el suero y se mide la fluorescencia para determinar el recuento de células y la migración. La barra del extremo izquierdo es una muestra de control en la que no está presente ningún anticuerpo y la capa inferior contiene suero (control positivo para la invasión celular). La segunda barra de la izquierda es un control negativo en donde no está presente ningún anticuerpo y la capa inferior no contiene suero.

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

La Figura 15 demuestra que M64 se une a LOX de una manera dependiente de la dosis. El lote 3 tiene una KD de 6.6 nM, el lote 4 tiene una KD de 5.0 nM y el lote 5 tiene una KD de 5.7 nM.

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

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

La Figura 18 demuestra un efecto sinérgico de un anticuerpo anti-LOX en combinación con cisplatino. Los valores de IC50 de M64 también se determinaron en cuatro líneas celulares.

Descripción detallada de la invención

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

5 La presente invención proporciona una metodología innovadora y composiciones y kits relacionados para diagnosticar o monitorizar diversas enfermedades asociadas con la proliferación celular anormal, la angiogénesis y la fibrosis, mediante el uso de agentes que reconocen específicamente formas activas o maduras de proteínas de tipo lisil oxidasa 2 (LOXL2).

10 Se describen métodos para diagnosticar o monitorizar la metástasis del cáncer en un sujeto, que comprenden: evaluar los niveles de LOXL2 activas o la actividad en la sangre o en un tumor, por lo que un cambio en los niveles de LOXL2 activas o la actividad en la sangre o en el tumor en comparación con una muestra de referencia, indica la presencia de crecimiento tumoral metastásico.

15 Como se describe con más detalle a continuación, los niveles de LOXL2 activa pueden evaluarse mediante diversos métodos que incluyen, entre otros, la inmunohistoquímica utilizando anticuerpos que se unen específicamente a la forma activa o madura de LOXL2. La actividad enzimática de LOXL2 activa se puede medir utilizando varios métodos que incluyen, entre otros, ensayos cromogénicos y fluorométricos.

En el presente documento también se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que reconocen específicamente formas activas de LOXL2, métodos para generar anticuerpos contra formas activas de LOXL2 y métodos para usar los anticuerpos para tratar proliferación celular anormal, angiogénesis y fibrosis.

#### I. Definiciones generales

20 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Si una definición establecida en esta sección es contraria a o de alguna forma inconsistente con una definición establecida en las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones, prevalecerá la definición establecida en esta sección. Los encabezados proporcionados aquí son solo por conveniencia.

25 Como se usa en este documento, "un" o "una" significa "al menos uno/una" o "uno/una o más".

30 La expresión "sustitución conservadora de aminoácidos" se refiere a la agrupación de aminoácidos sobre la base de ciertas propiedades comunes. Una forma funcional de definir propiedades comunes entre aminoácidos individuales es analizar las frecuencias normalizadas de los cambios de aminoácidos entre las proteínas correspondientes de organismos homólogos (Schulz, G. E. and R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). De acuerdo con dichos análisis, los grupos de aminoácidos pueden definirse donde los aminoácidos dentro de un grupo se intercambian preferentemente entre sí, y por lo tanto se parecen más entre sí en su impacto sobre la estructura de la proteína en general (Schulz, G.E. and R.H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). Ejemplos de grupos de aminoácidos definidos de esta manera incluyen:

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

45 Además de los grupos presentados anteriormente, cada residuo de aminoácido puede formar su propio grupo, y el grupo formado por un aminoácido individual puede ser referido simplemente por la abreviatura de una y/o tres letras para ese aminoácido, comúnmente usada en la técnica, como se describió anteriormente.

Un "residuo conservado" es un aminoácido que es relativamente invariante en un rango de proteínas similares. A menudo, los residuos conservados variarán solo al ser reemplazados por un aminoácido similar, como se describe anteriormente para la "sustitución conservadora de aminoácidos".

La letra "x" o "xaa", como se usa en las secuencias de aminoácidos en el presente documento, pretende indicar que cualquiera de los veinte aminoácidos estándar puede colocarse en esta posición a menos que se indique específicamente lo contrario. Para los fines del diseño peptidomimético, una "x" o una "xaa" en una secuencia de aminoácidos puede reemplazarse por una imitación del aminoácido presente en la secuencia diana, o el aminoácido puede reemplazarse por un espaciador de esencialmente cualquier forma que no interfiera con la actividad del peptidomimético.

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

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

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

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

probablemente 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad a las secuencias de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento se denominan sustancialmente idénticas.

## II. Proteínas de Lisil oxidasa (LOX) y similares a Lisil oxidasa (LOX-L)

Típicamente, los tumores sólidos contienen áreas de baja tensión de oxígeno (hipoxia). Las células hipóxicas presentan un gran problema en el tratamiento del cáncer porque estas células son altamente agresivas, metastásicas y resistentes a la terapia. Los mecanismos subyacentes que contribuyen a estas características son poco conocidos. La metástasis plantea un problema particular en el cáncer de mama porque no existe un tratamiento efectivo para la mayoría de las pacientes con cáncer de mama metastásico detectable (Steeg, PS. Br. Can. Res. 2(6): 396-9 (2000)).

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

La expresión elevada de LOX se correlaciona con un aumento de la estadificación en el cáncer de células renales (Stassar et al. Br. J. Cancer, 85: 1372-82 (2001)), y se observa una mayor expresión de LOX en líneas celulares de cáncer de mama altamente metastásicas y/o invasivas (Kirschmann et al. Breast Cancer Res. Treat. 55: 127-36 (1999); y Kirschmann et al. Cancer Res. 62: 4478-83 (2002)). En contraste, LOX actúa como un supresor de tumores en los reversiones no tumorigénicas de los fibroblastos transformados con ras (Smith-Mungo and Kagan. Matrix Biol. 16: 387-98 (1998)). La pérdida de LOX se asocia con tumorigénesis en varios tipos de cáncer, como cánceres gástricos, de colon y de próstata (Ren et al. Cancer Res. 58: 1285-90 (1998); Cxiszar et al. Int. J. Cancer 97: 636-42 (2002) y Kaneda et al. Cancer Res. 64: 6410-5 (2004)). Por lo tanto, parecería que la función supresora de tumores de LOX depende del tipo de célula y del estado de transformación. Recientemente se demostró que el dominio propéptido (y no la enzima activa) es responsable de las actividades supresoras de tumores. En el cáncer de mama, el aumento de la expresión de LOX se asocia con la reacción estromal temprana (Decitre et al. Lab. Invest. 78: 143-51 (1998)), y el tratamiento con LOX antisentido en este tipo de células de cáncer evita la invasión *in vitro* (Kirschmann et al. Cancer Res. 62: 4478-83 (2002)).

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

Se han observado tres sitios principales de terminación de la transcripción dentro de los dominios 3'-UTR del ADNc LOXL2. El primer sitio de terminación es 690 pb 3' del codón de terminación, el segundo sitio es 740 pb, y el sitio de terminación de la transcripción final es 900 pb 3' del codón de terminación. Todos estos ARNm tienen 3'-UTR que difieren ligeramente en tamaño. La mayoría de los límites exón-intrón del gen LOXL2 muestran la secuencia de consenso (C/T) AG-exón-GT(A/G). Los tamaños de los 11 exones del gen LOXL2 varían de 112 a 940 pb. Aunque el gen LOXL2 tiene 11 exones, cinco exones consecutivos (exones 6-10), que codifican los dominios catalizadores y de unión al cobre, muestran una similitud de secuencia del 84%, y los tamaños de los exones son muy similares a los exones correspondientes de los genes LOX y LOXL. Todos los demás exones en el gen LOXL2 son divergentes tanto en secuencia como en tamaño. La LOXL2 se ha identificado en todos los tejidos con la excepción de los leucocitos de

la sangre. Se ha detectado ARNm de LOXL2 en el corazón, el hígado y el páncreas; la expresión es significativamente mayor en placenta, próstata, útero y páncreas (relaciones entre 2 y 3) en comparación con una expresión más baja en cerebro, pulmón, músculo esquelético, timo y riñón (relaciones por debajo de 0.5). (Jourdan-Le Saux, et al. *J. Biol. Chem.*, 274(18): 12939-12944 (1999)).

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

- 20 La lisil oxidasa cataliza la desaminación oxidativa de los residuos de peptidil lisina e hidroxilisina en colágenos, y los residuos de peptidil lisina en elastina. Los aldehídos peptídicos resultantes se condensan espontáneamente y experimentan reacciones de oxidación para formar los enlaces cruzados covalentes derivados de la lisina necesarios para la integridad estructural normal de la matriz extracelular. En la reacción de la lisil oxidasa con sus sustratos, el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el amonio se liberan en cantidades estequiométricas con el producto peptidil aldehído. Véase, por ejemplo, Kagan et al., *J. Cell. Biochem.* 88: 660-72 (2003).

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

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

- 45 La actividad principal de LOX es la oxidación de residuos de lisina específicos en colágeno y elastina fuera de la célula, sin embargo, también puede actuar intracelularmente, donde puede regular la expresión de genes (Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12817-12822 (1997), Giampuzzi et al., *J. Biol. Chem.* 275: 36341-36349 (2000)). Además, la LOX induce la quimiotaxis de monocitos, fibroblastos y células del músculo liso (Lazarus et al., *Matrix Biol.* 14: 727-731 (1995) Nelson et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 188: 346-352 (1988)). La propia LOX es inducida por una serie de factores de crecimiento y esteroides como el TGF-β, el TNF-α y el interferón (Csiszar, *Prog. Nucl. Acid Res.* 70: 1-32 (2001)). Estudios recientes han atribuido otras funciones a la LOX en diversas funciones biológicas, como la regulación del desarrollo, la supresión de tumores, la motilidad celular y la senescencia celular. La función diversa de LOX y su familia de amino oxidasas recientemente descubierta, similares a LOX (LOXL), pueden desempeñar funciones importantes con su localización intracelular y extracelular.

- 55 Tal como se usa en el presente documento, el término "lisil oxidasa" se refiere a una enzima que cataliza la siguiente reacción: peptidil-L-lisil-péptido + O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O → peptidil-alilil-péptido + NH<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Otros sinónimos de lisil oxidasa (EC 1.4.3.13) incluyen proteína-lisina 6-oxidasa y proteína-L-lisina:oxígeno 6-oxidoreductasa (desaminante). Véase, por ejemplo, Harris et al., *Biochim. Biophys Acta* 341: 332-44 (1974); Rayton et al., *J. Biol. Chem.* 254: 621-26 (1979); Stassen, *Biophys. Acta* 438: 49-60 (1976). Una quinoproteína que contiene cobre con un aducto de lisilo de tirosil quinona en su centro activo, la LOX cataliza la oxidación de peptidil lisina para dar como resultado la formación de peptidil alfa-aminoaldehído. Una vez formado, este semialdehído puede condensarse

espontáneamente con aldehídos vecinos o con otros grupos lisilo a partir de entrecruzamientos inter e intracadenas. Véase, por ejemplo, Rucker et al., *Enm. J. Clin. Nutr.* 67: 996S-1002S (1998).

El término "LOX" se refiere a una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a un polipéptido expresado o traducido de una de las siguientes secuencias: números de acceso de EMBL/GenBank: M94054 (SEQ ID NO: 10); AAA59525.1 (SEQ ID NO: 11) - ARNm; S45875 (SEQ ID NO: 12); AAB23549.1 (SEQ ID NO: 13) - ARNm; S78694 (SEQ ID NO: 14); AAB21243.1 (SEQ ID NO: 15) - ARNm; AF039291 (SEQ ID NO: 16); AAD02130.1 (SEQ ID NO: 17) - ARNm; BC074820 (SEQ ID NO: 18); AAH74820.1 (SEQ ID NO: 19) - ARNm; BC074872 (SEQ ID NO: 20); AAH74872.1 (SEQ ID NO: 21) - ARNm; M84150 (SEQ ID NO: 22); AAA59541.1 (SEQ ID NO: 23) - ADN genómico. Un ejemplo de LOX es la preproteína de lisil oxidasa humana (hLOX) que tiene una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7), un hLOX secretado después de la escisión del péptido de señalización tal como la SEQ ID NO: 8 o un hLOX maduro después del procesamiento proteolítico tal como SEQ ID NO: 9.

La LOX tiene dominios de proteínas altamente conservados, conservados en varias especies, incluyendo humanos, ratones, ratas, pollos, peces y *Drosophila*. La familia LOX humana tiene una región C-terminal altamente conservada que contiene el dominio catalítico LOX de 205 aminoácidos. La región conservada contiene la unión de cobre (Cu), el dominio similar al receptor de citoquinas conservado (CRL) y el sitio del cofactor de lisil-tirosilquinona (LTQ). Doce residuos de cisteína también se conservan de manera similar, en donde dos de ellos residen dentro de la región prepropéptido y diez están en la forma procesada catalíticamente activa de LOX (Csiszar, *Prog. Nucl. Acid Res.* 70: 1-32 (2001)). La región conservada también incluye un dominio de unión a fibronectina.

La región prepropeptídica de LOX contiene el péptido de señalización, y se escinde, se predice que el sitio de escisión está entre Cys21-Ala22, para generar un péptido de secuencia señal y una forma de propéptido de aminoácido de 48 kDa de LOX, que todavía está inactiva. El propéptido es N-glicosilado durante el paso a través del Golgi que se secreta en el ambiente extracelular donde la proenzima o propéptido, se escinde entre Gly168-Asp169 por una metaloendoproteasa, una procolágeno C-proteinasa, que son productos de *Bmp1*, *Tll1* y *Tll2* genes. BMP I (proteína morfogenética ósea I) es una proteína C procolágeno que procesa el propéptido para producir una enzima funcional de 30 kDa y un propéptido de 18 kDa. La secuencia que codifica el propéptido se conserva moderadamente (60-70%), mientras que la secuencia que codifica la región C-terminal de 30 kDa de la proenzima en la que se encuentra el sitio activo está altamente conservada (aproximadamente el 95%). (Kagan and Li, *J. Cell. Biochem.* 88: 660-672 (2003); Kagan et al., *J. Cell Biochem.* 59: 329-38 (1995)). Las unidades de N-glicosilo también se eliminan posteriormente. La LOX se presenta en formas no procesadas y/o procesadas (maduras). La forma madura de LOX suele estar activa, aunque, en algunos ejemplos, la LOX no procesada también está activa.

Ejemplos particulares de una enzima o proteína LOXL se describen en Molnar et al., *Biochim. Biophys Acta.* 1647: 220-24 (2003); Csiszar, *Prog. Nucl. Acid Res.* 70: 1-32 (2001); y en el documento WO 01/83702 publicado el 8 de noviembre de 2001. (Se observa que, en estas 3 publicaciones, se hace referencia a "LOXL1" como "LOXL" mientras que en la presente invención se utiliza "LOXL" para referirse a proteínas similares a lisil oxidasa en general, no solo LOXL1.) Estas enzimas incluyen LOXL1, codificada por el ARNm depositado en GenBank/EMBL BC015090; AAH15090.1; LOXL2, codificada por ARNm depositado en GenBank/EMBL U89942; LOXL3, codificada por ARNm depositado en GenBank/EMBL AF282619; AAK51671.1; y LOXL4, codificada por ARNm depositado en GenBank/EMBL AF338441; AAK71934.1.

Se han predicho péptidos de señal potenciales similares a los descritos anteriormente para LOX en el extremo amino de LOXL, LOXL2, LOXL3 y LOXL4. Los sitios de escisión de señal predichos están entre Gly25-Gln26 para LOXL, entre Ala25-Gln26, para LOXL2 y entre Gly25-Ser26 para LOXL3. El consenso para la escisión de BMP-1 en procolágenos y pro-LOX es entre Ala/Gly-Asp, y seguido a menudo por un residuo ácido o cargado. Un sitio de escisión potencial para generar LOXL activa es Gly303-Asp304, sin embargo, luego es seguido por un Pro atípico. La LOXL3 también tiene un sitio de escisión potencial en Gly447-Asp448, que es seguido por un Asp, el procesamiento en este sitio puede producir un péptido activo de tamaño similar a LOX activa. También se identificó un sitio de escisión potencial de BMP-1 dentro de LOXL4, en los residuos Ala569-Asp570 (Kim et al., *J. Biol. Chem.* 278: 52071-52074 (2003)). La LOXL2 también puede ser escindida proteolíticamente de manera análoga a los otros miembros de la familia LOXL y secretada (Akiri et al., *Cancer Res.* 63: 1657-1666 (2003)).

Las enzimas LOX y LOXL actúan a través de un mecanismo de ping-pong que puede ser descrito por la cinética de Michaelis-Menten (véase Figura 1).

Un ejemplo de proteína LOX o LOXL incluye la enzima que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a un polipéptido expresado o traducido de una de las siguientes secuencias: Accesos EMBL/GenBank: M94054; AAA59525.1-ARNm; S45875; AAB23549.1-mRNA; S78694; AAB21243.1-mRNA; AF039291; AAD02130.1-mRNA; BC074820; AAH74820.1-mRNA; BC074872; AAH74872.1 - ARNm; M84150; AAA59541.1-ADN genómico.

Los términos "LOX" y "LOXL" también abarcan fragmentos funcionales o derivados que retienen sustancialmente la actividad enzimática que cataliza la desaminación de residuos de lisilo. Típicamente, un fragmento o derivado funcional retiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% de su actividad de oxidación de lisilo. También se pretende que una proteína LOX o LOXL2 pueda incluir sustituciones de aminoácidos conservadoras que no alteren sustancialmente su actividad. Las sustituciones conservadoras adecuadas de aminoácidos son conocidas por los

expertos en esta técnica y pueden realizarse generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica. Véase, por ejemplo, Watson, et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4ª Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras y no conservadoras se han descrito anteriormente.

Una característica que no se sabe que sea común entre las proteínas LOX y LOXL son los dominios ricos en cisteína (SRCR) del receptor de eliminación. La LOX y LOXL carecen de dominios SRCR, mientras que LOXL2, LOXL3 y LOXL4 tienen cuatro dominios SRCR en el extremo N-terminal. Los dominios SRCR se encuentran en proteínas de matriz secretada, transmembrana o extracelular. También se sabe que los dominios SRCR median la unión de ligandos en varias proteínas secretadas y receptoras (Hoheneste et al., *Nat. Struct. Biol.* 6: 228-232 (1999); Sasaki et al., *EMBO J.* 17: 1606-1613 (1998)). Otro dominio exclusivo de LOXL es la presencia de un dominio rico en prolina (Molnar et al., *Biochimica Biophysica Acta* 1647: 220-224 (2003)).

La distribución en tejido también puede diferir entre LOX y los diversos LOXL. La LOX es altamente expresada en el corazón, la placenta, los testículos, los pulmones, los riñones y el útero, pero marginalmente en el cerebro y el hígado. La LOXL1 se expresa en la placenta, riñón, músculo, corazón, pulmón y páncreas, y como sucede con la LOX, tiene una expresión mucho menor en el cerebro y el hígado (Kim et al., *J. Biol. Chem.* 270: 7176-7182 (1995)). La LOXL2 es altamente expresada en el útero, la placenta y otros órganos, pero similar a LOX y LOXL, es expresada en forma baja en el cerebro y el hígado (Jourdan Le-Saux et al., *J. Biol. Chem.* 274: 12939-12944 (1999)). La LOXL3 es altamente expresada en testículos, el bazo y la próstata, moderadamente en la placenta, y no en el hígado, mientras que la LOXL4 se expresa mucho en el hígado (Huang et al., *Matrix Biol.* 20: 153-157 (2001); Maki and Kivirikko, *Biochem. J.* 355: 381-387 (2001); Jourdan Le-Saux et al., *Genomics* 74: 211-218 (2001); Asuncion et al., *Matrix Biol.* 20: 487-491 (2001)).

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

### III. Epitelio - Transición Mesenquimal

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

Las células epiteliales y mesenquimales representan linajes distintos, cada uno con un perfil de expresión génica único que imparte atributos específicos para cada tipo de célula. La conversión de una célula epitelial en una célula mesenquimática requiere alteraciones en la morfología, arquitectura celular, adhesión y/o capacidad de migración. Las células tumorales avanzadas con frecuencia exhiben una notable regulación negativa de los marcadores epiteliales y una pérdida de las uniones intercelulares, lo que resulta en una pérdida de la polaridad epitelial y una menor adhesión intercelular. La pérdida de características epiteliales suele ir acompañada de un aumento de la motilidad celular y la expresión de genes mesenquimales. EMT puede incluir pérdida de inhibición de contacto, control de crecimiento alterado y/o invasividad mejorada (Christiansen and Rajasekaran, *Cancer Res.*, 66 (17): 8319-8326 (2006); y Thiery et al., *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 15: 740-6 (2003)). Las características moleculares y morfológicas indicativas de EMT se correlacionan con una diferenciación histológica deficiente, destrucción de la integridad del tejido y metástasis. EMT proporciona mecanismos para que las células epiteliales superen las restricciones físicas impuestas por las uniones intercelulares y adopten un fenotipo móvil (Burdsal et al. *Development*, 118: 829-44 (1993); y Nieto et al., *Mech. Dev.*, 105: 27-35 (2001)).

Los marcadores moleculares de uso común para la EMT incluyen una mayor expresión de N-cadherina y vimentina, la localización nuclear de  $\beta$ -catenina y una mayor producción de los factores de transcripción como Snail1 (Snail), Snail2 (Slug), Twist, EF1/ZEB1, SIP1 / ZEB2 y/o E47 que inhiben la producción de E-cadherina. Los marcadores fenotípicos para un EMT incluyen, entre otros, una mayor capacidad de migración e invasión tridimensional, así como resistencia a la apoptosis. Estos marcadores se han correlacionado además con la inducción de EMT y una asociación con fenotipos cancerosos.

La aparición de EMT durante la progresión tumoral permite que las células tumorales adquieran la capacidad de infiltrarse en el tejido circundante y, en última instancia, metastatizar en sitios distantes. Los cambios en la expresión génica dentro de las células tumorales pueden indicar una progresión desde un patrón de expresión génica epitelial o de tipo epitelial a un patrón de expresión génica mesenquimal o de tipo mesenquimático. A modo de ejemplo, la identificación de la pérdida de E-cadherina se correlaciona con el carcinoma metastásico, así como con la resistencia a terapias contra el cáncer, como los inhibidores de EGFR y los inhibidores de IGF-R1. El análisis de muchos tipos diferentes de cáncer revela que las células tumorales circulantes, o aquellas que se encuentran como micrometástasis, evidencian la conversión mesenquimática basada en cambios de expresión en un conjunto de marcadores. Estos marcadores incluyen, pero no se limitan a, EGFR, E-cadherina, ErbB3, RAB25, integrina beta 6, cadherina-2, proteína de unión al factor de crecimiento de fibroblastos 1, Homeobox 1 menos distal, ZEB1 (factor de transcripción 8), SIP1, y vimentina.

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

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

Para la evaluación de la expresión de biomarcadores epiteliales o mesenquimatosos de células tumorales, las muestras de pacientes que contienen células tumorales, o proteínas o ácidos nucleicos producidos por estas células tumorales, se pueden usar en los métodos descritos, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Número de Publicación 20070065858, el nivel de expresión del biomarcador se puede evaluar mediante la evaluación de la cantidad (por ejemplo, la cantidad absoluta o la concentración) del marcador en una muestra de células tumorales, por ejemplo, una biopsia de tumor obtenida de un paciente u otra muestra del paciente que contiene material derivado del tumor (por ejemplo, sangre, suero, orina u otros fluidos o excreciones corporales como se describe aquí anteriormente). La muestra de células puede, por supuesto, someterse a una variedad de técnicas preparatorias y de almacenamiento postrecolección bien conocidas (por ejemplo, extracción de ácidos nucleicos y/o proteínas, fijación, almacenamiento, congelación, ultrafiltración, concentración, evaporación, centrifugación, etc.) antes de evaluar la cantidad de marcador en la muestra. Del mismo modo, las biopsias de tumores también pueden someterse a técnicas de preparación y almacenamiento posteriores a la recolección, por ejemplo, la fijación.

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

La expresión de biomarcadores puede evaluarse mediante cualquiera de una amplia variedad de métodos bien conocidos para detectar la expresión de un ácido nucleico o proteína transcrito. Ejemplos no limitativos de tales métodos incluyen, por ejemplo, métodos inmunológicos para la detección de proteínas secretadas, de superficie celular, citoplásmicas o nucleares, métodos de purificación de proteínas, ensayos de función o actividad de proteínas, métodos de hibridación de ácidos nucleicos, métodos de transcripción inversa de ácidos nucleicos, y métodos de amplificación de ácidos nucleicos.

La expresión de un biomarcador puede evaluarse utilizando un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo radiomarcado, cromóforo, marcado con fluoróforo o marcado con enzimas), un derivado de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con un sustrato o con la proteína o ligando de un par proteína-ligando (por ejemplo, biotina-estreptavidina), o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de cadena única, un dominio hipervariable de anticuerpo aislado, etc.) que se une específicamente con una proteína biomarcadora o un fragmento de la misma, incluida una proteína biomarcadora que ha sufrido todas o una parte de las modificaciones postraducción a las que normalmente se somete en la célula tumoral (por ejemplo, glicosilación, fosforilación, metilación, etc.).

La expresión de un biomarcador también se puede evaluar mediante la preparación de ARNm/ADNc (es decir, un polinucleótido transcrito) a partir de células en una muestra de paciente, y mediante la hibridación del ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia que es un complemento de un ácido nucleico biomarcador, o fragmento del mismo.

El ADNc puede, opcionalmente, amplificarse utilizando cualquiera de una variedad de métodos de reacción en cadena de la polimerasa antes de la hibridación con el polinucleótido de referencia. La expresión de uno o más biomarcadores también se puede detectar mediante PCR cuantitativa para evaluar el nivel de expresión de los biomarcadores. Alternativamente, cualquiera de los muchos métodos conocidos para detectar mutaciones o variantes (por ejemplo, polimorfismos de un solo nucleótido, eliminaciones, etc.) de un biomarcador puede usarse para detectar la aparición de un biomarcador en un paciente.

Una mezcla de polinucleótidos transcritos obtenida de la muestra puede ponerse en contacto con un sustrato que tiene fijo un polinucleótido complementario u homólogo con al menos una porción (por ejemplo, al menos 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 500, o más residuos de nucleótidos) de un ácido nucleico biomarcador. Si los polinucleótidos complementarios a, u homólogos con, son detectables diferencialmente en el sustrato (por ejemplo, detectables utilizando diferentes cromóforos o fluoróforos, o fijados en diferentes posiciones seleccionadas), los niveles de expresión de una pluralidad de biomarcadores se pueden evaluar simultáneamente utilizando un único sustrato (por ejemplo, una micromatriz de "chip genético" de polinucleótidos fijados en posiciones seleccionadas). Cuando se usa un método para evaluar la expresión de biomarcadores que implica la hibridación de un ácido nucleico con otro, la hibridación se puede realizar en condiciones de hibridación rigurosas.

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

El nivel de expresión de un biomarcador en tejido humano normal (es decir, no canceroso) puede evaluarse de varias maneras. Este nivel normal de expresión puede evaluarse evaluando el nivel de expresión del biomarcador en una parte de las células que parece ser no cancerosa, y luego comparando el nivel normal de expresión con el nivel de expresión en una parte de las células tumorales. A medida que se disponga de más información como resultado del desempeño rutinario de los métodos descritos en este documento, se pueden usar valores promedio de la población para la expresión normal de los biomarcadores. Alternativamente, el nivel normal de expresión de un biomarcador puede determinarse evaluando la expresión del biomarcador en una muestra de paciente obtenida de un paciente no afectado por cáncer, de una muestra de paciente obtenida de un paciente antes de la aparición sospechosa de cáncer en el paciente, a partir de muestras de pacientes archivadas, y similares.

Un método de ejemplo para detectar la presencia o ausencia de una proteína biomarcadora o ácido nucleico en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica (por ejemplo, un fluido corporal asociado a un tumor) de un sujeto de prueba y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar el polipéptido o el ácido nucleico (por ejemplo, ARNm, ADN genómico o ADNc). Los métodos de detección pueden, por lo tanto, usarse para detectar ARNm, proteína, ADNc o ADN genómico, por ejemplo, en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Las técnicas *in vitro* para la detección de ARNm incluyen, por ejemplo, hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de una proteína biomarcadora incluyen, pero no se limitan a, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunotransferencias de Western, inmunoprecipitación e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de ADN genómico incluyen, por ejemplo, hibridaciones Southern. Las técnicas *in vivo* para la detección de ARNm incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de una proteína biomarcadora incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo marcado dirigido contra la proteína o fragmento de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con un marcador radioactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto se pueden detectar mediante técnicas de imagen estándar.

Un principio general de tales ensayos de diagnóstico y pronóstico implica preparar una muestra o mezcla de reacción que pueda contener un biomarcador y una sonda, en condiciones apropiadas y durante un tiempo suficiente para permitir que el biomarcador y la sonda interactúen y se unan, formando así un complejo que se puede eliminar y/o detectar en la mezcla de reacción. Estos ensayos se pueden realizar de varias maneras.

Por ejemplo, un método para realizar un ensayo de este tipo implica anclar el biomarcador o la sonda en un soporte de fase sólida, también denominado sustrato, y detectar los complejos de biomarcador/sonda objetivo anclados en la fase sólida al final de la reacción. En una realización de tal método, una muestra de un sujeto, que debe analizarse para determinar la presencia y/o concentración de biomarcador, puede anclarse en un soporte o soporte de fase sólida. En otra realización, la situación inversa es posible, en la que la sonda se puede anclar a una fase sólida y se puede permitir que una muestra de un sujeto reaccione como un componente no anclado del ensayo.

Hay varios métodos establecidos para anclar componentes de ensayo a una fase sólida. Estos incluyen, sin limitación, biomarcadores o moléculas de sonda que se inmovilizan a través de la conjugación de biotina y estreptavidina. Dichos componentes del ensayo biotinilados pueden prepararse a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) usando técnicas conocidas en el arte (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, Ill) e inmovilizados en los pozos de placas de 96 pozos recubiertos con estreptavidina (Pierce Chemical). En ciertas realizaciones, las superficies con componentes de ensayo inmovilizados pueden prepararse por adelantado y almacenarse. Otros vehículos adecuados o soportes en fase sólida para tales ensayos incluyen cualquier material capaz de unirse a la clase de

molécula a la que pertenece el biomarcador o la sonda. Soportes o vehículos bien conocidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, poliestireno, nylon, polipropileno, nylon, polietileno, dextrano, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, gabbros y magnetita. Con el fin de realizar ensayos con los enfoques mencionados anteriormente, el componente no inmovilizado se agrega a la fase sólida sobre la cual se ancla el segundo componente. Una vez que se completa la reacción, los componentes no complejos pueden eliminarse (por ejemplo, mediante lavado) en condiciones tales que cualquier complejo formado permanecerá inmovilizado sobre la fase sólida. La detección de complejos biomarcador/sonda anclados a la fase sólida se puede lograr en una serie de métodos descritos aquí. En una realización, la sonda, cuando es el componente de ensayo no anclado, puede marcarse con el fin de detectar y leer el ensayo, directa o indirectamente, con etiquetas detectables discutidas aquí y que son bien conocidas por un experto en la materia.

También es posible detectar directamente la formación del complejo biomarcador/sonda sin manipulación adicional o etiquetado de cualquiera de los componentes (biomarcador o sonda), por ejemplo, utilizando la técnica de transferencia de energía de fluorescencia (es decir, FET, véase, por ejemplo, Lakowicz et al., Patente de los Estados Unidos No 5,631,169; Stavrianopoulos, et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,868,103). Una etiqueta de fluoróforo en la primera molécula donante se selecciona de tal manera que, tras la excitación con luz incidente de longitud de onda apropiada, su energía fluorescente emitida será absorbida por una etiqueta fluorescente en una segunda molécula aceptora, que a su vez es capaz de emitir fluorescencia debido a energía absorbida. Alternativamente, la molécula de proteína donante puede simplemente utilizar la energía fluorescente natural de los residuos de triptófano. Se eligen las etiquetas que emiten diferentes longitudes de onda de la luz, de manera que la etiqueta de la molécula aceptora se puede diferenciar de la del donante. Dado que la eficiencia de la transferencia de energía entre las etiquetas está relacionada con la distancia que separa las moléculas, se pueden evaluar las relaciones espaciales entre las moléculas. En una situación en la que se produce una unión entre las moléculas, la emisión fluorescente de la marca de la molécula aceptora en el ensayo debe ser máxima. Un evento de unión a FET puede medirse convenientemente a través de medios de detección fluorométricos estándar bien conocidos en la técnica (por ejemplo, usando un fluorímetro).

En otro ejemplo, la determinación de la capacidad de una sonda para reconocer un biomarcador puede realizarse sin marcar ninguno de los componentes del ensayo (sonda o biomarcador) utilizando una tecnología tal como el Análisis de Interacción Biomolecular en tiempo real (BIA) (véase, por ejemplo, Sjolander, S. and Urbaniczky, C., 1991, Anal. Chem. 63: 2338-2345 and Szabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699-705). Como se usa en este documento, "BIA" o "resonancia de plasmón superficial" es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactivos (por ejemplo, BIAcore). Los cambios en la masa en la superficie de unión (indicativo de un evento de unión) dan como resultado alteraciones del índice de refracción de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de la resonancia de Plasmón en Superficie (SPR)), lo que resulta en una señal detectable que se puede utilizar como una indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

Alternativamente, en otro ejemplo, se pueden realizar ensayos de diagnóstico y pronóstico análogos con biomarcadores y sondas como solutos en una fase líquida. En un ensayo de este tipo, el biomarcador y la sonda complejados se separan de los componentes no complejos mediante cualquiera de una serie de técnicas estándar, que incluyen, entre otras: centrifugación diferencial, cromatografía, electroforesis e inmunoprecipitación. En la centrifugación diferencial, los complejos biomarcador/sonda pueden separarse de los componentes del ensayo no complejos a través de una serie de pasos de centrifugación, debido a los diferentes equilibrios de sedimentación de los complejos en función de sus diferentes tamaños y densidades (véase, por ejemplo, Rivas, G. and Minton), A.P., 1993, Trends Biochem. Sci. 18(8): 284-7). También se pueden utilizar técnicas cromatográficas estándar para separar moléculas complejadas de las no complejadas. Por ejemplo, la cromatografía de filtración en gel separa las moléculas en función del tamaño y mediante la utilización de una resina de filtración en gel apropiada en un formato de columna; por ejemplo, el complejo relativamente más grande se puede separar de los componentes no complejos relativamente más pequeños. De manera similar, las propiedades de carga relativamente diferentes del complejo biomarcador/sonda en comparación con los componentes no complejos pueden aprovecharse para diferenciar el complejo de los componentes no complejos, por ejemplo, a través de la utilización de resinas de cromatografía de intercambio iónico. Dichas resinas y técnicas cromatográficas son bien conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Heegaard, N.H., 1998, J. Mol. Recognit. Winter 11(1-6): 141-8; Hage, D.S. and Tweed, S.A.J Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 10 de octubre de 1997; 699(1-2): 499-525). La electroforesis en gel también se puede emplear para separar componentes de ensayo complejados de componentes no unidos (véase, por ejemplo, Ausubel et al., Ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1987-1999). En esta técnica, los complejos de proteínas o ácidos nucleicos se separan según el tamaño o la carga, por ejemplo. Con el fin de mantener la interacción de unión durante el proceso electroforético, se utilizan típicamente materiales de matriz de gel no desnaturizantes y condiciones en ausencia de agente reductor. Las condiciones apropiadas para el ensayo particular y sus componentes serán bien conocidas por los expertos en la técnica.

En otro ejemplo, el nivel de ARNm del biomarcador se puede determinar tanto en formato *in situ* como *in vitro* en una muestra biológica utilizando métodos conocidos en la técnica. El término "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células, fluidos biológicos y sus aislamientos, aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Muchos métodos de detección de expresión utilizan ARN aislado. Para métodos *in vitro*, cualquier técnica de aislamiento de ARN que no seleccione contra el aislamiento de ARNm puede utilizarse para la purificación de ARN de células tumorales (véase, por ejemplo, Ausubel et al., Ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley &

Sons, Nueva York 1987-1999). Además, se pueden procesar fácilmente grandes cantidades de muestras de tejido usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica, como, por ejemplo, el proceso de aislamiento de ARN de Chomczynski en un solo paso (1989, Patente de los Estados Unidos No. 4,843,155).

5 El ARNm aislado se puede usar en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no se limitan a, análisis Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa y matrices de sondas. Un método de diagnóstico para la detección de niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridar con el ARNm codificado por el gen que se está detectando. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud completa, o una porción del mismo, como un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente condiciones rigurosas de un ARNm o ADN genómico que codifica un biomarcador de la presente divulgación. Otras sondas adecuadas para uso en los ensayos de diagnóstico de la presente divulgación se describen en el presente documento. La hibridación de un ARNm con la sonda indica que el biomarcador en cuestión se está expresando.

15 En un formato, el ARNm se inmoviliza en una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo, ejecutando el ARNm aislado en un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm del gel a una membrana, como la nitrocelulosa. En un formato alternativo, la(s) sonda(s) se inmovilizan sobre una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con la(s) sonda(s), por ejemplo, en una matriz de chips de genes Affymetrix. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente los métodos de detección de ARNm conocidos para usar en la detección del nivel de ARNm codificado por los biomarcadores de la presente descripción.

20 Un método alternativo para determinar el nivel de biomarcador de ARNm en una muestra implica el proceso de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, mediante RT-PCR (la realización experimental es expuesta en Mullis, 1987, Patente de los Estados Unidos No. 4,683,202), reacción en cadena de la ligasa (Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 189-193), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi et al., 1988, Bio/Technology 6: 1197), replicación por balanceo en círculo (Lizardi et al., 25 Patente de los Estados Unidos No. 5,854,033) o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido de la detección de las moléculas amplificadas utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en números muy bajos. Como se usa en este documento, los cebadores de amplificación se definen como un par de moléculas de ácido nucleico que pueden aparearse en las regiones 5' o 3' de un gen (cadenas más y 30 menos, respectivamente, o viceversa) y contener una región corta en el medio. En general, los cebadores de amplificación tienen una longitud de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos y flanquean una región de aproximadamente 50 a 200 nucleótidos de longitud. En condiciones apropiadas y con reactivos apropiados, tales cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

35 Para los métodos *in situ*, el ARNm no necesita ser aislado de las células tumorales antes de la detección. En tales métodos, una muestra de células o tejido se prepara y/o procesa utilizando métodos histológicos conocidos. La muestra se inmoviliza luego sobre un soporte, típicamente un portaobjetos de vidrio, y luego se pone en contacto con una sonda que puede hibridar con el ARNm que codifica el biomarcador.

40 Como alternativa al realizar determinaciones basadas en el nivel de expresión absoluto del biomarcador, las determinaciones pueden basarse en el nivel de expresión normalizado del biomarcador. Los niveles de expresión se normalizan corrigiendo el nivel de expresión absoluto de un biomarcador comparando su expresión con la expresión de un gen que no es un biomarcador, por ejemplo, un gen de mantenimiento que se expresa de forma constitutiva. Los genes adecuados para la normalización incluyen genes de mantenimiento, tales como el gen de la actina, o genes específicos de células epiteliales. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra, 45 por ejemplo, una muestra de paciente, con otra muestra, por ejemplo, una muestra no tumoral, o entre muestras de diferentes fuentes.

Alternativamente, el nivel de expresión puede proporcionarse como un nivel de expresión relativo. Para determinar un nivel de expresión relativo de un biomarcador (por ejemplo, un biomarcador mesenquimático), el nivel de expresión del biomarcador se determina para 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, o 50 o más muestras de normal contra los aislamientos de células cancerosas antes de la determinación del nivel de expresión para la muestra en cuestión. Se determina el nivel de expresión medio de cada uno de los genes analizados en el mayor número de muestras y se utiliza como nivel de expresión de referencia para el biomarcador. El nivel de expresión del biomarcador determinado para la muestra de prueba (nivel absoluto de expresión) se divide por el valor de expresión medio obtenido para ese biomarcador. Esto proporciona un nivel de expresión relativa.

55 En otro ejemplo de la presente divulgación, se detecta una proteína biomarcadora. Un tipo de agente para detectar la proteína biomarcadora de la invención es un anticuerpo capaz de unirse a una proteína de este tipo o un fragmento de la misma tal como, por ejemplo, un anticuerpo marcado de manera detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Se puede usar un anticuerpo intacto, o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fv, scFv, polipéptido de cadena de unión única). El término "marcación", con respecto a la sonda 60 o el anticuerpo, pretende incluir el marcación directa de la sonda o el anticuerpo mediante el acoplamiento (es decir,

la unión física) de una sustancia detectable a la sonda o el anticuerpo, así como la marcación indirecta de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está directamente marcado. Ejemplos de marcación indirecta incluyen la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y la marcación final de una sonda de ADN con biotina, de manera que se puede detectar con estreptavidina marcada con fluorescencia.

Las proteínas de las células tumorales se pueden aislar utilizando técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos de aislamiento de proteínas empleados pueden ser, por ejemplo, los descritos en Harlow and Lane (Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Se puede emplear una variedad de formatos para determinar si una muestra contiene una proteína que se une a un anticuerpo dado. Ejemplos de tales formatos incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), análisis de inmunotransferencia Western y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente los métodos conocidos de detección de proteínas/anticuerpos para determinar si las células tumorales expresan un biomarcador de la presente descripción.

En un formato, se pueden usar anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos o derivados, en métodos tales como inmunotransferencias Western o técnicas de inmunofluorescencia para detectar las proteínas expresadas. En tales usos, el anticuerpo o las proteínas pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido. Los soportes o soportes de fase sólida adecuados incluyen cualquier soporte capaz de unirse a un antígeno o un anticuerpo. Los soportes o vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabbros y magnetita. Un experto en la técnica conocerá muchos otros vehículos adecuados para unir un anticuerpo o antígeno, y será capaz de adaptar dicho soporte para su uso con la presente invención. Por ejemplo, la proteína aislada de las células tumorales se puede ejecutar en una electroforesis en gel de poliacrilamida y se puede inmovilizar en un soporte de fase sólida como la nitrocelulosa. El soporte se puede lavar luego con reguladores adecuados seguido de un tratamiento con el anticuerpo marcado de forma detectable. El soporte de fase sólida se puede lavar con el regulador una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de etiqueta unida en el soporte sólido puede ser detectada por medios convencionales.

Para los ensayos ELISA, los pares de unión específicos pueden ser del tipo inmune o no inmune. Los pares de unión específicos inmunes se ejemplifican mediante sistemas antígeno-anticuerpo o sistemas hapteno/anti-hapteno. Se pueden mencionar fluoresceína/anti-fluoresceína, dinitrofenilo/anti-dinitrofenilo, biotina/anti-biotina, péptido/antipéptido y similares. El miembro de anticuerpo del par de unión específico puede producirse por métodos habituales familiares para los expertos en la técnica. Tales métodos implican la inmunización de un animal con el miembro antígeno del par de unión específico. Si el miembro antígeno del par de unión específico no es inmunogénico, por ejemplo, un hapteno, se puede acoplar covalentemente a una proteína transportadora para hacerla inmunogénica. Los pares de unión no inmunes incluyen sistemas en los que los dos componentes comparten una afinidad natural entre sí pero no son anticuerpos. Ejemplos de pares no inmunes son biotina-estreptavidina, factor intrínseco-vitamina B12, proteína de unión a ácido fólico-folato y similares.

Se dispone de una variedad de métodos para marcar covalentemente los anticuerpos con miembros de pares de unión específicos. Los métodos se seleccionan en función de la naturaleza del miembro del par de unión específico, el tipo de enlace deseado y la tolerancia del anticuerpo a diversas químicas de conjugación. La biotina se puede acoplar covalentemente a los anticuerpos utilizando derivados activos disponibles comercialmente. Algunos de estos son biotina-N-hidroxi-succinimida que se une a los grupos amino en las proteínas; hidrazida biotina que se une a unidades estructurales de hidratos de carbono, aldehídos y grupos carboxilo mediante un acoplamiento carbodiimida; y maleimida biotina y yodoacetilbiotina que se unen a grupos sulfhidrilo. La fluoresceína se puede acoplar a grupos amina de proteína usando isotiocianato de fluoresceína. Los grupos dinitrofenilo se pueden acoplar a grupos amina de proteína utilizando 2,4-dinitrobenceno sulfato o 2,4-dinitrofluorobenceno. Se pueden emplear otros métodos estándar de conjugación para acoplar anticuerpos monoclonales a un miembro de un par de unión específico que incluye dialdehído, acoplamiento de carbodiimida, reticulación homofuncional y reticulación heterobifuncional. El acoplamiento de carbodiimida es un método eficaz para acoplar grupos carboxilo en una sustancia a grupos amina en otra. El acoplamiento de carbodiimida se facilita utilizando el reactivo comercialmente disponible 1-etil-3-(dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC).

Los reticuladores homobifuncionales, incluidos los imidoésteres bifuncionales y los ésteres bifuncionales de N-hidroxisuccinimida, están disponibles comercialmente y se emplean para unir grupos amina en una sustancia con grupos amina en otra. Los reticuladores heterobifuncionales son reactivos que poseen diferentes grupos funcionales. Los reticuladores heterobifuncionales disponibles en el mercado más comunes tienen un éster de N-hidroxisuccinimida reactivo con amina como un grupo funcional, y un grupo reactivo con sulfhidrilo como segundo grupo funcional. Los grupos reactivos de sulfhidrilo más comunes son maleimidas, disulfuros de piridilo y halógenos activos. Uno de los grupos funcionales puede ser un aril nitreno fotoactivo, que al reaccionar reacciona con una variedad de grupos.

El anticuerpo marcado de manera detectable o el miembro marcado de manera detectable del par de unión específico se prepara acoplando a un indicador, que puede ser un isótopo radiactivo, enzima, fluorógeno, materiales quimioluminiscentes o electroquímicos. Dos isótopos radiactivos de uso común son  $^{125}\text{I}$  y  $^3\text{H}$ . Los procedimientos

estándar de marcación isotópica radioactiva incluyen los métodos de cloramina T, lactoperoxidasa y Bolton-Hunter para  $^{125}\text{I}$  y metilación reductiva para  $^3\text{H}$ . El término "marcada de forma detectable" se refiere a una molécula marcada de tal manera que puede detectarse fácilmente por la actividad enzimática intrínseca de la etiqueta o por la unión a la etiqueta de otro componente, que a su vez puede detectarse fácilmente.

- 5 Las enzimas adecuadas para uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucosa oxidasa, luciferasas, incluyendo luciérnaga y renilla,  $\beta$ -lactamasa, ureasa, proteína fluorescente verde (GFP) y la lisozima. La marcación enzimática se facilita utilizando dialdehído, acoplamiento de carbodiimida, reticuladores homobifuncionales y reticuladores heterobifuncionales como se describió anteriormente para acoplar un anticuerpo con un miembro de un par de unión específico.
- 10 El método de marcación elegido depende de los grupos funcionales disponibles en la enzima y el material por marcar, y la tolerancia de ambos a las condiciones de conjugación. El método de marcación utilizado en la presente invención puede ser uno de, pero no limitado a, cualquier método convencional empleado actualmente, incluidos los descritos por Engvall y Pearlmann, *Immunochemistry* 8, 871 (1971), Avrameas and Temyck, *Immunochemistry* 8, 1175 (1975), Ishikawa et al., *J. Immunoassay* 4(3): 209-327 (1983) y Jablonski, *Anal. Biochem.* 148: 199 (1985).
- 15 La marcación puede lograrse mediante métodos indirectos, como el uso de espaciadores u otros miembros de pares de unión específicos. Un ejemplo de esto es la detección de un anticuerpo biotinilado con estreptavidina no marcada y enzima biotinilada, y la estreptavidina y la enzima biotinilada se agregan de forma secuencial o simultánea. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, el anticuerpo usado para detectar puede estar marcado de forma detectable directamente con un informador o indirectamente con un primer miembro de un par de unión específico.
- 20 Cuando el anticuerpo se acopla a un primer miembro de un par de unión específico, entonces la detección se efectúa haciendo reaccionar el primer miembro del anticuerpo de un complejo de unión específico con el segundo miembro del par de unión que está marcado o no marcado como se mencionó anteriormente.

Además, el anticuerpo detector no marcado puede detectarse haciendo reaccionar el anticuerpo no marcado con un anticuerpo marcado específico para el anticuerpo no marcado. En este caso, "marcado de manera detectable", como se usa anteriormente, se entiende que contiene un epítipo por el cual se puede unir un anticuerpo específico para el anticuerpo no marcado. Dicho anti-anticuerpo se puede marcar directa o indirectamente usando cualquiera de los enfoques discutidos anteriormente. Por ejemplo, el anti-anticuerpo se puede acoplar a la biotina que se detecta al reaccionar con el sistema de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante discutido anteriormente. Así, en una realización, se utiliza biotina. El anticuerpo biotinilado reacciona a su vez con estreptavidina-complejo de peroxidasa de rábano picante. La ortofenilendiamina, 4-cloro-naftol, tetrametilbenzidina (TMB), ABTS, BTS o ASA se pueden usar para la detección cromogénica.

25

30

En un formato de inmunoensayo para poner en práctica esta invención, se usa un ensayo de sándwich directo en donde el reactivo de captura se ha inmovilizado, utilizando técnicas convencionales, sobre la superficie de un soporte. Los soportes adecuados utilizados en los ensayos incluyen soportes poliméricos sintéticos, tales como polipropileno, poliestireno, poliestireno sustituido, por ejemplo, poliestireno aminado o carboxilado, poliacrilamidas, poliamidas, cloruro de polivinilo, perlas de vidrio, agarosa o nitrocelulosa.

35

#### IV. Anticuerpos anti-LOXL2

En este documento se proporcionan anticuerpos que pueden usarse para diagnosticar angiogénesis y enfermedades asociadas, fibrosis y enfermedades asociadas, tumores o metástasis. En el presente documento se proporcionan anticuerpos que inhiben la angiogénesis y las enfermedades asociadas, inhiben la fibrosis y las enfermedades asociadas, y tratan tumores o metástasis. En el presente documento se proporcionan anticuerpos que pueden usarse para monitorizar la eficacia de los regímenes y protocolos de tratamiento y similares como se describe a lo largo de la presente solicitud y conocidos en la técnica. Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígenos útiles en tales métodos son aquellos, por ejemplo, que se unen específicamente a LOXL2.

40

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

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

50

Como se usa en este documento, "inmunorreactivo" se refiere a anticuerpos o fragmentos de los mismos que son específicos de una secuencia de residuos de aminoácidos ("sitio de unión" o "epítipo"), aunque si son reactivos cruzados a otros péptidos/proteínas, no son tóxicos en los niveles en los que están formulados para su administración para uso humano. "Epítipo" se refiere a la porción de un antígeno capaz de formar una interacción de unión con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Dicha interacción de unión puede manifestarse como un contacto intermolecular con uno o más residuos de aminoácidos de una CDR. La unión al antígeno puede implicar un

55

CDR3 o un par CDR3. Un epítipo puede ser una secuencia peptídica lineal (es decir, "continua") o puede estar compuesta de secuencias de aminoácidos no contiguas (es decir, "conformacional" o "discontinua"). El término "se une preferentemente" significa que el agente de unión se une al sitio de unión con mayor afinidad que a las secuencias de aminoácidos no relacionadas.

5 Como se usa en este documento, el término "afinidad" se refiere a la constante de equilibrio para la unión reversible de dos agentes y se expresa como una constante de disociación (Kd). La afinidad puede ser al menos 1 veces mayor, al menos 2 veces mayor, al menos 3 veces mayor, al menos 4 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 6 veces mayor, al menos 7 veces mayor, al menos 8 veces mayor, al menos 9 veces mayor, al menos 10 veces mayor, al menos 20 veces mayor, al menos 30 veces mayor, al menos 40 veces mayor, al menos 50 veces mayor, al menos 60 veces mayor, al menos 70 veces mayor, al menos 80 veces mayor, al menos 90 veces mayor, al menos 100 veces mayor, o al menos 1000 veces mayor, o más, que la afinidad de un anticuerpo para secuencias de aminoácidos no relacionadas. La afinidad de un anticuerpo a una proteína diana puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nanomolar (nM) a aproximadamente 0.1 nM, de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 1 picomolar (pM), o de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 1 femtomolar (fM) o más. Como se usa en el presente documento, el término "avidez" se refiere a la resistencia de un complejo de dos o más agentes a la disociación después de la dilución. Los términos "inmunorreactivos" y "se une preferentemente" se usan de manera intercambiable en este documento con respecto a anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno.

El término "anticuerpo" también incluye moléculas que se han diseñado mediante el uso de técnicas de biología molecular para incluir solo porciones de la molécula nativa, siempre que esas moléculas tengan la capacidad de unirse a un antígeno particular o secuencia de aminoácidos con la especificidad requerida. Tales moléculas de anticuerpo alternativas incluyen porciones clásicamente conocidas de las moléculas de anticuerpos, anticuerpos de cadena única y moléculas de unión de cadena única.

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

25 Como se usa en el presente documento, el término "CDR" o "región determinante de la complementariedad" pretende significar los sitios de combinación de antígenos no contiguos encontrados dentro de la región variable de polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. Estas regiones particulares han sido descritas por Kabat et al., J. Biol. Chem. 252: 6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services., "Sequences of proteins of immunological interest" (1991); por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); y MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996), donde las definiciones incluyen superposición o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, se pretende que la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o anticuerpos injertados o sus variantes esté dentro del alcance del término como se define y se usa en este documento. Los residuos de aminoácidos que abarcan las CDR como se definen en cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen a continuación en la Tabla 1 como una comparación.

35 Tabla 1: Definiciones de CDR

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

<sup>1</sup> La numeración de los residuos sigue la nomenclatura de Kabat et al., Supra

<sup>2</sup> La numeración de los residuos sigue la nomenclatura de Chothia et al., Supra

<sup>3</sup> La numeración de los residuos sigue la nomenclatura de MacCallum et al., Supra

Como se usa en el presente documento, el término "marco" cuando se usa en referencia a una región variable de anticuerpo pretende significar todos los residuos de aminoácidos fuera de las regiones CDR dentro de la región variable de un anticuerpo. Un marco de región variable es generalmente una secuencia de aminoácidos discontinua entre aproximadamente 100-120 aminoácidos de longitud, pero pretende hacer referencia solo a aquellos aminoácidos fuera de las CDR. Tal como se usa en el presente documento, el término "región marco" pretende significar cada dominio del marco que está separado por las CDR.

"Un inhibidor de la actividad LOXL2" puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que inhibe directa o indirectamente la actividad de la lisil oxidasa, que incluye, pero no se limita a la expresión de genes, la modificación posterior a la traducción, el procesamiento o escisión enzimática, la unión a un modulador de LOXL2, actividad enzimática de LOXL2 o cualquier otra actividad descrita en este documento.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a un agente de unión aislado o recombinante que comprende las secuencias de región variable necesarias para unirse específicamente a un epítipo antigénico. Por lo tanto, un anticuerpo es cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que exhibe la actividad biológica deseada, por ejemplo, que se une al antígeno diana específico. Por lo tanto, se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales (incluidos los anticuerpos monoclonales de longitud completa), los anticuerpos policlonales, los anticuerpos humanos, los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos) y los fragmentos de anticuerpos, entre los que se incluyen no se limita a polipéptidos de unión de cadena simple, VH, VL, Fv, scFv, Fab y Fab2, etc., siempre que exhiban la actividad biológica deseada. El término "anticuerpo humano", por lo tanto, se refiere a los anticuerpos que contienen secuencias de origen humano, a excepción de posibles regiones CDR no humanas, y no implica que la estructura completa de una molécula de Ig esté presente, solo que el anticuerpo tiene una inmunogenicidad mínima en un humano.

El término "unión" se refiere a una asociación directa entre dos moléculas, debido a, por ejemplo, interacciones covalentes, electrostáticas, hidrófobas e iónicas y/o de enlaces de hidrógeno, que incluyen interacciones tales como puentes salinos y puentes de agua. El término "unión específica" es aplicable a una situación en la que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no muestra ninguna unión significativa a moléculas distintas de su epítipo. En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a LOXL2 humano con una constante de disociación Kd igual o inferior a aproximadamente 100 nM, inferior a aproximadamente 10 nM, inferior a aproximadamente 1 nM, inferior a aproximadamente 0.5 nM, inferior a aproximadamente 0.1 nM, inferior a aproximadamente 0.01 nM, o inferior a aproximadamente 0.005 nM medido a una temperatura de aproximadamente 4°C, 25°C, 37°C o 42°C.

Se pueden usar métodos convencionales para preparar anticuerpos. Por ejemplo, al usar un péptido o una proteína lisil oxidasa de longitud completa, se pueden hacer antisueros policlonales o anticuerpos monoclonales usando métodos estándar. Un mamífero, (por ejemplo, un ratón, hámster o conejo) puede inmunizarse con una forma inmunogénica del péptido que provoca una respuesta de anticuerpos en el mamífero. Las técnicas para conferir inmunogenicidad mejorada a un péptido incluyen la conjugación a portadores u otras técnicas bien conocidas en el arte. Por ejemplo, la proteína o el péptido se pueden administrar en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización puede controlarse mediante la detección de títulos de anticuerpos en plasma o suero. El ELISA estándar u otros procedimientos de inmunoensayo se pueden usar con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos. Después de la inmunización, se pueden obtener antisueros y, si se desea, anticuerpos policlonales aislados de los sueros.

Los anticuerpos pueden generarse en cultivos celulares, en fagos o en varios animales, incluyendo vacas, conejos, cabras, ratones, ratas, hámsteres, cobayas, ovejas, perros, gatos, monos, chimpancés, simios. Por lo tanto, un anticuerpo útil en los presentes métodos es típicamente un anticuerpo de mamífero. Se pueden usar técnicas de fagos para aislar un anticuerpo inicial o para generar variantes con especificidad alterada o características de avidéz. Tales técnicas son rutinarias y bien conocidas en el arte. En una realización, el anticuerpo se produce por medios recombinantes conocidos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo recombinante puede producirse mediante la transfección de una célula huésped con un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica el anticuerpo. Se pueden usar uno o más vectores para transfectar la secuencia de ADN que expresa al menos una región VL y una región VH en la célula huésped. Las descripciones de ejemplo de los medios recombinantes de generación y producción de anticuerpos incluyen Delves, *Antibody Production: Essential Techniques* (Wiley, 1997); Shephard, et al., *Monoclonal Antibodies* (Oxford University Press, 2000); and Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (Academic Press, 1993).

Los anticuerpos también se pueden hacer de acuerdo con el protocolo descrito por Kenney, et al. ("Production of monoclonal antibodies using a secretion capture report web". *Biotechnology* 13: 787-790, 1995). Brevemente, los ratones son inyectados por vía subcutánea (s.c.), con antígeno en una formulación adyuvante. Para los antígenos peptídicos, los péptidos se conjugan con albúmina de suero bovino y se formulan en adyuvante de Freund (FA) antes de la inmunización. Para los antígenos proteicos, la proteína se formula en adyuvante Alhidrogel-Muramil Dipéptido (ALD/MDP). Las células del bazo y los ganglios linfáticos de los ratones se aíslan y fusionan con células apropiadas y se cultivan. Se aísla una biblioteca de hibridomas de células seleccionadas por HAT y se clona. Las células se clasifican y los sueros y los sobrenadantes se examinan para detectar la presencia de anticuerpos.

- Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, y pueden incluir la región variable o de unión a antígeno de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv, fragmentos scFv, diacuerpos, anticuerpos lineales (Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)), moléculas de anticuerpo de cadena simple, los polipéptidos de unión a cadena única y los anticuerpos multiespecíficos se forman a partir de fragmentos de anticuerpos. La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígenos idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación de antígeno y aún es capaz de entrecruzar el antígeno.
- Un "polipéptido de unión a cadena única" se refiere a un polipéptido que tiene una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera y, opcionalmente, una región Fc de inmunoglobulina. Dicha molécula es un fragmento variable de cadena única que tiene opcionalmente una función efectora a través de la presencia de la región Fc de inmunoglobulina. Los métodos de preparación de polipéptidos de unión de cadena única son conocidos en la técnica (por ejemplo, la Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2005/0238646).
- "Fv" se refiere a un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a antígeno. Esta región consta de un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una ligera en una asociación estrecha y no covalente. Es en esta configuración que los tres CDRS de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis CDR confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad más baja que el sitio de unión completo.
- Un fragmento "Fab" contiene un "Fv" y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada, que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación aquí para Fab' en la que el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas articuladas entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.
- Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada (Fc) que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.
- Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa o " $\kappa$ " y lambda o " $\lambda$ ", en función de las secuencias de aminoácidos de su constante dominios.
- Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "sFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Un polipéptido Fv puede incluir, además, si es necesario, un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL, que permite que el sFv forme una estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).
- El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que contienen un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Al utilizar 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 más detalladamente en, por ejemplo, el documento EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl Acad Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).
- Un anticuerpo también puede ser un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, quiméricos, humanos o humanizados que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es LOXL2, la otra es para cualquier otro antígeno, tal como, por ejemplo, una proteína de superficie celular o un receptor o subunidad de receptor. En realizaciones adicionales, un anticuerpo biespecífico es específico para LOX y LOXL2.
- Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein and Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos

hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta generalmente se realiza mediante pasos de cromatografía de afinidad. Procedimientos similares se describen en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Trauneker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

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

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

25 Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos  $F(ab')_2$ ). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descrito en la literatura. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos utilizando un enlace químico. Brennan et al., *Science* 229: 81 (1985) describen un procedimiento en donde los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos  $F(ab')_2$ . Estos fragmentos se reducen en presencia del arsenito sódico del agente complejante de ditiol para estabilizar los ditiolos vecinales y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten luego en derivados de  
30 tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte luego en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

35 Los fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Medicina*. 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula  $F(ab')_2$  de anticuerpo biespecífico completamente humanizada. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a las células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y las células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos contra objetivos de tumores de mama humanos.

40 También se han descrito diversas técnicas para hacer y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego se volvieron a oxidar  
45 para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la  
50 misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento se obligan a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado otra estrategia para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena única (sFv). véase, Gruber et al., *J. Immunol.* 152: 5368 (1994).

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

60 Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo pueden unirse a dos epítopos diferentes en un polipéptido LOXL2 dado en este documento. Alternativamente, un brazo polipeptídico anti-LOXL2 puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28 o B7) o receptores Fc para IgG (FcγR), como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para enfocar los mecanismos de defensa celular a la célula que expresa un polipéptido objetivo particular. Los anticuerpos biespecíficos

también se pueden usar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan un polipéptido objetivo particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión al objetivo y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante de radionúclidos, como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al polipéptido diana y además se une al factor tisular (TF).

5 El anticuerpo anti-LOXL2 también puede ser un anticuerpo heteroconjugado. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (Patente de los Estados Unidos No. 4,676,980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360 y WO 92/200373). Los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluidos aquellos que involucran agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen, pero no se limitan a, iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 4,676,980.

10 Puede ser deseable modificar un anticuerpo anti-LOXL2 con respecto a la función efectora, a fin de mejorar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo para tratar o prevenir la metástasis del cáncer. Por ejemplo, los residuos de cisteína pueden introducirse en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o un aumento de la destrucción celular mediada por el complemento y una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Véase Caron et al., J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral aumentada también pueden prepararse utilizando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff et al. Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, un anticuerpo puede diseñarse con regiones Fc duales y, por lo tanto, puede tener capacidades mejoradas de lisis del complemento y ADCC. Véase Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989).

15 Un "anticuerpo aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir, por ejemplo, enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteínicos. En una realización, un anticuerpo se purificará (1) a más del 80%, 85%, 90%, 95% o 99% en peso de anticuerpo según lo determinado por el método de Lowry, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuestrador de copa giratoria y/o (3) a la homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o plata. El término "anticuerpo aislado" incluye dentro de su alcance un anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. En general, el aislamiento de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo incluirá al menos una etapa de purificación.

20 Un anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) incluyen, por ejemplo, inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (como Fv, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, polipéptido de unión de cadena única, VH, VL, u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen a antígenos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos quiméricos incluyen aquellos en los que las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se combinan con las regiones constantes humanas (Fc). Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región determinante complementaria (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como el ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del marco Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las CDR o secuencias marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana.

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

30 Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos "importados" o "donantes", que típicamente se toman de un dominio variable "importado" o "donante". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988)); Verhoeven et al. Science, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" incluyen anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567), en los que sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales algunos

residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en el arte, que incluyen bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)). Las técnicas de Cole et al. and Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1): 86 -95 (1991)). De manera similar, los anticuerpos humanos se pueden producir mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Tras el ataque, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluido el reordenamiento de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812 13 (1994); Fishwald et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

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

Las inmunoglobulinas humanizadas, incluidos los anticuerpos humanizados, se han construido mediante ingeniería genética. La mayoría de las inmunoglobulinas humanizadas que se han descrito anteriormente han comprendido un marco que es idéntico al marco de una cadena de inmunoglobulina humana particular (es decir, un aceptor o receptor), y tres CDR de una cadena de inmunoglobulina no humana (donante). Como se describe en el presente documento, la humanización también puede incluir criterios por los cuales se identifica un número limitado de aminoácidos en el marco de una cadena de inmunoglobulina humanizada y se eligen para ser los mismos que los aminoácidos en esas posiciones en el donante en lugar de en el aceptor, para aumentar la afinidad de un anticuerpo que comprende la cadena de inmunoglobulina humanizada.

La presente invención se basa en parte en el modelo de que dos causas que contribuyen a la pérdida de afinidad en los medios anteriores para producir anticuerpos humanizados (utilizando como ejemplos los anticuerpos de ratón como fuente de CDR) son: (1) cuando las CDR de ratón se combinan con un marco humano, los aminoácidos en los marcos cercanos a las CDR se convierten en humanos en lugar de ratón. Sin pretender imponer ninguna teoría, estos aminoácidos modificados pueden distorsionar ligeramente las CDR (por ejemplo, pueden crear diferentes fuerzas electrostáticas o hidrofóbicas que en el anticuerpo del ratón donante, y las CDR distorsionadas pueden no tener contactos tan efectivos con el antígeno como las CDRs hicieron en el anticuerpo donante); (2) también, los aminoácidos en el anticuerpo de ratón original que están cerca, pero no son parte de, las CDR (es decir, aún son parte del marco), pueden hacer contactos con el antígeno que contribuye a la afinidad. Estos aminoácidos se pierden cuando el anticuerpo se humaniza porque, en general, todos los aminoácidos del marco se hacen humanos. Para evitar estos problemas, y para producir anticuerpos humanizados que tienen una afinidad muy fuerte por un antígeno deseado, los anticuerpos humanizados y sus fragmentos que se fusionan con el antígeno se pueden construir utilizando uno o más de los siguientes principios.

Un principio es que, como aceptor, se usa un marco de una inmunoglobulina humana particular que es inusualmente homóloga a la inmunoglobulina donante para humanizarse, o se usa un marco de consenso de muchos anticuerpos humanos como aceptor. Por ejemplo, la comparación de la secuencia de una región variable de cadena pesada (o ligera) de ratón contra regiones variables humanas (o ligeras) en un banco de datos (por ejemplo, el National Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource o la base de datos de secuencias de proteínas del National Center for Biotechnology Information (NCBI,)) muestra que la extensión de la homología a diferentes regiones humanas puede variar mucho, por ejemplo, de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80% o más. Al elegir como inmunoglobulina aceptadora una de las regiones variables de la cadena pesada humana que es más homóloga a la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina donadora, se cambiarán menos aminoácidos al pasar de la inmunoglobulina donadora a la inmunoglobulina humanizada. Al elegir como inmunoglobulina aceptadora una de las regiones variables de la cadena ligera humana que es más homóloga a la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina donadora, se cambiarán menos aminoácidos al pasar de la inmunoglobulina donadora a la inmunoglobulina humanizada. En general, al usar tales técnicas, existe una posibilidad reducida de cambiar un aminoácido cerca de una o más de las CDR que distorsionan su conformación. Además, la forma general precisa de un anticuerpo humanizado que comprende la cadena de inmunoglobulina humanizada puede parecerse más a la forma del anticuerpo donante, reduciendo así la posibilidad de distorsionar la CDRS.

También se pueden usar cadenas ligeras y pesadas del mismo anticuerpo humano que las secuencias aceptoras, para mejorar la probabilidad de que las cadenas ligeras y pesadas humanizadas hagan contactos favorables entre sí. Alternativamente, también se pueden usar cadenas ligeras y pesadas de diferentes secuencias de línea germinal de anticuerpos humanos como secuencias aceptoras; cuando se usan tales combinaciones, se puede determinar

fácilmente si V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se unen a un epítipo de interés usando ensayos convencionales (por ejemplo, un ELISA). En un ejemplo, se elegirá el anticuerpo humano en donde las secuencias de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada, tomadas juntas, son en general más homólogas a las secuencias de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del donante. A veces se le dará mayor peso a la secuencia de la cadena pesada. Independientemente de cómo se elija la inmunoglobulina aceptora, en algunos casos, se puede lograr una afinidad más alta seleccionando un pequeño número de aminoácidos en el marco de la cadena de inmunoglobulina humanizada para que sean los mismos que los aminoácidos en esas posiciones en el donante que en el aceptador. Los métodos de maduración por afinidad son conocidos en la técnica.

Los anticuerpos humanizados generalmente tienen al menos tres ventajas potenciales sobre los anticuerpos de ratón o quiméricos para uso en terapia humana. Debido a que la parte efectora de un anticuerpo es humana, se cree que interactúa mejor con las otras partes del sistema inmunitario humano (por ejemplo, destruye las células diana de manera más eficiente mediante la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)). Además, el sistema inmunitario humano no debe reconocer el marco o la región constante del anticuerpo humanizado como extraño, y por lo tanto la respuesta del anticuerpo contra tal anticuerpo inyectado debe ser menor que contra un anticuerpo de ratón totalmente extraño o un anticuerpo quimérico parcialmente extraño. Finalmente, se sabe que los anticuerpos de ratón tienen una vida media en la circulación humana que es mucho más corta que la vida media de los anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanizados pueden, presumiblemente, tener una vida media más similar a los anticuerpos humanos naturales, lo que permite administrar dosis más pequeñas y menos frecuentes.

La humanización de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se puede lograr a través de una variedad de métodos conocidos en la técnica y descritos en este documento. De manera similar, la producción de anticuerpos humanizados también se puede lograr a través de métodos conocidos en la técnica y descritos en este documento.

Los métodos para modificaciones de regiones marco se conocen en la técnica y se contemplan en el presente documento. La selección de una o más posiciones de aminoácidos del marco relevante para ser alteradas depende de una variedad de criterios. Un criterio para seleccionar los aminoácidos del marco relevante para cambiar puede ser las diferencias relativas en los residuos del marco de aminoácidos entre las moléculas donadoras yceptoras. La selección de las posiciones de marco relevantes para alterar el uso de este enfoque tiene la ventaja de evitar cualquier sesgo subjetivo en la determinación de residuos o cualquier sesgo en la contribución de afinidad de unión a CDR por parte del residuo.

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

La frecuencia de un residuo de aminoácido en una posición de marco particular es otro criterio que se puede usar para seleccionar las posiciones de aminoácidos de marco relevantes para cambiar. Por ejemplo, la comparación del marco seleccionado con otras secuencias marco dentro de su subfamilia puede revelar residuos que ocurren en frecuencias menores en una posición o posiciones en particular. Las posiciones que albergan residuos menos abundantes son igualmente aplicables para la selección como una posición para alterar en el marco de la región variable aceptora.

Las posiciones de aminoácidos relevantes para cambiar también pueden seleccionarse, por ejemplo, basándose en la proximidad a una CDR. En ciertos contextos, los residuos de FR pueden participar en la conformación de CDR y/o la unión al antígeno. Además, este criterio puede usarse de manera similar para priorizar las posiciones relevantes seleccionadas por otros criterios descritos en este documento. Por lo tanto, la diferenciación entre residuos proximales y distales a una o más CDR representa una forma de reducir el número de posiciones relevantes para cambiar.

Otros criterios para seleccionar las posiciones de marco de aminoácidos relevantes para alterar incluyen, por ejemplo, residuos que se sabe o se predice que residen en un espacio tridimensional cerca de la interfaz antígeno-CDR o que se predice que modularán la actividad de CDR. De manera similar, se pueden seleccionar los residuos de la estructura que se conocen, o se prevé, que forman contactos entre la interfaz de la región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) y ligera (V<sub>L</sub>). Dichas posiciones de la estructura pueden afectar a la conformación y/o afinidad de una CDR mediante la modulación de la bolsa de unión de la CDR, la interacción antígeno (epítipo) o la interacción V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>. Por lo tanto, la selección de estas posiciones de aminoácidos para construir una población diversa para la exploración de la actividad de unión se puede usar para identificar cambios en el marco que sustituyen a los residuos que tienen efectos perjudiciales en la conformación de CDR o compensar los efectos perjudiciales de los residuos que se producen en otras partes del marco.

Otros residuos del marco que pueden seleccionarse para la alteración incluyen posiciones de aminoácidos que son inaccesibles para el disolvente. Dichos residuos generalmente están enterrados en la región variable y, por lo tanto, son capaces de influir en la conformación de las interacciones CDR o V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>. La accesibilidad del disolvente se puede

predecir, por ejemplo, a partir de la hidrofobicidad relativa del entorno creado por las cadenas laterales de aminoácidos del polipéptido y/o por datos estructurales tridimensionales conocidos.

5 Tras la selección de las posiciones de aminoácidos relevantes en las CDR del donante, así como cualquier posición de aminoácidos relevante en las regiones marco que se desea variar, los cambios de aminoácidos en algunas o en todas las posiciones seleccionadas pueden incorporarse en los ácidos nucleicos codificantes para el marco de la región variable aceptora y las CDR de donantes. El marco alterado o las secuencias de CDR se pueden hacer y probar individualmente, o se pueden combinar y probar de forma secuencial o simultánea.

10 La variabilidad en cualquiera o en todas las posiciones alteradas puede variar desde unos pocos hasta una pluralidad de diferentes residuos de aminoácidos, incluidos los veinte aminoácidos naturales o equivalentes funcionales y análogos de los mismos. En algunos casos, los aminoácidos no naturales también pueden considerarse y son conocidos en la técnica.

15 La selección del número y la ubicación de las posiciones de aminoácidos para variar es flexible y puede depender del uso previsto y la eficiencia deseada para la identificación de la región variable alterada que tiene una actividad deseable tal como una afinidad de unión sustancialmente mayor o igual en comparación con la región variable donante. En este sentido, cuanto mayor sea el número de cambios que se incorporan a una población de la región variable alterada, más eficiente será identificar al menos una especie que muestre una actividad deseable, por ejemplo, sustancialmente la misma o mayor afinidad de unión que el donante. Alternativamente, cuando el usuario tiene datos empíricos o reales que afectan a que ciertos residuos o posiciones de aminoácidos contribuyen desproporcionadamente a la afinidad de unión, entonces puede ser deseable producir una población limitada de regiones variables alteradas que se centre en los cambios dentro o alrededor de los residuos identificados o posiciones.

20 Por ejemplo, si se desean regiones variables injertadas con CDR, una gran población diversa de regiones variables alteradas puede incluir todas las posiciones de región marco no idénticas entre el marco donante y el receptor y todos los cambios de posición de aminoácidos de CDR individuales. Alternativamente, una población de diversidad intermedia puede incluir subconjuntos, por ejemplo, de solo las posiciones de marco proximales no idénticas que se incorporarán junto con todos los cambios de posición de aminoácidos de CDR individuales para, por ejemplo, aumentar la afinidad de los anticuerpos humanizados o los fragmentos de unión a antígeno. La diversidad de las poblaciones anteriores se puede aumentar aún más, por ejemplo, incluyendo además todos los cambios de posición de aminoácidos de CDR por pares. En contraste, las poblaciones que se enfocan en residuos o posiciones predeterminadas que incorporan residuos variantes en tan solo un marco y/o una posición de aminoácido CDR pueden construirse de manera similar para la detección e identificación de una región variable de anticuerpo alterada. Al igual que con las poblaciones anteriores, la diversidad de tales poblaciones enfocadas puede incrementarse aún más al expandir adicionalmente las posiciones seleccionadas para el cambio para incluir otras posiciones relevantes en una o ambas regiones del marco y CDR. Existen muchas otras combinaciones que van desde pocos cambios a muchos cambios en cualquiera o en ambas regiones marco y CDR que pueden emplearse, todo lo cual resultará en una población de regiones variables alteradas que se pueden analizar para la identificación de al menos una región variable alterada injertada en CDR que tiene actividad deseada, por ejemplo, actividad de unión a LOXL2. Los expertos en la materia sabrán, o pueden determinar, qué posiciones de residuos seleccionadas en el marco o CDR donante, o subconjuntos de las mismas, se pueden variar para producir una población para la selección e identificación de un anticuerpo alterado de la invención, dadas las enseñanzas y la guía proporcionada aquí. Los codones que codifican aminoácidos son conocidos en la técnica.

35 Los anticuerpos humanizados y los fragmentos de unión a antígeno pueden prepararse usando técnicas convencionales conocidas en el arte. Además, los anticuerpos preparados de forma recombinante a menudo se pueden producir en grandes cantidades, particularmente cuando se utilizan vectores de expresión de alto nivel.

45 Los anticuerpos pueden secuenciarse usando técnicas convencionales conocidas en el arte y determinarse las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR). En un aspecto, las secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR se insertan en una secuencia sintética de, por ejemplo, un marco de anticuerpo humano (o fragmento de unión a antígeno) para crear un anticuerpo humano que podría limitar las reacciones secundarias adversas de tratar a un paciente humano con un anticuerpo no humano. Las secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR también pueden insertarse en una secuencia sintética de, por ejemplo, en una proteína de unión como un Avimer™ para crear una construcción para la administración a un paciente humano. Tales técnicas pueden ser modificadas dependiendo de la especie de animal por tratar. Por ejemplo, para usos veterinarios, se puede sintetizar un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o proteína de unión para la administración de un primate, una vaca, un caballo, etc.

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

Para un alto nivel de producción, el sistema de expresión de mamíferos más utilizado es el que utiliza el procedimiento de amplificación génica ofrecido por las células de ovario de hámster chino deficientes en dihidrofolato reductasa ("dhfr -"). El sistema es bien conocido por los expertos en la técnica. El sistema se basa en el gen de la dihidrofolato reductasa "dhfr", que codifica la enzima DHFR, que cataliza la conversión de dihidrofolato en tetrahidrofolato. Para lograr una alta producción, las células dhfr-CHO se transfectan con un vector de expresión que contiene un gen dhfr funcional, junto con un gen que codifica una proteína deseada. En este caso, la proteína deseada es una cadena pesada y/o cadena ligera de anticuerpos recombinantes.

Al aumentar la cantidad del inhibidor de DHFR competitivo metotrexato (MTX), las células recombinantes desarrollan resistencia al amplificar el gen dhfr. En casos estándar, la unidad de amplificación empleada es mucho más grande que el tamaño del gen dhfr, y como resultado, la cadena pesada del anticuerpo es coamplificada.

Cuando se desea la producción a gran escala de la proteína, tal como la cadena de anticuerpo, se tienen en cuenta tanto el nivel de expresión como la estabilidad de las células que se están empleando. En el cultivo a largo plazo, las poblaciones de células CHO recombinantes pierden homogeneidad con respecto a su productividad específica de anticuerpos durante la amplificación, a pesar de que se derivan de un único clon parental.

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

La presente solicitud también proporciona constructos en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un polinucleótido como se indicó anteriormente.

La presente solicitud también proporciona una célula hospedadora recombinante que comprende una o más constructos como se indicó anteriormente. Un ácido nucleico que codifica cualquier anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo descrito en este documento tal como se proporciona en sí mismo forma un aspecto de la presente solicitud, al igual que un método de producción del anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, cuyo método comprende la expresión del ácido nucleico codificador del mismo. La expresión puede lograrse convenientemente cultivando en condiciones apropiadas células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno se puede aislar y/o purificar utilizando cualquier técnica adecuada, y luego usarse según sea apropiado.

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

Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células huésped son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, levadura y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de hámster bebé, células de melanoma de ratón NSO y muchas otras. Un huésped bacteriano común es *E. coli*.

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

Se pueden elegir o construir vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, por ejemplo, fagos, o fagémidos, según corresponda. Para más detalles, véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edición*, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de constructos de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica y análisis de proteínas, se describen en detalle en *Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition*, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.

Por lo tanto, un aspecto adicional proporciona una célula huésped que contiene ácido nucleico como se describe en este documento. Otro aspecto adicional proporciona un método que comprende la introducción de dicho ácido nucleico en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir, por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, dextrano DEAE, electroporación, biolística, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otro virus, por ejemplo, vacuna o, para células de insecto, baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir, por ejemplo, transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección utilizando bacteriófagos.

La introducción puede seguirse causando o permitiendo la expresión del ácido nucleico, por ejemplo mediante el cultivo de células huésped en condiciones para la expresión del gen.

5 En una realización, el ácido nucleico está integrado en el genoma (por ejemplo, el cromosoma) de la célula huésped. La integración puede promoverse mediante la inclusión de secuencias que promuevan la recombinación con el genoma, de acuerdo con las técnicas estándar.

La presente solicitud también proporciona un método que comprende el uso de un constructo como se estableció anteriormente en un sistema de expresión para expresar los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los anteriores.

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

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

15 En una realización adicional, la secuencia completa de ADN de la molécula de ADN recombinante o el gen clonado de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento puede unirse operativamente a una secuencia de control de expresión que puede introducirse en un huésped apropiado. En consecuencia, la solicitud se extiende a huéspedes unicelulares transformados con el gen clonado o la molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica el  $V_H$  y/o  $V_L$ , o porciones del mismo, del anticuerpo.

20 Otra característica es la expresión de las secuencias de ADN descritas en el presente documento. Como es bien sabido en la técnica, las secuencias de ADN pueden expresarse uniéndolas operativamente a una secuencia de control de expresión en un vector de expresión apropiado y empleando ese vector de expresión para transformar un huésped unicelular apropiado.

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

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

35 Se puede emplear una amplia variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas. Los vectores adecuados incluyen derivados de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, por ejemplo, plásmidos de E. coli col E1, Pcr1, Pbr322, Pmb9 y sus derivados, plásmidos tales como RP4; ADN de fago, por ejemplo, los numerosos derivados del fago  $\lambda$ , por ejemplo, NM989, y otros ADN de fago, por ejemplo, M13 y ADN de fago monocatenario filamentosos; plásmidos de levadura tales como el plásmido 2u o derivados del mismo; vectores útiles en células eucariotas, tales como vectores útiles en células de insectos o mamíferos; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, tales como plásmidos que se han modificado para emplear ADN de fagos u otras secuencias de control de expresión; y similares.

40 También se proporciona en este documento una célula hospedadora recombinante que comprende uno o más constructos polinucleotídicos. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se proporciona en este documento forma un aspecto de la presente solicitud, al igual que un método de producción del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, método que comprende la expresión del polinucleótido. La expresión se puede lograr, por ejemplo, cultivando en condiciones apropiadas células huésped recombinantes que contienen el polinucleótido. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede luego aislarse y/o purificarse usando cualquier técnica adecuada, y usarse según sea apropiado.

45 Cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de expresión (secuencias que controlan la expresión de una secuencia de ADN operativamente unida a ella) se puede utilizar en estos vectores para expresar las secuencias de ADN. Dichas secuencias de control de expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos o tardíos de SV40, CMV, vaccinia, polioma o adenovirus, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC, el sistema TRC, el sistema LTR, el operador principal y regiones promotoras del fago  $\lambda$ , las regiones de control de la proteína de la capa fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida (por ejemplo, Pho5), los promotores de los factores de apareamiento de la levadura y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de genes de células procariontas o eucariotas o sus virus, y varias combinaciones de los mismos.

Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células huésped son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, levadura y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé, células de melanoma de ratón NSO y muchas otras. Un huésped bacteriano común puede ser, por ejemplo, *E. coli*.

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

Una amplia variedad de células hospedadoras unicelulares también es útil para expresar las secuencias de ADN. Estos hospedadores incluyen hospedadores eucariotas y procarióticos bien conocidos, como cepas de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, hongos como levaduras y células animales, como CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1. 1, células B-W y L-M, células de riñón de mono verde africano (por ejemplo, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 y BMT10), células de insecto (por ejemplo, Sf9) y células humanas y células vegetales en cultivo de tejidos.

Se entenderá que no todos los vectores, secuencias de control de expresión y hospedadores funcionarán igualmente bien para expresar las secuencias de ADN. Ni todos los huéspedes funcionarán igualmente bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, un experto en la técnica podrá seleccionar los vectores, las secuencias de control de expresión y los huéspedes adecuados sin experimentación excesiva para lograr la expresión deseada sin apartarse del alcance de esta aplicación. Por ejemplo, al seleccionar un vector, el huésped debe considerarse porque el vector debe funcionar en él. También se considerará el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, como los marcadores de antibióticos. Un experto en la técnica puede seleccionar los vectores, las secuencias de control de expresión y los huéspedes adecuados para lograr la expresión deseada sin alejarse del alcance de esta aplicación. Por ejemplo, al seleccionar un vector, el huésped se considera porque el vector funciona en él. También se puede considerar el número de copias del vector, la capacidad para controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, como los marcadores de antibióticos.

La presente solicitud también proporciona constructos en forma de plásmidos, vectores, transcripción o casetes de expresión como se describe en otra parte del presente documento que comprende al menos un polinucleótido como anteriormente. Pueden elegirse o construirse vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, marcadores seleccionables y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, por ejemplo, víricos, fagos, fagémidos, etc., según sea apropiado. Para más detalles, véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2nd edición, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de constructos de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica y análisis de proteínas, se describen en detalle en *Short Protocols in Molecular Biology*, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.

Al seleccionar una secuencia de control de expresión, normalmente se considerará una variedad de factores. Estos incluyen, por ejemplo, la fuerza relativa del sistema, su capacidad de control y su compatibilidad con la secuencia de ADN particular o el gen a expresar, particularmente en lo que respecta a posibles estructuras secundarias. Los anfitriones unicelulares adecuados se seleccionarán considerando, por ejemplo, su compatibilidad con el vector elegido, sus características de secreción, su capacidad para plegar las proteínas correctamente y sus requisitos de fermentación, así como la toxicidad para el huésped del producto codificado por las secuencias de ADN a expresar, y la facilidad de purificación de los productos de expresión.

Un aspecto adicional proporciona una célula huésped que contiene uno o más polinucleótidos como se describe en este documento. Otro aspecto adicional proporciona un método para introducir uno o más polinucleótidos en una célula huésped, cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir, por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, dextrano DEAE, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otro virus (por ejemplo, vacuna) o, para células de insectos, baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir, por ejemplo, transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección utilizando bacteriófagos.

La introducción puede seguirse causando o permitiendo la expresión de uno o más polinucleótidos, por ejemplo cultivando células huésped en condiciones para la expresión de uno o más polipéptidos de uno o más polinucleótidos. Se pueden usar sistemas inducibles e inducir la expresión mediante la adición de un activador.

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

Se proporcionan métodos en el presente documento que incluyen el uso de un constructo como se estableció anteriormente en un sistema de expresión para expresar un polipéptido específico.

5 Teniendo en cuenta estos y otros factores, un experto en la materia podrá construir una variedad de combinaciones vector/secuencia de control de expresión/huésped que expresarán las secuencias de ADN en la fermentación o en cultivos de animales a gran escala.

10 Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o una proteína de unión puede prepararse de forma recombinante/sintética además de, o en lugar de, clonado. El polinucleótido puede diseñarse con los codones apropiados para el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o una proteína de unión. En general, se seleccionarán los codones preferidos para un huésped deseado si la secuencia se va a usar para la expresión. El polinucleótido completo se puede ensamblar a partir de oligonucleótidos superpuestos preparados por métodos estándar y ensamblados en una secuencia de codificación completa. Véase, por ejemplo, Edge, Nature, 292: 756 (1981); Nambair et al., Science, 223: 1299 (1984); Jay et al., J. Biol. Chem., 259: 6311 (1984).

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

20 Como se mencionó anteriormente, una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede prepararse sintéticamente en lugar de clonarse. La secuencia de ADN puede diseñarse con los codones apropiados para el anticuerpo o la secuencia de aminoácidos del fragmento de unión a antígeno. En general, uno seleccionará los codones preferidos para el huésped deseado si la secuencia se usará para la expresión. La secuencia completa se ensambla a partir de oligonucleótidos superpuestos preparados por métodos estándar y ensamblados en una secuencia codificadora completa. Véase, por ejemplo, Edge, Nature, 292: 756 (1981); Nambair et al., Science, 223: 1299 (1984); Jay et al., J. Biol. Chem., 259: 6311 (1984).

25 El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que mejora la respuesta inmune, particularmente a un antígeno. Un adyuvante puede servir como un depósito de tejido que libera lentamente el antígeno y también como un activador del sistema linfóide que mejora de manera no específica la respuesta inmune (Hood et al., Immunology, Second Ed., 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, p. 384). A menudo, un desafío primario con un antígeno solo, en ausencia de un adyuvante, no provocará una respuesta inmune humoral o celular. Los adyuvantes previamente conocidos y utilizados incluyen, pero no se limitan a, adyuvante completo de Freund (CFA), adyuvante incompleto de Freund (IFA), saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburos, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles, como BCG (Bacille Calmette-Guerin) y Corynebacterium parvum. Los adyuvantes de sales minerales incluyen, entre otros, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato de calcio, hidróxido de zinc e hidróxido de calcio. Preferiblemente, la composición adyuvante comprende además una emulsión de lípido de grasa que comprende aproximadamente un 10% (en peso) de aceite vegetal y aproximadamente un 1-2% (en peso) de fosfolípidos. Preferiblemente, la composición adyuvante adicionalmente comprende opcionalmente una forma de emulsión que tiene partículas oleosas dispersas en una fase acuosa continua, que tiene un poliol formador de emulsión en una cantidad de aproximadamente 0.2% (en peso) a aproximadamente 49% (en peso), opcionalmente un aceite metabolizable en una cantidad de formación de emulsión de hasta el 15% (en peso), y opcionalmente un surfactante a base de glicol éter en una cantidad de estabilización de la emulsión de hasta aproximadamente el 5% (en peso).

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

45 En una realización, un anticuerpo se une específicamente y selectivamente a LOXL2 con una mayor afinidad de unión (por ejemplo, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces mayor) que la afinidad de unión a al menos uno de: LOX humano, el LOX humano maduro o activo, la forma secretada de LOX u otra similar a la lisil oxidasa (LOL) o relacionada con la lisil oxidasa proteínas (por ejemplo, LOXL1, LOXL3 y LOXL4) en productos sin procesar, maduros, activos y/o secretados. En una realización, el anticuerpo se une específicamente y selectivamente a LOXL2 en formas no procesadas y/o procesadas (maduras). La forma madura de LOXL2 suele estar activa, aunque, en algunas formas de realización, LOXL2 sin procesar también está activa.

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

Los anticuerpos que se unen a las enzimas pueden ser inhibidores competitivos, inhibidores acompetitivos o inhibidores no competitivos. Con respecto a la inhibición competitiva, un inhibidor usualmente tiene una similitud estructural con el sustrato. La inhibición será notable a bajas concentraciones de sustrato, pero puede superarse a altas concentraciones de sustrato. Con respecto a la inhibición no competitiva, un inhibidor se une al sitio que está disponible después de que el sustrato se une al sitio activo. La inhibición será más notable a una alta concentración de sustrato. Con respecto a la inhibición no competitiva, un inhibidor se une al sitio lejos del sitio de unión al sustrato. La inhibición relativa generalmente será la misma en todas las concentraciones de sustrato. El mecanismo de acción por el cual los anticuerpos actúan como inhibidores competitivos, inhibidores acompetitivos e inhibidores no competitivos se ilustra en la Figura 4. Los anticuerpos pueden ser inhibidores competitivos, inhibidores acompetitivos o inhibidores no competitivos.

Los anticuerpos de la invención son inhibidores no competitivos; es decir, los anticuerpos bloquean la actividad enzimática de LOXL2 independientemente de si las enzimas están unidas al sustrato (colágeno).

La unión de un anticuerpo a LOXL2 puede (1) reducir o inhibir la captación o internalización de LOXL2 (por ejemplo, a través de integrina beta 1 u otros receptores o proteínas celulares) y/o (2) reducir o inhibir la actividad enzimática de LOXL2. Se cree que un anticuerpo de este tipo podría reducir la EMT y, por lo tanto, es útil para las aplicaciones aquí descritas. Un anticuerpo descrito en este documento puede unirse al sitio de escisión proteolítica de LOXL2, bloqueando así efectivamente (inhibiendo) el procesamiento de LOXL2 para reducir el nivel de LOXL2 activa. Dicha inhibición puede ocurrir a través de la unión directa a LOXL2 o por interferencia indirecta que incluye impedimento estérico, alteración enzimática de LOXL2, inhibición de la transcripción o traducción, desestabilización de transcritos de ARNm, exportación, procesamiento o localización deteriorados de LOXL2 y similares.

La unión de LOXL2 con otras proteínas, como los receptores celulares (por ejemplo, la integrina beta1 del receptor de captación), BTK (tirosina quinasa de agammaglobulinemia Burton) u otras integrinas también se realiza utilizando el ensayo mencionado anteriormente, en donde en lugar de proteínas ECM, se utilizan receptores celulares (por ejemplo, integrina beta1 del receptor de captación), BTK (tirosina quinasa de agammaglobulinemia Burton), u otras integrinas.

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

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

Los anticuerpos pueden unirse a LOXL2 tanto de longitud completa como procesada.

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

En el presente documento se describe un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede comprender una cadena pesada variable que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera variable que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 2.

En este documento también se describe un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una cadena pesada variable que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 1, y una cadena ligera variable que tiene al menos el 75% de identidad de la secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 2.

En un aspecto, se describe en este documento una cadena pesada variable que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, se describe en este documento una cadena ligera variable que tiene a una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 75% con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 2.

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

5 En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en este documento se une específicamente a la región SRCR3-4 de LOXL2 y, por lo tanto, se une a LOXL2 tanto de longitud completa como procesada. En un aspecto, tanto la LOXL2 de longitud completa como la procesada son formas activas de la enzima. Un anticuerpo puede, por ejemplo, unirse específicamente a un epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos como SEQ ID NO: 6. Dichos anticuerpos pueden servir como inhibidores parciales no competitivos de la actividad enzimática *in vitro*, inhibiendo aproximadamente la mitad de la actividad enzimática frente a un sustrato de 1,5-diaminopentano con un IC<sub>50</sub> aparente de 20-30 nM. Tales anticuerpos pueden servir como inhibidores no competitivos.

10 Cuando se humanizan anticuerpos, la incorporación simultánea de todos los FR y/o CDR que codifican los ácidos nucleicos y todos los cambios de posición de aminoácidos seleccionados se puede lograr mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, síntesis recombinante y química. Por ejemplo, la incorporación simultánea se puede lograr, por ejemplo, sintetizando químicamente la secuencia de nucleótidos para la región variable aceptora, fusionada con los ácidos nucleicos que codifican CDR del donante, e incorporando en las posiciones seleccionadas para albergar residuos de aminoácidos variables una pluralidad de codones de aminoácidos.

15 En el presente documento se proporcionan anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a LOXL2. Los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno que se unen a LOXL2 pueden inhibir (parcial o totalmente) o manejar/tratar (parcial o totalmente) los síntomas asociados y/o causados por la expresión aberrante de LOXL2. La aplicación también proporciona líneas celulares que pueden usarse para producir anticuerpos, métodos para producir líneas celulares, métodos para expresar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno y purificarlos.

20 Se puede reconocer que los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a LOXL2 generado usando los métodos descritos en este documento se pueden probar usando los ensayos proporcionados en este documento o conocidos en la técnica para determinar la capacidad de unirse a LOXL2 (por ejemplo, ELISA), así como afinidad (por ejemplo, Biacore o Resonancia de Plasmón en Superficie).

25 Las versiones humanizadas de anticuerpos anti-LOXL2 tienen una o más de las siguientes características: retención de la función inhibitoria de los anticuerpos monoclonales murinos, afinidad de unión equivalente o incrementada con una tasa de disminución lenta (por ejemplo, K<sub>d</sub> 0.1-1 nM), unión a LOXL2 de longitud completa y/o procesada, inhibición parcial no competitiva de la actividad enzimática, I<sub>c50</sub> equivalente o mejor (por ejemplo, aproximadamente 30 nM), actividad inhibitoria en los ensayos de migración/invasión basados en células, inhibición de un cambio de tipo EMT inducido por LOXL2 secretado en medios condicionados de células tumorales, unión a LOXL2 asociado a la matriz generada por células tumorales humanas vivas, reactividad cruzada de la unión de LOXL2 humano con LOXL2 murino, efectividad terapéutica (por ejemplo, reducción parcial del tamaño del tumor y/o síntomas), toxicidad reducida e inmunogenicidad reducida.

30 En este documento se proporcionan anticuerpos humanizados que se unen a hLOXL2, y anticuerpos humanizados que se unen a hLOXL2 y mLOXL2 (LOXL2 murino). En un aspecto, los anticuerpos humanizados son inhibidores no competitivos.

35 En una realización, un anticuerpo anti-LOXL2 humanizado tiene una cadena VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 28. Se entendería que se pueden realizar modificaciones conservadoras de aminoácidos utilizando los métodos descritos en el presente documento en una o más CDR o regiones marco para la maduración por afinidad del anticuerpo. Los anticuerpos modificados por tales métodos pueden probarse con respecto a la función usando cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

40 En otra realización, un anticuerpo anti-LOXL2 humanizado tiene una cadena VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31 o la SEQ ID NO: 32. Se entendería que las modificaciones conservadoras de los aminoácidos pueden realizarse utilizando los métodos descritos en el presente documento en una o más CDR o regiones marco para la maduración por afinidad del anticuerpo. Los anticuerpos modificados por tales métodos pueden probarse con respecto a la función usando cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

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

en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

50 (i) una cadena pesada FR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33, pero para una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) una sustitución de glutamina (Q) por valina (V) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 24;

## ES 2 700 141 T3

- (b) una sustitución de leucina (L) por valina (V) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 30;
  - (c) una sustitución de valina (V) por lisina (K) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 31;
  - (d) una sustitución de arginina (R) por lisina (K) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 32; y
  - (e) una sustitución de treonina (T) por alanina (A) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 35;
- 5 y una eliminación de los residuos de aminoácidos 1-19;
- (ii) una cadena pesada FR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34, pero para una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:
    - (a) una sustitución de lisina (K) por arginina (R) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 3;
    - (b) una sustitución de arginina (R) por alanina (A) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 5, y
- 10 (iii) una cadena pesada FR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, pero para una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:
- (a) una sustitución de lisina (K) por arginina (R) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 1;
  - (b) una sustitución de alanina (A) por valina (V) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 2;
  - (c) una sustitución de leucina (L) por isoleucina (I) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 4;
  - (d) una sustitución de serina (S) por treonina (T) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 10;
  - (e) una sustitución de glutamina (Q) por ácido glutámico (E) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 16;
  - (f) una sustitución de treonina (T) por arginina (R) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 21;
  - (g) una sustitución del ácido aspártico (D) por ácido glutámico (E) o una sustitución conservadora del mismo en la posición 23;
  - (h) una sustitución de serina (S) por treonina (T) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 25; y
  - (i) una sustitución de fenilalanina (F) por tirosina (Y) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 29;
- y
- (iv) una cadena pesada FR4 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, pero para una sustitución de lisina (K) por valina (V) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 7,
- 25 y en donde dicha región variable de cadena ligera comprende:
- (i) una cadena ligera FR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49, pero para una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:
    - (a) una sustitución de alanina (A) por treonina (T) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 27;
    - (b) una sustitución de alanina (A) por prolina (P) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 28;
    - (c) una sustitución de prolina (P) por leucina (L) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 29;
    - (d) una sustitución de valina (V) por leucina (L) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 31;
    - (e) una sustitución del ácido glutámico (E) por glutamina (Q) o una sustitución conservadora del mismo en la posición 37;
    - (d) una sustitución de serina (S) por prolina (P) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 38;
    - (f) una sustitución de valina (V) por alanina (A) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 39;
- 35 y una eliminación de los residuos de aminoácidos 1-20;
- (ii) una cadena ligera FR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50, pero para una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:
    - (a) una sustitución de fenilalanina (F) por tirosina (Y) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 2; y
- 40

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

(iii) una cadena ligera FR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51, pero para una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

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

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

y

10 (iv) una cadena ligera FR4 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52, pero para una sustitución de leucina (L) por valina (V) o una sustitución conservadora de la misma en la posición 7.

15 En una realización, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada FR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 33, 37 o 44; una región variable FR2 de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 34, 38 o 45; una región variable FR3 de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 35, 39, 46, 47 o 48; una región variable FR4 de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 36 o 40; una región variable de la cadena ligera FR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 49 o 53; una región variable de la cadena ligera FR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 50, 54 o 60; una región variable de la cadena ligera FR3 que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 51, 55 o 61; y una región variable de la cadena ligera FR4 que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 52 o 56.

20 Dentro del alcance de la presente solicitud se incluyen cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables que son al menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o hasta 100% idéntico a las cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables descritas en este documento.

25 Las sustituciones conservadoras son modificaciones menores de estas secuencias de nucleótidos y/o se pretende que los aminoácidos se incluyan como ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras y sus fragmentos funcionales. Tales modificaciones menores incluyen, por ejemplo, aquellas que no cambian la secuencia de aminoácidos codificada debido a la degeneración del código genético, así como aquellas que dan como resultado solo una sustitución conservadora de la secuencia de aminoácidos codificada o aquellas que no alteran sustancialmente la capacidad de unión del anticuerpo. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos codificados incluyen, por ejemplo, aminoácidos que pertenecen a los siguientes grupos: (1) aminoácidos no polares (Gly, Ala, Val, Leu e Ile); (2) aminoácidos neutros polares (Cys, Met, Ser, Thr, Asn y Gln); (3) aminoácidos ácidos polares (Asp y Glu); (4) aminoácidos básicos polares (Lys, Arg y His); y (5) aminoácidos aromáticos (Phe, Trp, Tyr e His). Otras modificaciones menores se incluyen dentro de los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de las cadenas pesada y ligera de la invención, siempre que el ácido nucleico o los polipéptidos codificados retengan parte o la totalidad de su función como se describe en este documento y que tenga uso en los métodos descritos en este documento. Las sustituciones no conservadoras son aquellas que no se identifican como sustituciones conservadoras. Usando los métodos descritos en el presente documento, se puede determinar si sería posible sustituir un aminoácido no conservador o por un residuo de aminoácido estructural y probar la función del anticuerpo modificado utilizando los ensayos descritos en otra parte del presente documento.

40 Las cadenas pesadas variables modificadas y las cadenas ligeras variables pueden seleccionarse para determinar su unión y actividad utilizando métodos conocidos en la técnica y descritos en este documento.

45 Una parte sustancial de un dominio variable incluirá tres regiones CDR, junto con sus regiones marco de intervención. La porción también puede incluir al menos aproximadamente el 50% de una o ambas de la primera y cuarta regiones del marco, siendo el 50% el 50% C-terminal de la primera región del marco y el 50% N-terminal de la cuarta región del marco. Residuos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos que normalmente no están asociados con regiones de dominio variable que ocurren naturalmente. Por ejemplo, la construcción de anticuerpos anti-LOXL2 humanizados y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento elaborados mediante técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de residuos N- o C- terminales codificados por enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otros pasos de manipulación incluyen la introducción de enlazadores para unir dominios variables a otras secuencias de proteínas que incluyen cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos) o marcadores de proteínas como se describe con más detalle a continuación.

55 Los anticuerpos incluidos en la presente solicitud, que incluyen, por ejemplo, los que tienen cadenas pesadas o ligeras variables que tienen al menos un 50% de identidad con los descritos en el presente documento pueden evaluarse para determinar la actividad anti-LOXL2.

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

En el presente documento también se describe un método para identificar un anticuerpo que aumenta la eficacia de los agentes quimioterapéuticos, que comprende poner en contacto LOXL2 o una célula que expresa LOXL2 con un anticuerpo candidato; y determinar la expresión o actividad de LOXL2, por lo que el anticuerpo candidato que reduce la expresión o actividad de LOXL2 en comparación con la expresión o actividad detectada en ausencia del anticuerpo se identifica como el anticuerpo que aumenta la eficacia de los agentes quimioterapéuticos para inhibir o reducir el crecimiento tumoral metastásico.

Cualquier fuente adecuada de LOXL2 puede emplearse como diana de anticuerpos en el método descrito. La enzima puede derivarse, aislarse o producirse de forma recombinante a partir de cualquier fuente conocida en la técnica, incluidas levaduras, microbios y mamíferos, que permita la generación de un producto adecuado que pueda generar un reactivo detectable o que sea biológicamente activo en un ensayo adecuado.

La actividad enzimática de LOXL2 puede evaluarse mediante cualquier método adecuado descrito en el presente documento o conocido en la técnica. Métodos de ejemplo para evaluar la actividad de LOXL2 incluyen el de Trackman et al., Anal. Biochem. 113: 336-342 (1981); Kagan, et al., Methods Enzymol. 82A: 637-49 (1982); Palamakumbura et al., Anal. Biochem. 300: 245-51 (2002); Albini et al., Cancer Res. 47: 3239-45 (1987); Kamath et al, Cancer Res. 61: 5933-40 (2001); Patente de los Estados Unidos No. 4,997,854; y Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2004/0248871. Por ejemplo, la actividad enzimática se puede evaluar mediante la detección y/o cuantificación de "subproductos de lisil oxidasa", como la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; residuos de colágeno piridinio, producción de amonio; producción de productos de aldehído; oxidación de lisilo, desoxipiridinolina (Dpd), que se discute a continuación. También se puede detectar y cuantificar la capacidad invasiva celular *in vitro*; adhesión celular y crecimiento *in vitro*; y crecimiento metastásico *in vivo*. Los modelos *in vivo* incluyen, pero no se limitan a, modelos singénicos adecuados, modelos de xenoinjerto de tumores humanos, modelos ortotópicos, modelos metastásicos, modelos transgénicos y modelos de desactivación de genes (, por ejemplo, Teicher, Tumors Models in Cancer Research (Humana Press 2001)).

Las condiciones hipóxicas pueden ser inducidas o naturales. Las áreas hipóxicas ocurren con frecuencia en el interior del tumor sólido. La hipoxia también se puede inducir *in vivo*, particularmente en modelos animales experimentales, utilizando la disminución o el cese del flujo sanguíneo arterial al tumor o la administración de compuestos vasoconstrictores. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,646,185. Compuestos vasoconstrictores de ejemplo incluyen agonistas adrenérgicos directos e indirectos, tales como norepinefrina, epinefrina, fenilefrina y cocaína. La presencia de una región hipóxica en un tumor sólido presente en un sujeto puede observarse mediante una serie de métodos actualmente conocidos en la técnica, que incluyen resonancia magnética nuclear (RMN) e histografía de electrodo de oxígeno pO<sub>2</sub>. Dichos métodos pueden usarse en el contexto de la presente invención (como se describe a continuación), para identificar regiones diana de tratamiento hipóxico y para guiar la administración de composiciones de tratamiento a tales regiones. *In vitro*, se pueden inducir condiciones hipóxicas utilizando cualquier método adecuado. Por ejemplo, las células pueden mantenerse en condiciones anóxicas (<0.1% de O<sub>2</sub>) a 37°C dentro de una cámara anaeróbica o en condiciones hipóxicas (1 a 2% de O<sub>2</sub>) a 37°C dentro de una cámara de incubadora modular llena con CO<sub>2</sub> al 5% y 1 a 2% de O<sub>2</sub> completado con N<sub>2</sub>. Véase, por ejemplo, Erler et al., Mol. Cell. Biol. 24: 2875-89 (2004).

Las enzimas LOXL2 o las células que expresan LOXL2 pueden ponerse en contacto con un compuesto (por ejemplo, un inhibidor de LOXL2 como un anticuerpo) de cualquier manera adecuada durante cualquier período de tiempo adecuado. Para regiones tumorales que son accesibles a la administración hipodérmica de agente, puede ser deseable inyectar el compuesto directamente en la región hipóxica. Las células pueden ponerse en contacto con el compuesto más de una vez durante la incubación o el tratamiento. Típicamente, la dosis requerida para un anticuerpo está en el rango de aproximadamente 1 micro-g/ml a 1000 micro-g/ml, más típicamente en el rango de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 800 µg / ml. La dosis exacta se puede determinar fácilmente a partir de cultivos *in vitro* de las células y la exposición de la célula a dosis variables del compuesto. Típicamente, la cantidad de tiempo que la célula se pone en contacto con el compuesto es de aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas a aproximadamente 3 días o más, incluso indefinidamente, más típicamente durante aproximadamente 24 horas. Para los ensayos de invasión *in vitro*, se puede usar cualquier matriz adecuada. En una realización, la matriz es matriz de membrana basal reconstituida Matrigel™ (BD Sciences).

Los métodos de criba también pueden incluir un paso para medir los niveles de FAK. Como se describe a continuación, FAK (quinasa de adhesión focal [p125FAK]) se activa como parte del proceso de motilidad celular. Cuando se inhibe la LOX, la fosforilación de FAK no aumenta en condiciones hipóxicas. En un ensayo de selección de compuestos, un

paso secundario puede incluir la detección de los niveles de fosfo-FAK con y sin la adición del anticuerpo de prueba. Un anticuerpo inhibidor de prueba también reducirá los niveles de fosfo-FAK.

Un anticuerpo es un inhibidor de la expresión o actividad biológica de LOXL2 cuando el anticuerpo reduce la expresión o actividad de LOXL2 en relación con la observada en ausencia del anticuerpo. En una realización, un anticuerpo es un inhibidor de LOXL2 cuando reduce la incidencia de metástasis en relación con lo observado en ausencia del anticuerpo y, en pruebas adicionales, inhibe el crecimiento de tumores metastásicos. En un aspecto, los anticuerpos descritos en este documento son inhibidores no competitivos. La inhibición del tumor se puede cuantificar utilizando cualquier método de medición conveniente. La incidencia de metástasis puede evaluarse examinando la diseminación relativa (por ejemplo, la cantidad de sistemas de órganos involucrados) y la carga tumoral relativa en estos sitios. El crecimiento metastásico puede determinarse mediante análisis microscópico o macroscópico, según corresponda. La metástasis tumoral puede reducirse en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede evaluarse con relación a otros anticuerpos o compuestos que no afectan la expresión de LOXL2 o la actividad biológica. Los anticuerpos de prueba pueden administrarse en el momento de la inoculación del tumor, después del establecimiento del crecimiento del tumor primario, o después del establecimiento de metástasis locales y/o distantes. La administración única o múltiple del anticuerpo de prueba puede suministrarse utilizando cualquier modo de administración conveniente, que incluye, entre otros, la administración intravenosa, intraperitoneal, intratumoral, subcutánea e intradérmica.

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

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

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

Los métodos descritos en el presente documento no son limitativos y cualquier otro método conocido en la técnica también se puede usar para probar la actividad de los anticuerpos anti-LOXL2. A continuación en los ejemplos se describen ensayos adicionales.

Puede ser necesario en algunos casos introducir una región enlazadora polipeptídica no estructurada entre una etiqueta de la presente divulgación y porciones de los anticuerpos. El enlazador puede facilitar una mayor flexibilidad y/o reducir el impedimento estérico entre cualquiera de los dos fragmentos. El enlazador también puede facilitar el pegamiento apropiado de cada fragmento para que ocurra. El enlazador puede ser de origen natural, tal como una secuencia determinada para existir en una bobina aleatoria entre dos dominios de una proteína. Una secuencia enlazadora de ejemplo es el enlazador encontrado entre los dominios C-terminal y N-terminal de la subunidad  $\alpha$  de la ARN polimerasa. Otros ejemplos de enlazadores naturales incluyen los enlazadores encontrados en las proteínas 1CI y LexA.

Dentro del enlazador, la secuencia de aminoácidos puede variarse en función de las características preferidas del enlazador según se determine empíricamente o como se revela mediante el modelado. Las consideraciones al elegir un enlazador incluyen la flexibilidad del enlazador, la carga del enlazador y la presencia de algunos aminoácidos del enlazador en las subunidades naturales. El enlazador también puede diseñarse de tal manera que los residuos en el ADN de contacto del enlazador influyan en la afinidad o especificidad de unión, o que interactúen con otras proteínas. En algunos casos, particularmente cuando es necesario abarcar una distancia más larga entre subunidades o cuando los dominios deben mantenerse en una configuración particular, el enlazador puede contener opcionalmente un dominio plegado adicional.

En algunas realizaciones, es preferible que el diseño de un enlazador implique una disposición de dominios que requiera que el enlazador abarque una distancia relativamente corta, preferiblemente menos de aproximadamente 10

Angstroms (Å). Sin embargo, en ciertas realizaciones, los enlazadores abarcan una distancia de hasta aproximadamente 50 Å.

5 Los anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden conjugarse o unirse a unidades estructurales terapéuticas y/o de generación de imágenes/detectables. Los métodos para conjugar o unir anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Las asociaciones entre anticuerpos y marcadores incluyen cualquier medio conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a, interacciones covalentes y no covalentes.

En una realización no limitativa, los anticuerpos pueden asociarse con una toxina, un radionúclido, un compuesto relacionado con el hierro, un colorante, un reactivo de imágenes, una etiqueta fluorescente o un agente quimioterapéutico que sería tóxico cuando se administra a una célula de cáncer.

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

15 Ejemplos no limitativos de radiomarcadores incluyen, por ejemplo,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{43}\text{K}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{71}\text{Ge}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{As}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{81}\text{Rb}/^{81}\text{MKr}$ ,  $^{87}\text{MSr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{100}\text{Pd}$ ,  $^{101}\text{Rh}$ ,  $^{103}\text{Pb}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{113}\text{In}$ ,  $^{119}\text{Sb}$ ,  $^{121}\text{Sn}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{127}\text{Cs}$ ,  $^{128}\text{Ba}$ ,  $^{129}\text{Cs}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{Cs}$ ,  $^{143}\text{Pr}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{169}\text{Eu}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{189}\text{Re}$ ,  $^{191}\text{Os}$ ,  $^{193}\text{Pt}$ ,  $^{194}\text{Ir}$ ,  $^{197}\text{Hg}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{203}\text{Pb}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$  y  $^{213}\text{Bi}$ .

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

25 Ejemplos no limitantes de compuestos relacionados con el hierro incluyen, por ejemplo, partículas magnéticas de óxido de hierro, partículas férricas o ferrosas,  $\text{Fe}^{203}$  y  $\text{Fe}^{304}$ . Los compuestos relacionados con el hierro y los métodos de marcación de polipéptidos, proteínas y péptidos se pueden encontrar, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos. 4,101,435 y 4,452,773, y en las Solicitudes Publicadas de los Estados Unidos 2002/0064502 y 2002/0136693.

30 En ciertas realizaciones, los anticuerpos del sujeto pueden estar acoplados covalentemente o no covalentemente a una citotoxina u otro compuesto inhibidor de la proliferación celular, con el fin de localizar el suministro de ese agente a una célula tumoral. Por ejemplo, el agente puede seleccionarse del grupo que consiste en agentes, inhibidores de enzimas, inhibidores de la proliferación, agentes líticos, inhibidores de la síntesis de ADN o ARN, modificadores de la permeabilidad de la membrana, metabolitos del ADN, derivados de dicloroetilsulfuro, inhibidores de la producción de proteínas, inhibidores del ribosoma, inductores de la apoptosis y neurotoxinas.

35 En ciertas realizaciones, los anticuerpos del sujeto se pueden acoplar con un agente útil en la generación de imágenes de tumores. Tales agentes incluyen: metales; quelantes de metal; lantánidos; quelantes de lantano; radiometales; quelantes radiometales; núcleos emisores de positrones; microburbujas (para ultrasonido); liposomas; moléculas microencapsuladas en liposomas o nanoesferas; nanocompuestos de óxido de hierro monocristalino; agentes de contraste de imagen de resonancia magnética; agentes absorbentes de luz, reflectantes y/o dispersantes; partículas coloidales; fluoróforos, tales como fluoróforos de infrarrojo cercano. En muchas realizaciones, dicha funcionalidad/unidad estructural secundaria será relativamente grande, por ejemplo, con un tamaño de al menos 25 amu, y en muchos casos puede tener un tamaño de al menos 50, 100 o 250 amu.

En ciertas realizaciones, la funcionalidad secundaria es una unidad estructural quelato para quelatar un metal, por ejemplo, un quelante para un ion radiometálico o paramagnético. En realizaciones adicionales, es un quelante para un radionúclido útil para radioterapia o procedimientos de imagen.

45 Los radionúclidos útiles dentro de la presente invención incluyen emisores gamma, emisores de positrones, emisores de electrones Auger, emisores de rayos X y emisores de fluorescencia, prefiriéndose los emisores beta o alfa para uso terapéutico. Ejemplos de radionúclidos útiles como toxinas en la radioterapia incluyen:  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{43}\text{K}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{71}\text{Ge}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{As}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{81}\text{Rb}/^{81}\text{MKr}$ ,  $^{87}\text{MSr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{100}\text{Pd}$ ,  $^{101}\text{Rh}$ ,  $^{103}\text{Pb}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{113}\text{In}$ ,  $^{119}\text{Sb}$ ,  $^{121}\text{Sn}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{127}\text{Cs}$ ,  $^{128}\text{Ba}$ ,  $^{129}\text{Cs}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{Cs}$ ,  $^{143}\text{Pr}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{169}\text{Eu}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{189}\text{Re}$ ,  $^{191}\text{Os}$ ,  $^{193}\text{Pt}$ ,  $^{194}\text{Ir}$ ,  $^{197}\text{Hg}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{203}\text{Pb}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$  and  $^{213}\text{Bi}$ . Los radionúclidos terapéuticos preferidos incluyen  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{203}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{198}\text{Au}$  and  $^{199}\text{Ag}$ ,  $^{166}\text{Ho}$  o  $^{177}\text{Lu}$ . Las condiciones bajo las cuales un quelante coordinará un metal se describen, por ejemplo, por Gasnow et al. Patente de los Estados Unidos Nos. 4,831,175, 4,454,106 y 4,472,509. Dentro de la presente invención, "radionúclido" y "radiomarcador" son intercambiables.

55 El  $^{99}\text{Tc}$  es un radioisótopo particularmente atractivo para aplicaciones de diagnóstico, ya que está disponible para todos los departamentos de medicina nuclear, es económico, proporciona dosis mínimas de radiación al paciente y tiene propiedades de imagen nuclear ideales. Tiene una vida media de seis horas, lo que significa que es deseable

una selección rápida de un anticuerpo marcado con tecnecio. Por consiguiente, en ciertas realizaciones preferidas, los anticuerpos modificados incluyen un agente quelante para tecnecio.

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

10 Existe una amplia gama de unidades estructurales que pueden servir como quelantes y que pueden derivarse a los anticuerpos de la presente invención. Por ejemplo, el quelante puede ser un derivado del ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecanotetraacético (DOTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y ácido 1-p-isotiocianato-bencil-metil-dietilentriaminopentaacético (ITC-MX). Estos quelantes típicamente tienen grupos en la cadena lateral, por lo que el quelante se puede usar para unirse al antagonista del sujeto. Tales grupos incluyen, por ejemplo, bencilisotiocianato, mediante el cual el DOTA, DTPA o  
15 EDTA se pueden acoplar, por ejemplo, a un grupo amina.

En una realización, la unidad estructural quelato es una unidad estructural quelado "NxSy". Como se define aquí, los "quelatos NxSy" incluyen quelantes bifuncionales que son capaces de unirse coordinadamente a un metal o radiometal y, preferiblemente, tienen núcleos N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> o N<sub>3</sub>S. Ejemplos de quelatos NxSy se describen, por ejemplo, en Fritzberg et al. (1998) PNAS 85: 4024-29; y Weber et al. (1990) Chem. 1: 431-37; y en las referencias allí citadas.

20 Jacobsen et al. (Solicitud PCT WO 98/12156) proporciona métodos y composiciones, es decir, bibliotecas sintéticas de unidades estructurales de unión, para identificar compuestos que se unen a un átomo metálico. El enfoque descrito en esa publicación puede usarse para identificar unidades estructurales de unión que posteriormente pueden añadirse a los anticuerpos para derivar los anticuerpos modificados.

25 Un problema frecuente que se encuentra con el uso de proteínas conjugadas en aplicaciones de radiodiagnóstico es una acumulación potencialmente peligrosa de los fragmentos de unidades estructurales radiomarcadas en el riñón. Cuando el conjugado se forma utilizando un enlazador lábil o ácido, puede producirse ventajosamente la escisión del quelato radiactivo de la proteína. Si el quelato tiene un peso molecular relativamente bajo, como se espera que la mayoría de los anticuerpos modificados del sujeto, los fragmentos de unión a antígeno y los péptidos, no se retiene en el riñón y se excreta en la orina, lo que reduce la exposición del riñón a radioactividad. Sin embargo, en ciertos  
30 casos, puede ser ventajoso utilizar ácidos o bases lábiles en los ligandos del sujeto por las mismas razones que se han utilizado en proteínas marcadas.

Por consiguiente, algunos de los anticuerpos marcados/modificados del sujeto pueden sintetizarse, mediante métodos estándar en la técnica, para proporcionar grupos funcionales reactivos que pueden formar enlaces lábiles en el ácido con, por ejemplo, un grupo carbonilo del ligando. Ejemplos de enlaces lábiles en ácido adecuados incluyen funciones de hidrazona y tiosemicarbazona. Estos se forman haciendo reaccionar el carbohidrato oxidado con quelatos que  
35 contienen hidrazida, tiosemicarbazida y funciones, respectivamente.

Alternativamente, se puede usar la base escindible que se ha utilizado para la eliminación mejorada de la radiomarcación de los riñones. véase, por ejemplo, Weber et al. 1990 Bioconj. Chem. 1: 431. El acoplamiento de un quelato bifuncional a un anticuerpo a través de un enlace hidrazida puede incorporar unidades estructurales sensibles a éster a la base en un brazo espaciador enlazador. Una unidad enlazadora que contiene éster se ejemplifica con etilenglicolbis (succinato de succinimidilo), (EGS, disponible de Pierce Chemical Co., Rockford, Ill), que tiene dos derivados de éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) terminales de dos unidades de ácido 1,4 dibutírico, cada una de las cuales está unida a una sola unidad estructural de etilenglicol por dos ésteres de alquilo. Un éster de NHS puede  
40 reemplazarse con un BFC adecuado que contiene amina (por ejemplo, 2-aminobencil DTPA), mientras que el otro éster de NHS reacciona con una cantidad limitante de hidrazina. La hidrazida resultante se usa para acoplarse a los antagonistas, formando un enlace ligando-BFC que contiene dos funciones de éster alquílico. Dicho conjugado es estable a pH fisiológico, pero se escinde fácilmente a pH básico.

Los anticuerpos marcados por quelación de radioisótopos están sujetos a escisión del quelante inducida por radiación y a la pérdida de radioisótopo por disociación del complejo de coordinación. En algunos casos, el metal disociado del  
45 complejo se puede volver a complejar, proporcionando un aclaramiento más rápido de isótopos no localizados específicamente y, por lo tanto, menos toxicidad para los tejidos no diana. Por ejemplo, los compuestos quelantes como EDTA o DTPA se pueden infundir en pacientes para proporcionar un conjunto de quelantes para unir el radiometal liberado y facilitar la excreción del radioisótopo libre en la orina.

55 En otras realizaciones más, los anticuerpos se acoplan a un agregado de boro, tal como un carborano. Por ejemplo, los carboranos pueden prepararse con funciones carboxilo en cadenas laterales colgantes, como es bien conocido en la técnica. La unión de tales carboranos a péptidos de amina se puede lograr mediante la activación de los grupos carboxilo de los carboranos y la condensación con el grupo amina para producir el conjugado. Dichos anticuerpos modificados pueden usarse para la terapia de captura de neutrones.

La presente invención también contempla la modificación de los antagonistas del sujeto con colorantes, por ejemplo, útiles en terapia, y usados junto con radiación no ionizante apropiada. El uso de la luz y las porfirinas en los métodos de la presente divulgación también se contempla y su uso en la terapia del cáncer ha sido revisado por van den Bergh, *Chemistry in Britain*, 22: 430-437 (1986).

- 5 Una realización de la presente invención incluye antagonistas marcados con una etiqueta fluorescente. Los marcadores fluorescentes comunes incluyen, por ejemplo, FITC, PE, Texas Red, citocromo c, etc. Las técnicas para marcar polipéptidos y fragmentos de los mismos, tales como las proporcionadas en el presente documento, son bien conocidas en el arte.

- 10 El término "agente anticancerígeno" también incluye los agentes quimioterapéuticos descritos a continuación. El término agente anticancerígeno también incluye el tratamiento con una sustancia que reduce la hipoxia en una célula, cuando dicho agente se combina con la inhibición de LOX. Dicha sustancia puede incluir, por ejemplo, p53. Véase, por ejemplo, Matoba et al., "p53 Regulates Mitochondrial Respiration", *Science* 16 de junio de 2006 312: 1650-1653; publicado en línea el 24 de mayo de 2006, y las referencias citadas allí. Una sustancia que conduzca a las células cancerosas hacia la vía respiratoria y se aleje de la vía glucolítica se usaría de manera ventajosa con un inhibidor de LOX en la medida en que la LOX no se regularía al alza en este caso.

- 15 Los agentes quimioterapéuticos útiles como unidades estructurales activas que, cuando se conjugan con los antagonistas de los mismos de la presente invención se suministran específicamente a las células, son típicamente pequeñas entidades químicas producidas por síntesis química. Los agentes quimioterapéuticos incluyen fármacos citotóxicos y citostáticos. Los quimioterapéuticos pueden incluir aquellos que tienen otros efectos en las células, como la reversión del estado transformado a un estado diferenciado o aquellos que inhiben la replicación celular. Ejemplos de agentes citotóxicos conocidos útiles en la presente invención se enumeran, por ejemplo, en Goodman et al., "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Sexta edición, A.B. Gilman et al., Eds./Macmillan Publishing Co. New York, 1980. Estos incluyen taxanos, como paclitaxel y docetaxel; nitrógeno tal como mecloretamina, melfalán, mostaza de uracilo y clorambucilo; derivados de etilenimina, tales como tiotepa; sulfonatos de alquilo, tales como busulfán; nitrosoureas, tales como lomustina, semustina y estreptozocina; triazenos, tales como dacarbazina; análogos del ácido fólico, como el metotrexato; análogos de pirimidina, tales como fluorouracilo, citarabina y azaribina; análogos de purina, tales como mercaptopurina y tioguanina; alcaloides de la vinca, tales como vinblastina y vincristina; antibióticos, como dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina y mitomicina; enzimas, tales como complejos de coordinación de platino, tales como cisplatino; urea sustituida, tal como hidroxiaurea; derivados de metil hidrazina, tales como procarbazona; 20 supresores adrenocorticales, tales como mitotano; hormonas y antagonistas, tales como adrenocortisteroides (prednisona), progestinas (caproato de hidroxiprogesterona, acetato y megestrol acetato), estrógenos (dietilestilbestrol y etinilestradiol) y andrógenos (propionato de testosterona y fluoximesterona).

También se pueden usar fármacos que interfieren con la síntesis de proteínas; tales fármacos son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen puromicina, cicloheximida y ribonucleasa.

- 35 La mayoría de los agentes quimioterapéuticos actualmente en uso para tratar el cáncer poseen grupos funcionales que son susceptibles de reticulación química directamente con un grupo amina o carboxilo de un agente de la presente invención. Por ejemplo, los grupos amino libres están disponibles en metotrexato, doxorrubicina, daunorrubicina, citosinarabinosido, bleomicina, fludarabina y cladribina, mientras que los grupos de ácido carboxílico libres están disponibles en metotrexato, melfalán y clorambucilo.
- 40 Estos grupos funcionales, que son aminoácidos libres y ácidos carboxílicos, son dianas para una variedad de agentes de reticulación química homobifuncionales y heterobifuncionales que pueden reticular estos fármacos directamente a un grupo amino libre de un antagonista.

- 45 Los agentes quimioterapéuticos contemplados por la presente invención también incluyen otros fármacos quimioterapéuticos que están disponibles comercialmente. Simplemente para ilustrar, el quimioterapéutico puede ser un inhibidor de la función de la cromatina, un inhibidor, un fármaco inhibidor, un agente dañino del ADN, un antimetabolito (como los antagonistas de folato, análogos de pirimidina, análogos de purina y análogos modificados con azúcar), un inhibidor de la síntesis de ADN, un agente interactivo de ADN (como un agente intercalante), un inhibidor de reparación de ADN.

- 50 Los agentes quimioterapéuticos se pueden clasificar por su mecanismo de acción en, por ejemplo, los siguientes grupos: antimetabolitos/agentes anticancerosos, tales como los análogos de pirimidina floxuridina, capecitabina y citarabina) y análogos de purina, antagonistas de folato e inhibidores relacionados antiproliferativos/agentes antimicóticos, incluidos productos naturales como alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina y microtúbulos, como taxano (paclitaxel, docetaxel), vinblastina, nocodazol, epotilonas y navelbina, epididodofilotoxinas (etopósido, tenipósido), agentes que dañan el ADN (actinomicina, amsacrina, busulfán, carboplatino, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, citoxan, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, epirubicina, ifosfamida, melfalan, mecloretamina, mitomicina, mitoxantrona, nitrosourea, procarbazona, taxol, taxotere, tenipósido, trietilenetiofosforamida y etopósido; antibióticos tales como dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina, doxorrubicina (adriamicina), idarrubicina, antraciclinas, mitoxantrona, bleomicinas, plicamicina (mitramicina) y mitomicina; enzimas (L-asparaginasa que metaboliza sistémicamente la L-asparagina y priva a las células que no

5 tienen la capacidad de sintetizar su propia asparagina); agentes antiplaquetarios; agentes alquilantes antiproliferativos/antimitóticos, como las mostazas nitrogenadas, ciclofosfamida y análogos, melfalán, clorambucil y (hexametilmelamina y tiotepa), alquil nitrosoureas (BCNU) y análogos, estrepto-zocina, trazenos-dacarbazina (DTIC) antimetabolitos antiproliferativos/antimitóticos, tales como análogos del ácido fólico (metotrexato); complejos de  
 10 coordinación de platino (cisplatino, oxiloplatino, carboplatino), procarbazona, hidroxiurea, mitotano, aminoglutetimida; hormonas, análogos de hormonas (estrógeno, tamoxifeno, goserelina, bicalutamida, nilutamida) e inhibidores de la aromatasa (letrozol, anastrozol); anticoagulantes (heparina, sales de heparina sintéticas y otros inhibidores de la trombina); agentes fibrinolíticos (como activador de plasminógeno tisular, estreptoquinasa y uroquinasa), aspirina, dipiridamol, ticlopidina, clopidogrel; agentes antimigratorios; agentes antiseoretos (breveldin); inmunosupresores  
 15 tacrolimus sirolimus azatioprina, micofenolato; compuestos (TNP-470, genisteína) e inhibidores del factor de crecimiento (inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular, inhibidores del factor de crecimiento de fibroblastos); bloqueador del receptor de angiotensina, donadores de óxido nítrico; oligonucleótidos antisentido; anticuerpos (trastuzumab, rituximab); inhibidores del ciclo celular e inductores de diferenciación (tretinoína); inhibidores, topoisomerasa inhibidores (doxorubicina (adriamicina), daunorubicina, dactinomicina, tenipósido, epirubicina, etopósido, idarrubicina, irinotecán y mitoxantrona, topotecán, irinotecán), corticosteroides (cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona y prednisolona); inhibidores de la quinasa de la transducción de señales del factor de crecimiento; inductores de la disfunción, toxinas como la toxina del cólera, la ricina, la exotoxina de Pseudomonas, la toxina adenilato ciclasa de Bordetella pertussis, o la toxina de la difteria, y los activadores de la caspasa; y la cromatina. Las dosis preferidas de los agentes quimioterapéuticos son consistentes  
 20 con las dosis prescritas actualmente.

Además, la presente invención contempla otros marcadores, como la biotina seguida de estreptavidina-fosfatasa alcalina (AP), peroxidasa de rábano picante.

25 Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento dañino para el ácido nucleico" y "agente dañino del ácido nucleico" se refieren a cualquier régimen de tratamiento que dañe directa o indirectamente el ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ADNc, ADN genómico, ARNm, ARNt o ARNr). Ejemplos de tales agentes incluyen agentes alquilantes, nitrosoureas, antimetabolitos, alcaloides de plantas, extractos de plantas y radioisótopos. Ejemplos de agentes también incluyen medicamentos que dañan el ácido nucleico, por ejemplo, 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, S-1 (Tegafur, 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina y ácido oxónico), 5-etiniluracilo, arabinosil citosina (ara-C), 5-azacitidina (5-AC), 2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina (dFdC), antimetabolitos de purina (mercaptopurina, azatiopurina, tioguanina), clorhidrato de gemcitabina (Gemzar), pentostatina, alopurinol, 2-fluoro-arabinosil-adenina (2F-ara-A), hidroxiurea, mostaza azufrada (biscloroetilsulfuro), mecloretamina, melfalán, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, tiotepa, AZQ, mitomicina C, dianhidrogalactitol, dibromoducitol, sulfonato de alquilo (busulfán), nitrosoureas (BCNU, CCNU, 4-metil CCNU o ACNU), procarbazona, decarbazina, rebeccamicina, antraciclinas como la doxorubicina (adriamicina; ADR), daunorubicina (Cerubicina), idarrubicina (Idamicina) y epirubicina (Ellence), análogos de antraciclina como mitoxantrona, actinomicina D, inhibidores de topoisomerasa no intercalantes como epipodofilotoxinas (etopósido=VP16, tenipósido=VM-26), podofilotoxina, bleomicina (Bleo), pepleomicina, compuestos que forman aductos con ácido nucleico que incluyen derivados de platino (por ejemplo, cisplatino (CDDP), análogo trans de cisplatina, carboplatino, iproplatino, tetraplatino y oxaliplatino), camptotecina, topotecán, irinotecán (CPT-11) y SN-38. Ejemplos específicos de tratamientos que dañan el ácido nucleico incluyen radiación (por ejemplo, microondas enfocadas, radiación ultravioleta (UV), infrarrojo (IR) o alfa, beta o gamma) y shock ambiental (por ejemplo, hipertermia).  
 30  
 35  
 40

45 Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento antiproliferativo" y "agente antiproliferativo" significan cualquier régimen de tratamiento que inhiba directa o indirectamente la proliferación de una célula, virus, bacteria u otro organismo unicelular o multicelular, independientemente de si el tratamiento o el agente dañan el ácido nucleico. Ejemplos particulares de agentes antiproliferativos son fármacos antitumorales y antivirales, que inhiben la proliferación celular o la proliferación o replicación de virus. Ejemplos incluyen, entre otros, ciclofosfamida, azatioprina, ciclosporina A, prednisolona, melfalán, clorambucil, mecloretamina, busulfán, metotrexato, 6-mercaptopurina, tioguanina, arabinósido de citosina, taxol, vinblastina, vincristina, doxorubicina, actinomicina D, mitramicina, carmustina, lomustina, semustina, estrepto-zotocina, hidroxiurea, cisplatino, mitotano, procarbazona, dacarbazina y dibromomanitol. Los agentes antiproliferativos que causan errores en la replicación del ácido nucleico o inhiben la replicación del ácido nucleico son los análogos de nucleósidos y nucleótidos (por ejemplo, AZT o 5-AZC).  
 50

55 En otra realización, el anticuerpo anti-LOX puede conjugarse con un "receptor" (tal estreptavidina) para su utilización en la orientación previa del tumor en donde el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente de limpieza y luego la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionúclido).

60 La metodología para marcar polipéptidos y fragmentos de los mismos que incluyen, pero no se limitan a, los proporcionados en el presente documento son bien conocidos en la técnica. Cuando los anticuerpos de la presente invención se marcan con un radiomarcador o toxina, los anticuerpos pueden prepararse como composiciones farmacéuticas que son útiles para el tratamiento terapéutico de pacientes en los que las composiciones farmacéuticas se administran al paciente en una cantidad eficiente. Cuando los anticuerpos de la presente invención están marcados con una etiqueta que puede visualizarse, los anticuerpos pueden prepararse como composiciones farmacéuticas que son útiles para el diagnóstico de pacientes en los que las composiciones farmacéuticas se administran al paciente en

una cantidad eficiente para la obtención de imágenes *in vivo* o donde las composiciones farmacéuticas se ensayan en un ensayo *in vitro*.

#### V. Composiciones

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

10 Los vehículos farmacéuticamente aceptables son fisiológicamente aceptables para el paciente administrado y retienen las propiedades terapéuticas de los anticuerpos o péptidos con los que se administra. Los portadores farmacéuticamente aceptables y sus formulaciones se describen en general en, por ejemplo, Remington 'Pharmaceutical Sciences (18ª edición, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA 1990). Un portador farmacéutico de ejemplo es la solución salina fisiológica. La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" como se usa en este documento significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, solvente o material de encapsulación, involucrados en transportar o transportar los anticuerpos o péptidos del sujeto desde el sitio de administración de un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para el paciente. Tampoco debe un portador farmacéuticamente aceptable alterar la actividad específica de los antagonistas. Portadores de ejemplo y excipientes de ejemplo se han proporcionado en otros lugares en este documento.

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

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

30 En una realización adicional, las composiciones de la presente invención comprenden además un aditivo farmacéuticamente aceptable para mejorar la estabilidad del antagonista en la composición y/o para controlar la velocidad de liberación de la composición. Los aditivos farmacéuticamente aceptables de la presente divulgación no alteran la actividad específica del sujeto antagonista. Un aditivo farmacéuticamente aceptable preferible es un azúcar tal como manitol, sorbitol, glucosa, xilitol, trehalosa, sorbosa, sacarosa, galactosa, dextrano, dextrosa, fructosa, lactosa y mezclas de los mismos. Los aditivos farmacéuticamente aceptables de la presente divulgación se pueden combinar con vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables tales como dextrosa. Alternativamente, un aditivo farmacéuticamente aceptable preferible es un surfactante tal como polisorbato 20 o polisorbato 80 para aumentar la estabilidad del péptido y disminuir la gelificación de la solución farmacéutica. El surfactante se puede agregar a la composición en una cantidad de 0.01% a 5% de la solución. La adición de dichos aditivos farmacéuticamente aceptables aumenta la estabilidad y la vida media de la composición en almacenamiento.

40 La formulación y los métodos de administración generalmente se adaptarán de acuerdo con el sitio y la enfermedad a tratar. Las formulaciones de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, aquellas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo, administración intravenosa, intraarterial, intramuscular o subcutánea, que incluyen formulaciones encapsuladas en micelas, liposomas o cápsulas de liberación de fármacos (agentes activos incorporados en un recubrimiento biocompatible diseñado para liberación lenta); formulaciones ingeribles; formulaciones para uso tópico, tales como cremas, pomadas y geles; y otras formulaciones tales como inhalantes, aerosoles y aerosoles. La dosificación de los compuestos de la invención variará de acuerdo con el alcance y la gravedad de la necesidad de tratamiento, la actividad de la composición administrada, la salud general del sujeto y otras consideraciones bien conocidas por el experto en la materia.

50 Las formulaciones o la administración enteral (oral) pueden estar contenidas en una tableta (recubierta o no recubierta), cápsula (dura o blanda), microesfera, emulsión, polvo, gránulo, cristal, suspensión, jarabe o elixir. Los portadores sólidos no tóxicos convencionales que incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, pueden usarse para preparar formulaciones sólidas. Los compuestos activos complementarios (por ejemplo, conservantes, agentes antibacterianos, antiviricos y antifúngicos) también pueden incorporarse en las formulaciones. Una formulación líquida también se puede utilizar para administración enteral. El portador puede seleccionarse entre varios aceites, incluido petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen, por ejemplo, almidón, celulosa, talco,

glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propilen glicol, agua, etanol.

Las composiciones farmacéuticas para administración enteral, parenteral o transmucosa incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina regulada con fosfato, solución de Hank, solución de Ringer, solución de dextrrosa/solución salina y glucosa. Las formulaciones pueden contener sustancias auxiliares para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes reguladores, agentes de ajuste de tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares. Los aditivos también pueden incluir ingredientes activos adicionales como agentes bactericidas o estabilizadores. Por ejemplo, la solución puede contener acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán u oleato de trietanolamina. Otras formulaciones y métodos parenterales se describen en Bai (1997) *J. Neuroimmunol.* 80:65 75; Warren (1997) *J. Neurol. Sci.* 152: 31 38; y Tonegawa (1997) *J. Exp. Med.* 186: 507 515. La preparación parenteral se puede incluir en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas para administración intradérmica o subcutánea pueden incluir un diluyente estéril, tal como agua, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico, glutatión o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; reguladores tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como el cloruro de sodio o la dextrosa.

Las composiciones farmacéuticas para inyección incluyen soluciones acuosas (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina regulada con fosfato (PBS). El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, polioliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de surfactantes. Los agentes antibacterianos y antifúngicos incluyen, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal. Agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro de sodio pueden incluirse en la composición. Las soluciones resultantes se pueden empaquetar para su uso tal como están, o se pueden liofilizar; la preparación liofilizada puede combinarse posteriormente con una solución estéril antes de la administración.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden contener un compuesto que estabiliza, aumenta o retrasa la absorción o el aclaramiento. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, hidratos de carbono, tales como glucosa, sacarosa o dextranos; proteínas de bajo peso molecular; composiciones que reducen el aclaramiento o hidrólisis de péptidos; o excipientes u otros estabilizantes y/o reguladores. Los agentes que retrasan la absorción incluyen, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. También se pueden usar detergentes para estabilizar o para aumentar o disminuir la absorción de la composición farmacéutica, incluidos los portadores liposómicos. Para protegerse de la digestión, el compuesto se puede complejar con una composición para hacerlo resistente a la hidrólisis ácida y enzimática, o el compuesto se puede complejar en un portador apropiadamente resistente, como un liposoma. Los medios para proteger los compuestos de la digestión son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Fix (1996) *Pharm Res.* 13: 1760 1764; Samanen (1996) *J. Pharm. Pharmacol.* 48: 119 135; y la Patente de los Estados Unidos No. 5,391,377, describiendo composiciones lipídicas para administración oral de agentes terapéuticos).

Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede ser a través de aerosoles nasales o supositorios (véase, por ejemplo, Sayani (1996) "Systemic delivery of peptides and proteins across absorptive mucosae" *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 13:85 184). Para la administración transdérmica, el compuesto activo puede formularse en ungüentos, ungüentos, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica. Los sistemas de administración transdérmica también se pueden lograr mediante parches.

Para la administración por inhalación, la formulación farmacéutica puede administrarse en forma de un aerosol o neblina. Para la administración de aerosol, la formulación se puede suministrar en forma finamente dividida junto con un surfactante y propelente. En otra realización, el dispositivo para suministrar la formulación al tejido respiratorio es en donde la formulación se vaporiza. Otros sistemas de administración conocidos en la técnica incluyen aerosoles de polvo seco, sistemas de administración de líquidos, inhaladores, nebulizadores de chorro de aire y sistemas propulsores (véase, por ejemplo, Patton (1998) *Biotechniques* 16: 141 143; Dura Pharmaceuticals, San Diego, California; Aradigm, Hayward, California; Aerogen, Santa Clara, California; e Inhale Therapeutic Systems, San Carlos, California).

Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, como etilvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los expertos en la técnica conocen los métodos para la preparación de tales formulaciones. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células o tejidos que usan anticuerpos o proteínas de la cubierta viral) también se pueden usar como vehículos farmacéuticamente aceptables.

- Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,235,871; 4,501,728; 4,522,811; 4,837,028; 6,110,490; 6,096,716; 5,283,185; 5,279,833; Akimaru (1995) Cytokines Mol. El Ther. 1: 197 210; Alving (1995) Immunol. Rev. 145: 5 31; y Szoka (1980) Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467). Las microesferas o cápsulas biodegradables u otras configuraciones de polímeros biodegradables capaces de la liberación sostenida de moléculas pequeñas, incluidos los péptidos, son conocidas en el arte (véase, por ejemplo, Putney (1998) Nat. Biotechnol. 16: 153 157). Los compuestos de la invención pueden incorporarse dentro de micelas (véase, por ejemplo, Suntres (1994) J. Pharm. Pharmacol. 46:23 28; Woodle (1992) Pharm. Res. 9: 260 265). Los antagonistas se pueden unir a la superficie de la monocapa lipídica o bicapa. Por ejemplo, los antagonistas se pueden unir a los liposomas que contienen hidrazida-PEG- (diestearoilfosfatidil) etanolamina (véase, por ejemplo, Zalipsky (1995) Bioconjug. Chem. 6: 705 708). Alternativamente, se puede usar cualquier forma de membrana lipídica, como una membrana lipídica plana o la membrana celular de una célula intacta, por ejemplo, un glóbulo rojo. Las formulaciones que contienen liposomas y lípidos pueden administrarse por cualquier medio, incluyendo, por ejemplo, la administración intravenosa, transdérmica (véase, por ejemplo, Vutla (1996) J. Pharm. Sci. 85: 5 8), transmucosa u oral.
- 15 Las composiciones de la presente invención se pueden combinar con otras unidades estructurales terapéuticas o unidades estructurales de generación de imágenes/diagnóstico tal como se proporciona en el presente documento. Las unidades estructurales terapéuticas y/o las unidades estructurales de imagen se pueden proporcionar como una composición separada, o como una unidad estructural conjugada. Los enlazadores pueden incluirse para unidades estructurales conjugadas según sea necesario y se han descrito en otra parte en este documento.
- 20 Los anticuerpos descritos en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein et al., Proc. Natl Acad Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y la Patente de los Estados Unidos Nos. 4,485,045 y 4,544,545. En la patente de los Estados Unidos No. 5,013,556 se describen liposomas con tiempo de circulación mejorado.
- 25 Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruden a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse con los liposomas como se describe en Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286 288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico (como Doxorubicina) está contenido opcionalmente dentro del liposoma. Véase Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81 (19): 1484 (1989).
- 30 También se pueden usar lipofecciones o liposomas para administrar el anticuerpo anti-LOX, o un fragmento de anticuerpo, en las células. Cuando se usan fragmentos de anticuerpos, se puede usar el fragmento inhibitorio más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, en función de las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que conservan la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína objetivo. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco et al., Proc. Natl Acad Sci. USA, 90: 7889 7893 (1993). La formulación aquí también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, incluyendo, por ejemplo, aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Alternativamente, o además, la composición puede comprender un agente que mejora su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citoquina, agente quimioterapéutico o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito previsto. Los ingredientes activos también pueden ser atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas), microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, supra.
- 45 Las formulaciones para administración *in vivo* son estériles. La esterilización se puede lograr fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.
- 50 Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxiethyl) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de los Estados Unidos No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-glicólico degradables como el LUPRON DEPOT<sup>®</sup> (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y poli-D(-)-ácido 3-hidroxi-butírico. Mientras que los polímeros como el etileno-acetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo que

5 resulta en una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlace S-S intermolecular a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando los residuos de sulfhidrilo, liofilizándose de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

10 Los expertos en la técnica conocerán otras composiciones y técnicas farmacéuticas diferentes para su preparación y uso a la luz de la presente descripción. Para obtener una lista detallada de las composiciones farmacológicas adecuadas y las técnicas administrativas asociadas, puede referirse a las enseñanzas detalladas en este documento, que pueden complementarse con textos como Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (Lippincott, Williams & Wilkins 2003).

15 Las composiciones farmacéuticas contempladas por la presente invención se han descrito más arriba. En una realización de la presente invención, las composiciones farmacéuticas están formuladas para estar libres de pirógenos de manera que sean aceptables para la administración a pacientes humanos. Los expertos en la técnica comprenden bien las composiciones farmacéuticas para la detección de pirógenos y la preparación de composiciones farmacéuticas libres de pirógenos.

20 Una realización de la presente invención contempla el uso de cualquiera de las composiciones farmacéuticas de la presente invención para preparar un medicamento para tratar un trastorno de la presente divulgación. Los medicamentos pueden formularse en función de las características físicas del paciente/sujeto que necesita tratamiento, y pueden formularse en formulaciones únicas o múltiples en función de la etapa del tejido canceroso. Los medicamentos de la presente invención pueden envasarse en un paquete farmacéutico adecuado con etiquetas apropiadas para su distribución a hospitales y clínicas en las que la etiqueta es para la indicación de tratar un trastorno como se describe en el presente documento en un sujeto. Los medicamentos se pueden envasar en una o varias unidades. Las instrucciones para la dosificación y administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluirse con los paquetes y kits farmacéuticos descritos a continuación.

#### 25 VI. Purificación por afinidad

30 Los anticuerpos anti-LOXL2 descritos en el presente documento son útiles para la purificación por afinidad de LOXL2 a partir de cultivos de células recombinantes, fuentes naturales o muestras de biopsia de tejido (tejido y/o suero). En este proceso, los anticuerpos contra LOXL2 se inmovilizan en un soporte adecuado, como una resina Sephadex o papel de filtro, utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Luego, el anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el LOXL2 que se va a purificar, y luego el soporte se lava con un solvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material de la muestra, excepto el LOXL2, que se une al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado que liberará el LOXL2 del anticuerpo.

#### VII. Paquetes y Kits

35 Una realización de la presente solicitud incluye un paquete o kit farmacéutico útil para los métodos proporcionados en el presente documento. Una realización de tales paquetes o kits farmacéuticos incluye preparaciones (composiciones) de los antagonistas como se proporcionan en el presente documento.

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

45 Los paquetes y kits farmacéuticos pueden incluir adicionalmente un excipiente, un vehículo, un agente de regulación, un conservante o un agente estabilizante en una formulación farmacéutica. Cada componente del kit se puede incluir dentro de un contenedor individual y todos los diferentes contenedores pueden estar dentro de un solo paquete. Los kits de invención pueden diseñarse para temperatura ambiente o almacenamiento en frío.

50 Además, las preparaciones pueden contener estabilizadores para aumentar la vida útil de los kits e incluyen, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA) u otros estabilizadores convencionales conocidos. Cuando las composiciones están liofilizadas, el kit puede contener preparaciones adicionales de soluciones para reconstituir las preparaciones. Las soluciones aceptables son bien conocidas en el arte e incluyen, por ejemplo, solución salina regulada con fosfato farmacéuticamente aceptable (PBS).

Adicionalmente, los paquetes o kits farmacéuticos proporcionados en el presente documento pueden incluir además cualquiera de las demás unidades estructurales proporcionadas en el presente documento, tales como, por ejemplo, un agente quimioterapéutico como se describe en otro lugar con más detalle.

55 Los paquetes y kits farmacéuticos de la presente invención pueden incluir además los componentes para un ensayo proporcionado en el presente documento, tal como, por ejemplo, un ensayo ELISA. Alternativamente, las preparaciones de los kits se utilizan en inmunoensayos, como la inmunohistoquímica para probar las secciones de

biopsia de tejido del paciente. Los paquetes y kits farmacéuticos de la presente invención pueden incluir además los componentes para la recolección de una muestra.

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

10 El término "material de empaque" se refiere a una estructura física que contiene los componentes del kit. El material de empaque puede mantener los componentes de forma estéril y puede estar hecho de material comúnmente utilizado para tales fines (por ejemplo, papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, papel de aluminio, ampollas, etc.). La etiqueta o el prospecto de empaque pueden incluir instrucciones escritas apropiadas. Los kits de la invención, por lo tanto, pueden incluir adicionalmente etiquetas o instrucciones para usar los componentes del kit en cualquier método de la invención. Un kit puede incluir un compuesto de la invención en un paquete o dispensador junto con instrucciones para administrar el compuesto en un método de la invención.

15 Las instrucciones pueden incluir instrucciones para practicar cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, incluidos los métodos de tratamiento, detección, monitorizo o diagnóstico. Las instrucciones también pueden incluir indicaciones de un punto final clínico satisfactorio o cualquier síntoma adverso que pueda ocurrir, o información adicional requerida por agencias reguladoras como la Food and Drug Administration para su uso en un sujeto humano.

20 Las instrucciones pueden estar en "material impreso", por ejemplo, en papel o cartón dentro del kit o pegadas en el kit, o en una etiqueta pegada al kit o material de empaque, o adheridas a un vial o tubo que contenga un componente del equipo. Además, las instrucciones pueden incluirse en un medio legible por ordenador, como un disco (disquete o disco duro), CD óptico como CD o DVD-ROM/RAM, cinta magnética, medios de almacenamiento eléctrico como RAM y ROM, punta IC e híbridos de estos, tales como medios de almacenamiento magnético/óptico.

25 Las composiciones del kit de la presente invención se pueden formular en unidades únicas o múltiples para una prueba única o para pruebas múltiples.

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

30 En este documento se proporciona un kit para tratar una afección asociada con LOXL2, que contiene una composición de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en este documento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Una condición asociada con LOXL2 puede ser, por ejemplo, un tumor, una metástasis, angiogénesis o fibrosis. En una realización, los anticuerpos en tales kits pueden comprender una etiqueta detectable, una etiqueta terapéutica o ambas. En otra realización, los anticuerpos en tales kits pueden ser liofilizados.

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

#### VIII. Métodos de diagnóstico

40 La presente invención también proporciona métodos para diagnosticar, monitorizar, estadificar o detectar las enfermedades descritas anteriormente utilizando agentes que reconocen diferentes formas de LOXL2. Por ejemplo, como se describió anteriormente, los anticuerpos contra diferentes formas de LOXL2, la forma preproteína, secretada, madura o activa, pueden usarse para estos fines. Los métodos de diagnóstico, monitorizo, estadificación o detección de las enfermedades descritas anteriormente mediante el uso de agentes que reconocen diferentes formas de LOXL2 pretenden abarcar todas las enfermedades e indicaciones descritas en este documento.

Como se describió anteriormente, el LOXL2 activa se escinde y puede detectarse en virtud de su cambio en el peso molecular (inmunotransferencia) o mediante el uso de anticuerpos que detectan la forma de LOXL2 no escindida o escindida, junto con la localización celular mediante el uso de diversos métodos de detección, como la inmunohistoquímica (IHC).

50 Se cree que la matriz extracelular y el medio condicionado deben contener LOXL2 activa procesado proteolíticamente, mientras que el LOXL2 inactivo no escindido debe localizarse intracelularmente. También se puede detectar algo de LOXL2 activa y segmentada dentro de la célula como consecuencia de la captación del espacio extracelular.

55 Las muestras de individuos se pueden recolectar y analizar determinando niveles de LOX inactivos o activos. Este análisis se puede realizar antes del inicio del tratamiento utilizando una terapia específica para la lisil oxidasa para identificar tumores que tienen una expresión o actividad de LOXL2 activa elevada. Dicho análisis de diagnóstico puede

realizarse utilizando cualquier muestra, incluidas, entre otras, células, proteínas o extractos de membrana de células, fluidos biológicos como esputo, sangre, suero, plasma u orina, o muestras biológicas como muestras de tejido, fijadas con formalina o secciones de tejido congelado.

5 Se puede emplear cualquier método adecuado para la detección y análisis de LOXL2 inactivo y/o activo. Como se usa en el presente documento, el término "muestra" se refiere a una muestra de un humano, animal o muestra de investigación, por ejemplo, una célula, tejido, órgano, fluido, gas, aerosol, suspensión, coloide o material coagulado. Las muestras también incluyen, pero no se limitan a, proteínas o extractos de membrana de células, fluidos biológicos como esputo, sangre, suero, plasma u orina, o muestras biológicas como secciones de tejido congeladas o fijadas con formalina que emplean los anticuerpos descritos en este documento. El término "muestra" también puede referirse a  
10 una célula, tejido, órgano o fluido que se toma recientemente de un ser humano o animal, o a una célula, tejido, órgano o fluido que se procesa o almacena. La muestra se puede analizar *in vivo*, por ejemplo, sin retirarla del ser humano o animal, o se puede analizar *in vitro*. La muestra se puede analizar después del procesamiento, por ejemplo, por métodos histológicos.

15 Se pueden utilizar diversas técnicas de ensayo para diagnóstico conocidas en el arte, como los ensayos de unión competitiva, los ensayos en sándwich directos o indirectos y los ensayos de inmunoprecipitación realizados en fases heterogéneas u homogéneas (Zola, Anticuerpos monoclonales: Manual de técnicas, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158). Los anticuerpos utilizados en los ensayos de diagnóstico pueden marcarse con una unidad estructural detectable. La unidad estructural detectable produce directa o indirectamente una señal detectable. Por ejemplo, la  
20 unidad estructural detectable puede ser cualquiera de los descritos aquí como, por ejemplo, un radioisótopo, como  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^{125}\text{I}$ , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, como el isotiocianato de fluoresceína (FITC), Texas rojo, cianina, fotociana, rodamina o luciferina, o una enzima, como la fosfatasa alcalina, la  $\beta$ -galactosidasa o la peroxidasa de rábano picante. Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo con la unidad estructural detectable, incluidos los métodos descritos por Hunter et al., Nature, 144: 945 (1962); David et al., Biochemistry, 13: 1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40: 219 (1981); y Nygren, J. Histochem. y  
25 Cytochem., 30: 407 (1982).

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

En una realización, se proporciona un método para diagnosticar metástasis de cáncer en un sujeto, que comprende: evaluar los niveles de LOXL2 activas o la actividad en la sangre, por lo que un cambio en los niveles de LOXL2 activas o actividad (por ejemplo, en la expresión de genes, actividad enzimática, etc.) en la sangre en comparación con una muestra de referencia, indica la presencia de crecimiento tumoral metastásico. En algunos casos, los niveles de LOXL2  
40 activa o las actividades en la sangre pueden ser más bajos que los medidos antes, lo que puede indicar que el sujeto tiene un mayor riesgo de metástasis de cáncer; que el cáncer ha hecho metástasis; o que la metástasis del cáncer ha aumentado. La muestra de referencia puede derivar del mismo sujeto, tomada del mismo tumor en un punto temporal diferente o de otro sitio del cuerpo, o de otro individuo.

En otra realización, se proporciona un método para diagnosticar metástasis de cáncer en un sujeto que tiene un tumor, que comprende: evaluar los niveles de LOXL2 activas o la actividad en el tumor, por lo que un cambio en los niveles de LOXL2 activas o la actividad en el tumor en comparación con muestra de referencia indica la presencia de crecimiento tumoral metastásico. En algunos casos, los niveles o actividades de LOXL2 activas en el tumor pueden ser más altos que los medidos antes, lo que puede indicar que el sujeto tiene un mayor riesgo de metástasis de cáncer; que el cáncer ha hecho metástasis; o que la metástasis del cáncer ha aumentado. La muestra de referencia puede derivar del mismo sujeto, tomada del mismo tumor en un punto temporal diferente o de otro sitio del cuerpo, o de otro individuo.  
50

En este documento también se proporciona un método para estadificar el crecimiento tumoral o la metástasis en un sujeto, que comprende evaluar los niveles de LOXL2 (por ejemplo, hLOXL2) en un tumor del sujeto, por lo que un cambio en el nivel de LOXL2 (por ejemplo, en la expresión génica o actividad enzimática) en el tumor en comparación con una muestra de referencia, indica la presencia de crecimiento tumoral metastásico. En algunos casos, los niveles o actividades de LOXL2 en el tumor pueden ser más altos que aquellos medidos antes para el mismo sujeto, o más altos que los de una muestra de referencia tomada de un tejido normal, lo que puede indicar que el paciente está en mayor riesgo de metástasis tumoral; que el tumor ha hecho metástasis; o que la metástasis del tumor ha aumentado.  
55

La estadificación de los cánceres de tumores sólidos es bien conocida. El sistema TNM es uno de los sistemas de estadificación más utilizados. Este sistema ha sido aceptado por la International Union Against Cancer (UICC) y el  
60

American Joint Committee on Cancer (AJCC). La mayoría de las instalaciones médicas utilizan el sistema TNM como su método principal para la notificación del cáncer. PDQ®, la completa base de datos de cáncer del NCI, también utiliza el sistema TNM. El sistema TNM, referido aquí como "estadificación", se basa en la extensión del tumor, la extensión de la propagación a los ganglios linfáticos y la presencia de metástasis.

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

La medición de los niveles de LOXL2 activas puede tomar la forma de un ensayo inmunológico, que detecta la presencia de una proteína LOXL2 activa con un anticuerpo contra la proteína, preferiblemente un anticuerpo que se une específicamente a LOXL2 activa. También pueden usarse fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos anti-  
15 LOXL2.

Los inmunoensayos también pueden usarse junto con la fluorescencia inducida por láser (véase, por ejemplo, Schmalzing and Nashabeh, Electrophoresis 18: 2184-93 (1997); y Bao, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. 699: 463-80 (1997)). Los inmunoensayos de liposomas, como los inmunoensayos de liposomas de inyección de flujo y los  
20 inmunosensores de liposomas, también se pueden usar para determinar los niveles de LOXL2 activas de acuerdo con un método de la invención (Rongen et al., J. Immunol. Methods 204: 105-133 (1997). Inmunoensayos como los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), pueden ser particularmente útiles en un método de la invención. Un radioinmunoensayo también puede ser útil para determinar si una muestra es positiva para LOXL2 activa o para determinar el nivel de LOXL2 activa usando, por ejemplo, un anticuerpo secundario marcado con yodo-125, se puede usar.  
25

Además, se puede medir la actividad de LOXL2 activa, ignorando así la cantidad de enzima inactiva. La actividad enzimática de LOXL2 activa se puede medir de varias maneras, utilizando una elastina soluble o colágeno soluble con lisina marcada como sustrato. Los detalles de un ensayo de actividad se dan en Royce et al., "Copper metabolism in mottled mouse mutants. The effect of copper therapy on lysyl oxidase activity in brindled (Mobr) mice", Biochem J. 1982, 15 de febrero; 202(2): 369-371. Un ensayo de ejemplo es un ensayo cromogénico, como el descrito por Palamakumbura, et al. "A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples", Anal Biochem. 2002 15 de enero; 300(2): 245-51.  
30

Además de medir el nivel de LOXL2 en la sangre (u orina), se pueden medir productos secundarios de la actividad de LOXL2. Por ejemplo, la desoxipiridinolina (Dpd) se forma por la acción enzimática de la lisil oxidasa en los residuos de lisina. Dpd se libera en la circulación como resultado de la degradación osteoclástica del hueso. No se puede reutilizar, se elimina por el riñón y se excreta sin cambios en la orina. Por lo tanto, se puede utilizar una prueba basada en el ensayo Gamma BCT Dpd de Immunodiagnostic Systems (IDS), que utiliza un tubo recubierto RIA con un anticuerpo monoclonal anti-Dpd para medir la actividad enzimática.  
35

Los anticuerpos anti-LOXL2 descritos en el presente documento también se pueden usar en el diagnóstico de enfermedades o afecciones asociadas con un metabolismo aberrante del colágeno, como diversas afecciones fibróticas, por ejemplo, fibrosis pulmonar, así como en retinopatía vítrea proliferativa, cicatrización quirúrgica, esclerosis sistémica, esclerodermia, contracción de la herida, cicatrices hipertróficas, fibromatosis (especialmente la enfermedad de Dupuytren) y queloides.  
40

#### IX. Métodos terapéuticos

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

En el presente documento se describe un método para inhibir LOXL2 poniendo en contacto una muestra o un tejido celular con cualquiera de los anticuerpos anti-LOXL2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento. La unión de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a LOXL2 inhibe la actividad enzimática de LOXL2.  
50

En cualquiera de tales métodos, el contacto puede ocurrir *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

La inhibición de LOXL2 puede tener uno o más efectos en un sujeto tal como, por ejemplo, reducción en el crecimiento tumoral, reducción en la angiogénesis, reducción en una enfermedad fibrótica y/o disminución de la formación de matriz extracelular. Las enfermedades fibróticas incluyen, entre otras, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis cardíaca y escleroderma.  
55

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

5 Como se usa en el presente documento, "prevención" se refiere a la profilaxis, prevención de la aparición de síntomas, prevención de la progresión de una enfermedad o trastorno asociado con fibrosis o correlacionado con la actividad LOXL2. Tal como se usa en el presente documento, "tratar" o "tratamiento" significa la estasis o un aplazamiento del desarrollo de los síntomas asociados a una enfermedad o trastorno descrito en el presente documento. Los términos incluyen, además, mejorar los síntomas no controlados o no deseados existentes, prevenir síntomas adicionales y mejorar o prevenir las causas metabólicas subyacentes de los síntomas. Por lo tanto, los términos denotan que se ha otorgado un resultado beneficioso a un sujeto mamífero con una enfermedad o síntoma, o con la posibilidad de desarrollar dicha enfermedad o síntoma. Se logra una respuesta cuando el paciente experimenta alivio parcial o total, o reducción de signos o síntomas de enfermedad, e incluye específicamente, sin limitación, la prolongación de la supervivencia. Los tiempos de supervivencia sin progresión esperados se pueden medir en meses o años, dependiendo de los factores pronósticos, incluido el número de recaídas, el estadio de la enfermedad y otros factores. 10 La supervivencia prolongada incluye, sin limitación, tiempos de al menos 1 mes (mes), alrededor de al menos 2 meses (meses), alrededor de al menos 3 meses, alrededor de al menos 4 meses, alrededor de al menos 6 meses, alrededor de al menos 1 año, aproximadamente al menos 2 años, aproximadamente al menos 3 años o más. La supervivencia global también se puede medir en meses o años. Los síntomas del paciente pueden permanecer estáticos o disminuir. 15

20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran en cantidades terapéuticamente eficaces que son eficaces para producir algún efecto terapéutico deseado con una relación razonable de beneficio/riesgo aplicable a cualquier tratamiento médico. Para la administración de las presentes composiciones farmacéuticas a pacientes humanos, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse mediante una metodología conocida por un experto en la técnica para que esté sustancialmente libre de pirógenos de manera que no induzcan una respuesta inflamatoria.

25 Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad eficiente" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico que cuando se administra solo o en combinación con otro agente terapéutico a una célula, tejido o sujeto es eficaz para prevenir o mejorar la condición de la enfermedad o la progresión de la enfermedad. Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad del compuesto suficiente para mejorar los síntomas, por ejemplo, tratamiento, curación, prevención o mejora de la condición médica relevante, o un aumento en la tasa de tratamiento, curación, prevención o mejora de dichas condiciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual administrado solo, una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que producen el efecto terapéutico, ya sea administrado en combinación, en serie o simultáneamente. Por ejemplo, cuando se emplea la administración *in vivo* de un anticuerpo anti-LOXL2, las cantidades de dosificación normales pueden variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más por día, preferiblemente aproximadamente 1 µg/kg/día a 50 mg/kg/día, opcionalmente alrededor de 100 µg/kg/día a 20 mg/kg/día, 500 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, o 1 mg/kg/día a 10 mg/Kg/día, dependiendo de la vía de administración. 30 35

Una respuesta efectiva de la presente invención se logra cuando el paciente experimenta un alivio o reducción parcial o total de los signos o síntomas de la enfermedad, e incluye específicamente, sin limitación, la prolongación de la supervivencia. Los tiempos de supervivencia libres de progresión esperados se pueden medir en meses o años, dependiendo de los factores pronósticos que incluyen el número de recaídas, el estadio de la enfermedad y otros factores. La supervivencia prolongada incluye, sin limitación, tiempos de al menos 1 mes (mes), alrededor de al menos 2 meses, alrededor de al menos 3 meses, alrededor de al menos 4 meses, alrededor de al menos 6 meses, alrededor de al menos 1 año, aproximadamente al menos 2 años, alrededor de al menos 3 años, o más. La supervivencia global también se mide en meses o años. Los síntomas del paciente pueden permanecer estáticos y la carga del tumor puede no aumentar. 40 45

Un médico o veterinario con experiencia ordinaria en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficiente (ED50) de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario puede comenzar las dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta lograr el efecto deseado. 50

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" significa sujetos mamíferos. Los sujetos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a humanos, monos, perros, gatos, ratones, ratas, vacas, caballos, cabras y ovejas. En algunas realizaciones, el sujeto tiene cáncer y puede tratarse con el agente de la presente invención como se describe a continuación.

55 Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que se usan en una forma adecuadamente hidratada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, tal como se describe a continuación o mediante otros métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxicos para el paciente.

5 El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto particular de la presente invención empleado, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con la composición particular empleada, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico anterior del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

10 En un aspecto proporcionado en el presente documento, la administración de los anticuerpos da como resultado una mejora del estado del sujeto. En otro aspecto, la administración de los anticuerpos evita que la condición del sujeto empeore, y/o prolonga la supervivencia del paciente.

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

15 Las composiciones pueden administrarse local, regional o sistémicamente por cualquier ruta adecuada proporcionada en el presente documento.

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

20 Si es necesario, para los tratamientos del cáncer, los métodos pueden incluir además la extirpación quirúrgica del cáncer y/o la administración de un agente o tratamiento contra el cáncer. La administración de dicho agente o tratamiento contra el cáncer puede ser concurrente con la administración de las composiciones descritas en el presente documento. En otras partes del presente documento se han proporcionado agentes contra el cáncer.

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

30 Las indicaciones que pueden tratarse utilizando las formulaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen aquellas que implican una proliferación celular no deseada o no controlada. Dichas indicaciones incluyen tumores benignos, diversos tipos de cáncer, como tumores primarios y metástasis tumorales, reestenosis (por ejemplo, lesiones coronarias, carótideas y cerebrales), trastornos hematológicos, estimulación anormal de las células endoteliales (aterosclerosis), lesiones en el tejido corporal debido a cirugía, cicatrización anormal de heridas, angiogénesis anormal, enfermedades que producen fibrosis del tejido, degeneración macular, glaucoma; degeneración macular relacionada con la edad (DMAE húmeda y DMAE seca), aterosclerosis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, esclerodermia, aterosclerosis y enfermedad de Alzheimer, trastornos del movimiento repetitivo, trastornos de tejidos que no están altamente vascularizados, y respuestas proliferativas asociadas a trasplantes de órganos.

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

40 La fibrosis pulmonar incluye, pero no se limita a, fibrosis pulmonar idiopática (FPI) o alveolitis criptogénica fibrosa, neumonía intersticial fibrosa crónica, enfermedad pulmonar intersticial (EPI), enfermedad pulmonar parenquimatosa difusa (DPLD), enfisema y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), y asma crónica.

La fibrosis cardíaca incluye, pero no se limita a, insuficiencia cardíaca congestiva, cardiomiopatía y defectos postinfarto de miocardio en la función cardíaca.

45 La fibrosis renal incluye, pero no se limita a, nefropatía diabética, reflujo vesicoureteral, fibrosis renal tubulointersticial; glomerulonefritis o nefritis glomerular, que incluye glomeruloesclerosis focal segmentaria y glomerulonefritis membranosa, y nefritis glomerular mesangiocapilar.

50 En general, las células en un tumor benigno conservan sus características diferenciadas y no se dividen de una manera completamente incontrolada. Un tumor benigno suele ser localizado y no metastásico. Los tipos específicos de tumores benignos que pueden tratarse utilizando la presente invención incluyen hemangiomas, adenoma hepatocelular, hemangioma cavernoso, hiperplasia nodular focal, neuromas acústicos, neurofibroma, adenoma de conductos biliares, cistoma de conductos biliares, fibroma, lipomas, leiomiomas, mesoteliomas, teratomas, mixomas, hiperplasia nodular regenerativa, traqueomas, granulomas piógenos, lunares, fibromas uterinos, adenomas tiroideos, adenomas adrenocorticales y adenomas hipofisarios.

En un tumor maligno, las células se vuelven indiferenciadas, no responden a las señales de control de crecimiento del cuerpo y se multiplican de manera incontrolada. El tumor maligno es invasivo y puede propagarse a sitios distantes (metástasis). Los tumores malignos generalmente se dividen en dos categorías: primaria y secundaria. Los tumores primarios surgen directamente del tejido en donde se encuentran. Un tumor secundario, o metástasis, es un tumor que se origina en otras partes del cuerpo, pero ahora se ha diseminado a un órgano distante. Las rutas comunes para la metástasis son el crecimiento directo en estructuras adyacentes, la diseminación a través de los sistemas vascular y linfático y el desplazamiento a lo largo de los planos tisulares y los espacios corporales (líquido peritoneal, líquido cefalorraquídeo, etc.)

Los tipos específicos de cáncer o tumores malignos, ya sea primarios o secundarios, que pueden tratarse con esta invención incluyen, entre otros, cáncer de pulmón (incluido el adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, carcinoma bronquioloalveolar, carcinoma de células no pequeñas, carcinoma de células pequeñas, mesotelioma); cáncer de mama (incluyendo carcinoma ductal, carcinoma lobular, cáncer de mama inflamatorio, carcinoma de células claras, carcinoma mucinoso); cáncer colorrectal (cáncer de colon, cáncer de recto); cáncer anal; cáncer pancreático (incluyendo adenocarcinoma pancreático, carcinoma de células de los islotes, tumores neuroendocrinos); cáncer de próstata; carcinoma de ovario (carcinoma epitelial de ovario o tumor del estroma epitelial de superficie, que incluye tumor seroso, tumor endometriode y cistoadenocarcinoma mucinoso, tumor del estroma del cordón sexual); carcinoma del conducto biliar y del hígado (incluido carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, hemangioma); carcinoma esofágico (incluido adenocarcinoma esofágico y carcinoma de células escamosas); linfoma no Hodgkin; carcinoma de vejiga; carcinoma del útero (incluido el adenocarcinoma endometrial, carcinoma uterino seroso papilar, el carcinoma uterino de células claras, los sarcomas uterinos y los leiomiomas, los tumores mullerianos mixtos); glioma, glioblastoma, meduloblastoma y otros tumores del cerebro; cánceres de riñón (incluyendo carcinoma de células renales, carcinoma de células claras, tumor de Wilms); cáncer de cabeza y cuello (incluidos los carcinomas de células escamosas); cáncer de estómago (adenocarcinoma de estómago, tumor del estroma gastrointestinal); mieloma múltiple; cáncer testicular; tumor de células germinales; tumor neuroendocrino; cáncer de cuello uterino; carcinoides del tracto gastrointestinal, mama y otros órganos; carcinoma de células en anillo de sello; tumores mesenquimales que incluyen sarcomas, fibrosarcomas, hemangioma, angiomas, hemangiopericitoma, hiperplasia estromal pseudoangiomatosa, miofibroblastoma, fibromatosis, tumor miofibroblástico inflamatorio, lipoma, angioliipoma, tumor de células granulares, neurofibroma, schwannoma, angiosarcoma, liposarcoma, rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, leiomioma o leiomyosarcoma.

El término "metástasis" significa la capacidad de las células tumorales para invadir los tejidos del huésped y hacer metástasis en sitios de órganos distantes, a menudo específicos. Como se sabe, esta es la característica principal de los crecimientos tumorales letales. La formación de metástasis se produce a través de una serie compleja de interacciones únicas entre las células tumorales y los tejidos y células normales del huésped. En el contexto de la presente invención, la actividad de la lisil oxidasa es crítica en el crecimiento metastático de tumores, es decir, el crecimiento de metástasis, particularmente en condiciones hipóxicas. Como los tumores hipóxicos también son los más agresivos y resistentes a la quimioterapia tradicional, los agentes que modulan la expresión y/o función de la lisil oxidasa brindan una nueva terapia contra los tumores metastáticos, particularmente los tumores resistentes a la quimioterapia. "Metástasis" se distingue de la invasión. Como se describe en "Understanding Cancer Series: Cancer", en el sitio de Internet: [cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/cancer](http://cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/cancer); la invasión se refiere a la migración directa y la penetración de las células cancerosas en los tejidos vecinos.

Los trastornos hematológicos incluyen el crecimiento anormal de las células sanguíneas que puede conducir a cambios displásicos en las células sanguíneas y tumores malignos hematológicos, tales como diversas leucemias. Ejemplos de trastornos hematológicos incluyen, entre otros, leucemia mieloide aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena crónica, síndromes mielodisplásicos y anemia de células falciformes.

La leucemia mieloide aguda (LMA) es el tipo más común de leucemia aguda que se presenta en adultos. Varios trastornos genéticos hereditarios y estados de inmunodeficiencia se asocian con un mayor riesgo de AML. Estos incluyen trastornos con defectos en la estabilidad del ADN, que conducen a roturas cromosómicas aleatorias, como el síndrome de Bloom, la anemia de Fanconi, afinidades de Li-Fraumeni, ataxia-telangiectasia y agammaglobulinemia ligada al cromosoma X.

La leucemia promielocítica aguda (APML) representa un subgrupo distinto de AML. Este subtipo se caracteriza por blastos promielocíticos que contienen la translocación cromosómica 15;17. Esta translocación conduce a la generación de transcripto de fusión que comprende el receptor de ácido retinoico y una secuencia PML.

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una enfermedad heterogénea con características clínicas distintas mostradas por diversos subtipos. Se han demostrado anomalías citogenéticas recurrentes en la ALL. La anomalía citogenética más común es la translocación 9;22. El cromosoma Filadelfia resultante representa un mal pronóstico del paciente.

La leucemia mielógena crónica (LMC) es un trastorno mieloproliferativo clonal de una célula madre pluripotente. La CML se caracteriza por una anomalía cromosómica específica que involucra la translocación de los cromosomas 9 y 22, creando el cromosoma Filadelfia. La radiación ionizante está asociada con el desarrollo de la CML.

Los síndromes mielodisplásicos (MDS) son trastornos de células madre hematopoyéticas clonales heterogéneos agrupados debido a la presencia de cambios displásicos en uno o más de los linajes hematopoyéticos, incluidos los cambios displásicos en las series mieloide, eritroide y megacariocítica. Estos cambios dan como resultado citopenias en uno o más de los tres linajes. Los pacientes afectados por MDS típicamente desarrollan complicaciones relacionadas con anemia, neutropenia (infecciones) o trombocitopenia (sangrado). En general, entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 70% de los pacientes con SMD desarrollan leucemia aguda.

Se ha encontrado que la administración de inhibidores de LOXL2 reduce el tamaño de los tumores existentes, previene las metástasis y reduce (o incluso elimina) las metástasis existentes (véase, por ejemplo, Molnar et al. (2003) Biochim. Biophys. Acta. 1647: 220-224).

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

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

En el presente documento se describe un método para prevenir o reducir el crecimiento del tumor, el crecimiento del tumor metastásico, en un sujeto *in vivo*, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficiente de un inhibidor de la actividad de LOXL2; y opcionalmente, un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, previniendo o reduciendo así el crecimiento del tumor, por ejemplo, en al menos 25%, 50%, 75%, 90% o 95%, en el sujeto tratado. Una descripción detallada de las composiciones adecuadas para uso en los métodos de tratamiento se proporciona más arriba. Tales métodos son útiles, por ejemplo, cuando el tumor es hipóxico. Los tumores hipóxicos se pueden identificar fácilmente usando métodos de rutina en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,674,693.

Además, en el presente documento se describe un método para tratar la metástasis en un sujeto con cáncer *in vivo*, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficiente de un inhibidor de LOXL2, inhibiendo así la metástasis, por ejemplo, al menos en un 25%, 50%, 75%, 90%, o 95%, en el sujeto tratado. En una realización, los inhibidores inhiben específicamente LOXL2 humano. Los anticuerpos que se van a utilizar en estos métodos se han descrito anteriormente. El anticuerpo puede ser deseable para minimizar las reacciones cruzadas con otros miembros de las familias de LOXL2 y, por lo tanto, reducir los posibles efectos secundarios adversos debidos a las complicaciones y la toxicidad normal del tejido.

En el presente documento también se proporciona un anticuerpo anti-LOXL2 para uso en un método para aumentar o aumentar las posibilidades de supervivencia de un sujeto con tumor metastásico, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficiente de un anticuerpo anti-LOXL2, aumentando así o potenciando las posibilidades de supervivencia del sujeto tratado durante un cierto período de tiempo, por ejemplo, al menos 10 días, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1.5 años, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 8 años, 10 años o más. El aumento en la supervivencia de un sujeto puede definirse, por ejemplo, como el aumento en la supervivencia de un modelo animal preclínico de metástasis de cáncer (por ejemplo, un ratón con cáncer metastásico), por un cierto período de tiempo, por ejemplo, al menos 10 días, 1 mes, 3 meses, 6 meses o 1 año, o al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces o 10 veces, más que un modelo animal de control (que tiene el mismo tipo de cáncer metastásico) sin el tratamiento con el método de la invención. Alternativamente, el aumento en la supervivencia de un mamífero también se puede definir, por ejemplo, como el aumento en la supervivencia de un paciente con metástasis de cáncer por un cierto período de tiempo, por ejemplo, por al menos 10 días, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1.5 años, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 8 años, 10 años o más que un paciente con el mismo tipo de cáncer metastásico, pero sin el tratamiento con el método de la invención. El paciente de control puede recibir un placebo o ser tratado con atención estándar de apoyo, como terapia química, productos biológicos y/o radiación que no incluyen el método de la invención como parte de la terapia.

En el presente documento también se proporciona un anticuerpo anti-LOXL2 para usar en un método para estabilizar la carga tumoral metastásica de un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficiente de un anticuerpo anti-LOXL2, estabilizando así la carga tumoral metastásica de un sujeto para un cierto período de tiempo, por ejemplo, durante al menos 10 días, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1.5 años, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 8 años, 10 años o más. La estabilización de la carga tumoral metastásica de un sujeto puede definirse como la estabilización de la carga tumoral metastásica de un modelo animal preclínico con carga tumoral metastásica (por ejemplo, un ratón con tumor metastásico) durante un cierto período de tiempo, por ejemplo, durante al menos 10 días, 1 mes, 3 meses, 6 meses o 1 año más que un modelo animal de control (que tiene el mismo tipo de tumor metastásico) sin el tratamiento con el método de la invención.

Los métodos de tratamiento también incluyen un método para aumentar la eficacia de los agentes quimioterapéuticos, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficiente de un anticuerpo anti-LOXL2; y opcionalmente, un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, aumentando así la eficacia de los agentes quimioterapéuticos (que se describen con más detalle anteriormente). También se contemplan métodos que implican el suministro de formulaciones inhibitorias de LOX en combinación con radioterapia. La radioterapia se puede usar para tratar casi todos los tipos de tumores sólidos, incluidos los cánceres de cerebro, mama, cuello uterino, laringe, pulmón, páncreas, próstata, piel, columna, estómago, útero o sarcomas de tejidos blandos. La radiación también se puede usar para tratar la leucemia y el linfoma (cánceres de las células formadoras de sangre y del sistema linfático, respectivamente). La dosis de radiación para cada sitio depende de una serie de factores, incluido el tipo de cáncer y si hay tejidos y órganos cercanos que pueden estar dañados por la radiación. La radiación normalmente se administrará como rayos X, donde la dosis depende del tejido que se está tratando. Los radiofármacos, también conocidos como radionucleótidos, también se pueden usar para tratar el cáncer, incluido el cáncer de tiroides, el cáncer que recurre en la pared torácica y el dolor causado por la propagación del cáncer al hueso (metástasis óseas). Los radionúclidos se han descrito con más detalle más arriba.

El sujeto que va a ser tratado o diagnosticado por los métodos descritos en el presente documento incluye a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un crecimiento tumoral metastásico. En un aspecto, un tumor es, por ejemplo, cáncer de pulmón (que incluye adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, carcinoma bronquioloalveolar, carcinoma de células no pequeñas, carcinoma de células pequeñas, mesotelioma); cáncer de mama (incluyendo carcinoma ductal, carcinoma lobular, cáncer de mama inflamatorio, carcinoma de células claras, carcinoma mucinoso); cáncer colorrectal (cáncer de colon, cáncer de recto); cáncer anal; cáncer pancreático (incluyendo adenocarcinoma pancreático, carcinoma de células de los islotes, tumores neuroendocrinos); cáncer de próstata; carcinoma de ovario (carcinoma epitelial de ovario o tumor del estroma epitelial de superficie, que incluye tumor seroso, endometriode y cistoadenocarcinoma mucinoso, tumor del estroma del cordón sexual); carcinoma del conducto biliar y del hígado (incluido el carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, hemangioma); carcinoma esofágico (incluido el adenocarcinoma esofágico y el carcinoma de células escamosas); linfoma no Hodgkin; carcinoma de vejiga; carcinoma del útero (incluido adenocarcinoma endometrial, carcinoma uterino seroso papilar, carcinoma uterino de células claras, sarcomas uterinos y leiomiomas, tumores mullerianos mixtos); glioma, glioblastoma, meduloblastoma y otros tumores del cerebro; cánceres de riñón (incluyendo carcinoma de células renales, carcinoma de células claras, tumor de Wilms); cáncer de cabeza y cuello (incluidos los carcinomas de células escamosas); cáncer de estómago (adenocarcinoma de estómago, tumor del estroma gastrointestinal); mieloma múltiple; cáncer testicular; tumor de células germinales; tumor neuroendocrino; cáncer de cuello uterino; carcinoides del tracto gastrointestinal, mama y otros órganos; carcinoma de células en anillo de sello; tumores mesenquimatosos, incluidos sarcomas, fibrosarcomas, hemangioma, angiomas, hemangiopericitoma, hiperplasia estromal pseudoangiomatoso, miofibroblastoma, fibromatosis, tumor miofibroblástico inflamatorio, lipoma, angioliopoma, tumor de células granulares, neurofibroma, schwannoma, angiosarcoma, liposarcoma, rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, leiomioma o un leiomyosarcoma. En una realización no limitativa, el tumor es un tumor de mama, un tumor de páncreas, un tumor de pulmón, un tumor de cuello uterino, un tumor de colon o un tumor de cabeza y cuello.

La presente invención también proporciona un anticuerpo anti-LOXL2 para uso en un método para prevenir o reducir el riesgo de metástasis tumoral en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficiente de un anticuerpo anti-LOXL2; y opcionalmente, un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, previniendo o reduciendo así previniendo o reduciendo el riesgo de metástasis tumoral. El inhibidor puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El sujeto que necesita un profiláctico de este tipo puede ser un individuo genéticamente predispuesto al cáncer o con un alto riesgo de desarrollar cáncer debido a diversas razones, como antecedentes familiares de cáncer y un entorno carcinogénico.

Los ejemplos del gen humano que está involucrado en el inicio o desarrollo del cáncer incluyen, entre otros, VHL (el gen Von Hippel Landau involucrado en el carcinoma de células renales); P16/INK4A (involucrado en el linfoma); E-cadherina (involucrada en metástasis de mama, tiroides, cáncer gástrico); hMLH1 (involucrado en la reparación del ADN en cáncer de colon, gástrico y endometrio); BRCA1 (involucrado en la reparación del ADN en el cáncer de mama y ovario); LKB1 (involucrado en cáncer de colon y mama); P15/INK4B (involucrado en leucemia como la AML y ALL); ER (receptor de estrógeno, involucrado en cáncer de mama, colon y leucemia); O6-MGMT (involucrado en la reparación del ADN en el cerebro, colon, cáncer de pulmón y linfoma); GST-pi (involucrado en cáncer de mama, próstata y renal); TIMP-3 (metaloproteasa tisular, involucrada en metástasis de cáncer de colon, renal y cerebral); DAPK1 (quinasa DAP, involucrada en la apoptosis de células de linfoma de células B); P73 (involucrado en la apoptosis de células de linfomas); AR (receptor de andrógenos, involucrado en el cáncer de próstata); RAR-beta (receptor beta del ácido retinoico, involucrado en el cáncer de próstata); receptor de endotelina-B (involucrado en el cáncer de próstata); Rb (involucrado en la regulación del ciclo celular del retinoblastoma); p53 (un importante gen supresor de tumores); P14ARF (involucrado en la regulación del ciclo celular); RASSF1 (involucrado en la transducción de señales); APC (involucrado en la transducción de señales); Caspasa-8 (involucrada en la apoptosis); TERT (involucrado en la senescencia); TERC (involucrado en la senescencia); TMS-1 (involucrado en la apoptosis); SOCS-1 (involucrado en la respuesta del factor de crecimiento del hepatocarcinoma); PITX2 (cáncer de mama hepatocarcinoma); MINT1; MINT2; GPR37; SDC4; MYO1D1; MDR1; THBS1; PTC1; y pMDRI, como se describe en

Santini et al. (2001) Ann. de Intern. Medicina. 134: 573-586. Las secuencias de nucleótidos de estos genes se pueden obtener del sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Cabe señalar que, aunque la leucemia es un cáncer de la sangre, podría afectar a otros órganos o, en efecto, metastatizar. En las leucemias agudas, las células anormales pueden acumularse en el sistema nervioso central, los testículos, la piel y cualquier otro órgano del cuerpo. Debido a que la leucemia ya afecta a toda la médula ósea del cuerpo y, en muchos casos, se ha diseminado a otros órganos como el hígado, el bazo y los ganglios linfáticos, la estadificación de la leucemia depende de otra información que refleje las perspectivas de supervivencia del paciente. Las leucemias incluyen, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC) y leucemia de células pilosas (HCL). Se utilizan diferentes sistemas de estadificación para diferentes tipos de leucemia crónica. Algunos tipos no tienen ningún sistema de estadificación. Los métodos de estadificación se describen con más detalle a continuación.

El tratamiento de la proliferación celular anormal debido a lesiones en el tejido corporal durante la cirugía puede ser posible para una variedad de procedimientos quirúrgicos, incluyendo cirugía de articulaciones, cirugía intestinal y cicatrización queloide. Las enfermedades que producen tejido fibrótico incluyen enfisema. Los trastornos del movimiento repetitivo que pueden tratarse utilizando la presente invención incluyen el síndrome del túnel carpiano. Un ejemplo de trastornos de proliferación celular que pueden tratarse usando la invención es un tumor óseo. En este documento se proporciona un anticuerpo anti-LOXL2 para usar en un método para prevenir o reducir el riesgo de proliferación celular anormal debido a lesiones en el tejido corporal durante una cirugía o una enfermedad que produce tejido fibrótico en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficiente de un anticuerpo anti-LOXL2; y opcionalmente, un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, previniendo o reduciendo así la proliferación celular anormal debido a lesiones en el tejido corporal durante la cirugía. El inhibidor puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El sujeto que necesita un profiláctico de este tipo puede ser un individuo genéticamente predispuesto al cáncer o con un alto riesgo de desarrollar cáncer debido a diversas razones, como antecedentes familiares de cáncer y un entorno carcinogénico. En una realización, la enfermedad puede ser, por ejemplo, cirugía de articulaciones, cirugía intestinal, cicatrización queloide, una enfermedad que produzca tejido fibrótico, trastornos de movimiento repetitivo de un tumor óseo.

Las respuestas proliferativas asociadas con el trasplante de órganos que pueden tratarse utilizando esta invención incluyen aquellas respuestas proliferativas que contribuyen a posibles rechazos de órganos o complicaciones asociadas. Específicamente, estas respuestas proliferativas pueden ocurrir durante el trasplante del corazón, pulmón, hígado, riñón y otros órganos u órganos del cuerpo. En el presente documento se proporciona un anticuerpo anti-LOXL2 para uso en un método para tratar una respuesta proliferativa anormal asociada con el trasplante de órganos, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficiente de un anticuerpo anti-LOXL2; y opcionalmente, un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, previniendo o reduciendo así la proliferación celular anormal debida al trasplante de órganos. El trasplante puede incluir, por ejemplo, trasplante de corazón, pulmón, hígado, riñón y otros órganos o sistemas de órganos.

La indicación de la composición de la invención también incluye fibrosis. La fibrosis se debe a la acumulación anormal de tejido fibroso que puede ocurrir como parte del proceso de curación de la herida en el tejido dañado. Dicho daño tisular puede resultar de lesiones físicas, inflamación, infección, exposición a toxinas y otras causas. Ejemplos de fibrosis incluyen fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis cardíaca y escleroderma. Los compuestos y agentes de la invención descrita también se contemplan para el tratamiento, prevención y/o mejora de afecciones fibróticas.

Los tejidos fibróticos se acumulan en el corazón y los vasos sanguíneos como resultado de la hipertensión, la enfermedad cardíaca hipertensiva, la aterosclerosis y el infarto de miocardio. La presión arterial alta, o hipertensión, puede ser causada por una variedad de factores y, a menudo, conduce al desarrollo de enfermedad cardíaca hipertensiva (HHD) con progresión a paro cardíaco e infarto de miocardio. De manera similar, la aterosclerosis y otras enfermedades cardíacas isquémicas a menudo también resultan en un paro cardíaco. Todas estas enfermedades cardiovasculares exhiben una acumulación de matriz extracelular o deposición fibrótica que da como resultado la rigidez de la vasculatura y la rigidez del propio tejido cardíaco. Esta deposición de material fibrótico es una respuesta al daño inducido por el estado hipertenso y/o esclerótico, pero los efectos de esta respuesta también dan como resultado los efectos negativos de la rigidez vascular y cardíaca, así como el agrandamiento del ventrículo. Además, se cree que el aumento de la fibrosis cardíaca que se observa en las enfermedades cardiovasculares altera o altera las señales transmitidas a los cardiomiocitos a través del andamiaje tisular del corazón, lo que conduce a una alteración de la función cardíaca eficiente y promueve el paro cardíaco y el infarto de miocardio. Dado el papel identificado del aumento de la deposición de matriz extracelular en las fibrosis cardíacas, los compuestos de la presente invención son útiles para la prevención, tratamiento y/o mejora de las fibrosis cardíacas por la inhibición de LOXL2.

La invención preventiva también proporciona composiciones, métodos, sistemas, dispositivos médicos o kits que son útiles en el tratamiento o prevención de la fibrosis cardíaca asociada con enfermedades cardiovasculares tales como enfermedad cardíaca hipertensiva (HHD), infarto de miocardio (IM), aterosclerosis, reestenosis (por ejemplo, lesiones coronarias, carotídeas y cerebrales) y enfermedades cardíacas asociadas con eventos isquémicos cardíacos.

La respuesta de curación posterior al IM puede inducir la expresión de LOXL2, pero si este proceso continúa sin controlarse, un reticulado excesivo conduce a la remodelación de la matriz extracelular o fibrosis que resulta en una disfunción cardíaca. Las enzimas que descomponen las matrices y el colágeno o elastina entrecruzados parecen funcionar más lentamente o con menos eficacia y están superadas por los eventos de entrecruzamiento. Como LOXL2 también desempeña un papel en la transición epitelial-mesenquimatosa (EMT), esto contribuye aún más a la remodelación de cardiomiocitos y la hipertrofia de cardiomiocitos, además de la remodelación de la matriz.

La fibrosis reparadora inicial inducida por el IM puede ser útil (por ejemplo, evita el aneurisma y el daño relacionado) y se puede permitir que continúe sin obstáculos. Sin embargo, aunque no deseen unirse a una teoría o mecanismo de acción particular, los inventores creen que el tratamiento anti-LOXL2 iniciado después de esta fase de fibrosis reparadora podría atenuar la fibrosis reactiva (mal adaptativa) que conduce a una disfunción cardíaca. Por ejemplo, el tratamiento anti-LOXL2 puede iniciarse 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 36 o 48 horas después de la IM, incluidos todos los números enteros intermedios. Además, el tratamiento anti-LOXL2 puede iniciarse 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días después del IM. De manera similar, el aumento de la presión arterial (hipertensión) da como resultado un aumento de la deposición de colágeno y una reducción de la degradación de proteínas en el tejido cardíaco. (Berk ET AL., J. Clin. Invest., 117(3): 568-575 (2007)). El tratamiento anti-LOXL2 iniciado después del diagnóstico y/o el establecimiento de la enfermedad cardíaca hipertensiva o la hipertensión puede prevenir, reducir o mejorar la fibrosis asociada con la hipertensión. Dicho tratamiento anti-LOXL2 se inicia 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días después del diagnóstico o la detección de aumentos en la hipertensión o la presión arterial sistémica.

Como otro ejemplo, se pueden usar biomarcadores para determinar cuándo podría estar ocurriendo un nivel inapropiado de reticulación: por ejemplo, se ha demostrado que los niveles de LOX se correlacionan con la proteína C reactiva (CRP), un biomarcador de uso común, y el tratamiento podría comenzar cuando los niveles de PCR están elevados por encima de los niveles normales apropiados. Más directamente, existen métodos y kits de prueba para medir la liberación de telopéptidos de colágeno reticulados en la orina o la sangre. Los niveles elevados de estos fragmentos de colágeno podrían indicar una transición de fibrosis reparativa a fibrosis reactiva (mal adaptativa). Además, se pueden tomar medidas de la función y el rendimiento cardíaco, incluidas las asociadas con la contracción eficiente del ventrículo.

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

Además, se prevé una duración limitada del tratamiento. El tratamiento debe mantenerse durante el tiempo suficiente para prevenir o atenuar la fibrosis reactiva para prevenir o reducir la disfunción cardíaca. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos FAB de corta vida se usan cuando se desean duraciones más cortas del tratamiento. Alternativamente, se pueden usar anticuerpos de longitud completa que tienen una vida media más larga en el suero, con dosis limitadas durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 semanas, inclusive de todos los días en el interin. Las pruebas estándar de la función cardíaca se pueden usar para monitorizar el progreso y ajustar la dosificación según sea necesario, junto con la evaluación de biomarcadores relevantes discutidos anteriormente. La duración limitada del tratamiento se suma a la seguridad de este enfoque.

La fibrosis del hígado está implicada en la patología de numerosas enfermedades hepáticas. Como se señaló anteriormente, la fibrosis se presenta como una complicación de la hemocromatosis, la enfermedad de Wilson, el alcoholismo, la esquistosomiasis, la hepatitis viral, la obstrucción del conducto biliar, la exposición a toxinas y los trastornos metabólicos. Si no se controla, la fibrosis hepática progresa a cirrosis (definida por la presencia de nódulos encapsulados), insuficiencia hepática y muerte. Los ataques crónicos al hígado provenientes de fuentes como parásitos e infecciones virales (por ejemplo, VHB, VHC, VIH, esquistosomiasis) o el estrés a largo plazo del consumo de alcohol inevitablemente provocan la remodelación del hígado, probablemente para encapsular el área dañada y proteger el tejido hepático restante contra el daño. (Li and Friedman, Gastroenterol. Hepatol. 14: 618-633, 1999). La fibrosis hepática produce cambios en la matriz extracelular, que incluyen un aumento de 3 a 10 veces en el contenido total de colágeno y el reemplazo de la membrana basal de baja densidad por una matriz de alta densidad, que altera la función metabólica y de síntesis de los hepatocitos, las células hepáticas estrelladas y las células endoteliales. (Girogescu, M., Non-invasive Biochemical Markers of Liver Fibrosis, J. Gastrointest. Liver Dis., 15(2): 149-159 (2006)). Los compuestos de la presente invención son, por lo tanto, útiles para la prevención, tratamiento y/o mejora de enfermedades hepáticas fibróticas, y tal uso se contempla en este documento por inhibición de LOXL2.

Al igual que la fibrosis hepática, la fibrosis renal puede ser el resultado de diversas enfermedades y lesiones en los riñones. Ejemplos de tales enfermedades e insultos incluyen la enfermedad renal crónica, el síndrome metabólico, la diabetes y la nefritis glomerular resultante. Se ha reconocido que el síndrome metabólico es un conjunto de anomalías que incluyen signos diabéticos como la resistencia a la insulina, así como la obesidad e hipertensión central o visceral. En casi todos los casos, la desregulación de la glucosa da como resultado la estimulación de la liberación de citoquinas y la regulación al alza de la deposición de matriz extracelular. Los factores adicionales que contribuyen a la enfermedad renal crónica, diabetes, síndrome metabólico y nefritis glomerular incluyen hiperlipidemia, hipertensión y proteinuria,

lo que provoca un daño adicional a los riñones y estimula aún más el depósito de matriz extracelular. Por lo tanto, independientemente de la causa primaria, las lesiones en los riñones producen fibrosis renal y la pérdida concomitante de la función renal. (Schena, F. and Gesualdo, L., Pathogenic Mechanisms of Diabetic Nephropathy, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16: S30-33 (2005); Whaley-Connell, A., and Sower, J.R., Chronic Kidney Disease and the Cardiometabolic Syndrome, *J. Clin. Hypert.*, 8 (8): 546-48 (2006)). Los compuestos de la presente invención son, por lo tanto, útiles para la prevención, tratamiento y/o mejora de las enfermedades renales fibróticas (enfermedad renal crónica, nefropatía diabética, nefritis glomerular, síndrome metabólico), y tal uso se contempla en el presente documento.

La fibrosis pulmonar incluye muchos síndromes y enfermedades. Enfermedades de ejemplo incluyen fibrosis pulmonar idiopática (FPI), neumonía intersticial idiopática y síndrome de distensión respiratoria aguda (SDRA). La patogenia de la mayoría de las fibrosis pulmonares, incluidas las enfermedades mencionadas anteriormente, no se conoce bien, sin embargo, todas se caracterizan por una afluencia de células inflamatorias y un aumento posterior en la síntesis y deposición de matriz extracelular rica en colágeno. (Chua et al., *Am J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 33: 9-13 (2005); Tzortzaki et al., *J. Histochem. & Cytochem.*, 54(6): 693-700 (2006); Armstrong et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 160: 1910-1915 (1999)). Dado el papel identificado del aumento de colágeno y la deposición de matriz extracelular en las fibrosis pulmonares, los compuestos de la presente invención son útiles para la prevención, tratamiento y/o mejora de las fibrosis pulmonares por la inhibición de LOXL2.

La esclerodermia es un trastorno autoinmune, en donde hay una sobreproducción de colágeno anormal. Este exceso de colágeno se acumula en todo el cuerpo, causando endurecimiento (esclerosis), cicatrización (fibrosis) y otros daños. El daño puede afectar la apariencia de la piel o puede afectar solo a los órganos internos. Los síntomas y la gravedad de la esclerodermia varían de persona a persona. Dado el papel identificado del aumento de colágeno en la esclerodermia, los compuestos de la presente invención son útiles para la prevención, tratamiento y/o mejora de la esclerodermia por la inhibición de LOXL2.

La angiogénesis anormal que puede tratarse o prevenirse mediante el uso de esta invención incluye la angiogénesis anormal que acompaña a la artritis reumatoide, el edema y la lesión cerebral relacionados con la reperfusión isquémica, la isquemia cortical, la hiperplasia ovárica y la hipervascularidad (síndrome de ovario poliquístico), endometriosis, psoriasis, retinopatía diabética y otras enfermedades angiogénicas oculares, como retinopatía del prematuro (fibroplástico retrolental), degeneración muscular, rechazo del injerto de córnea, glaucoma neuroscular y síndrome de Oster Webber.

Las enfermedades asociadas con la angiogénesis anormal requieren o inducen el crecimiento vascular. Por ejemplo, la angiogénesis de córnea involucra tres fases: un período latente prevascular, una neovascularización activa y una maduración y regresión vascular. La identidad y el mecanismo de varios factores angiogénicos, incluidos elementos de la respuesta inflamatoria, como leucocitos, plaquetas, citoquinas y eicosanoides, o componentes plasmáticos no identificados, aún no se han revelado.

Los anticuerpos anti-LOXL2 descritos en el presente documento pueden usarse para tratar enfermedades asociadas con angiogénesis no deseada o anormal. El método comprende administrar a un paciente que sufre de angiogénesis no deseada o anormal, un inhibidor de LOXL2 en combinación con un agente antineoplásico o un agente antiangiogénico que no es dicho inhibidor de LOXL2. La dosis particular de estos agentes requerida para inhibir (parcial o completamente) la angiogénesis y/o las enfermedades angiogénicas puede depender de la gravedad de la afección, la vía de administración y los factores relacionados que pueda decidir el médico responsable. En general, las dosis diarias aceptadas y efectivas son la cantidad suficiente para inhibir eficazmente la angiogénesis y/o las enfermedades angiogénicas.

De acuerdo con esta realización, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar para tratar una variedad de enfermedades asociadas con angiogénesis no deseables tales como neovascularización retiniana/coroidea y neovascularización de córnea. Ejemplos de neovascularización retiniana/coroidea incluyen, entre otros, enfermedades de Best, miopía, fosas ópticas, enfermedades de Stargart, enfermedad de Paget, oclusión de venas, oclusión de las arterias, anemia de células falciformes, sarcoide, sífilis, enfermedades de pseudoxantoma elástico carotídeo obstructivo, uveítis crónica/vitritis, infecciones por micobacterias, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, retinopatía del prematuro, enfermedad de Eale, retinopatía diabética, degeneración macular, enfermedades de Bechets, infecciones que causan una retinitis o croiditis, presunta histoplasmosis ocular, pars planitis, desprendimiento de retina crónico, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, traumatismo y complicaciones postláser, enfermedades asociadas con la rubesis (neovascularización del ángulo) y enfermedades causadas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso, incluidas todas las formas de vitreoretinopatía proliferativa. Entre los ejemplos de neovascularización de la córnea se incluyen, pero no se limitan a, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de vitamina A, sobreuso de lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, queratitis pterígea, queratitis sicca, Sjögren, acné rosácea, filectenulosis, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, rechazo del injerto de córnea, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratolisis marginal, poliarteritis, sarcoidosis de Wegener, escleritis, queratotomía radial perifigoidea, glaucoma neovascular y fibroplasia retrolental, sífilis, infecciones por micobacterias, degeneración lipídica, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por herpes simple, infecciones por herpes zoster, infecciones por protozoos y sarcoma de Kaposi.

En otra realización más, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse para tratar enfermedades inflamatorias crónicas asociadas con angiogénesis anormal. El método comprende administrar a un paciente que padece una enfermedad inflamatoria crónica asociada con angiogénesis anormal, un inhibidor de LOXL2 en combinación con un agente antineoplásico o un agente antiangiogénico que no es dicho inhibidor de LOXL2. La inflamación crónica depende de la formación continua de brotes capilares para mantener una afluencia de células inflamatorias. El influjo y la presencia de las células inflamatorias producen granulomas y, por lo tanto, mantienen el estado inflamatorio crónico. La inhibición de la angiogénesis utilizando los compuestos descritos en el presente documento puede prevenir la formación de los granulomas, aliviando así la enfermedad. Ejemplos de enfermedades inflamatorias crónicas incluyen, entre otras, enfermedades inflamatorias del intestino, como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, la psoriasis, la sarcoidosis y la artritis reumatoide.

Las enfermedades inflamatorias del intestino tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa se caracterizan por una inflamación crónica y angiogénesis en varios sitios en el tracto gastrointestinal. Por ejemplo, la enfermedad de Crohn se presenta como una enfermedad inflamatoria transmural crónica que afecta más comúnmente al íleon distal y al colon, pero también puede ocurrir en cualquier parte del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el ano y el área perianal. Los pacientes con enfermedad de Crohn generalmente tienen diarrea crónica asociada con dolor abdominal, fiebre, anorexia, pérdida de peso e hinchazón abdominal. La colitis ulcerativa es también una enfermedad crónica, inespecífica, inflamatoria y ulcerativa que surge en la mucosa colónica y se caracteriza por la presencia de diarrea sanguinolenta. Estas enfermedades inflamatorias del intestino generalmente son causadas por una inflamación granulomatosa crónica en todo el tracto gastrointestinal, que involucra nuevos brotes capilares rodeados por un cilindro de células inflamatorias. La inhibición de la angiogénesis por las formulaciones farmacéuticas de la presente invención debería inhibir la formación de brotes y prevenir la formación de granulomas. Las enfermedades inflamatorias del intestino también exhiben manifestaciones intestinales adicionales, como lesiones en la piel. Dichas lesiones se caracterizan por inflamación y angiogénesis y pueden ocurrir en muchos sitios distintos del tracto gastrointestinal. La inhibición de la angiogénesis por las formulaciones farmacéuticas de la presente invención debería reducir la afluencia de células inflamatorias y prevenir la formación de lesiones. Por lo tanto, aquí se proporciona un anticuerpo anti-LOXL2 para uso en un método para tratar una enfermedad inflamatoria intestinal, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficiente de un anticuerpo anti-LOXL2; y opcionalmente, un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La sarcoidosis, otra enfermedad inflamatoria crónica, se caracteriza como un trastorno granulomatoso multisistémico. Los granulomas de esta enfermedad pueden formarse en cualquier parte del cuerpo y, por lo tanto, los síntomas dependen del sitio de los granulomas y de si la enfermedad está activa. Los granulomas son creados por los brotes capilares angiogénicos que proporcionan un suministro constante de células inflamatorias. Usando las formulaciones farmacéuticas de la presente invención para inhibir la angiogénesis, tales formaciones de granulomas pueden inhibirse. La psoriasis, también una enfermedad inflamatoria crónica y recurrente, se caracteriza por pápulas y placas de varios tamaños. El tratamiento con las formulaciones farmacéuticas de la presente invención debe prevenir la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para mantener las lesiones características y proporcionar al paciente alivio de los síntomas. Por lo tanto, aquí se proporciona un anticuerpo anti-LOXL2 para usar en un método para prevenir la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para mantener las lesiones características y proporcionar al paciente alivio de los síntomas, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-LOXL2; y opcionalmente, un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La artritis reumatoide (AR) también es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por una inflamación no específica de las articulaciones periféricas. Se cree que los vasos sanguíneos en el revestimiento sinovial de las articulaciones sufren angiogénesis. Además de formar nuevas redes vasculares, las células endoteliales liberan factores y especies reactivas de oxígeno que conducen al crecimiento del pannus y la destrucción del cartílago. Los factores involucrados en la angiogénesis pueden contribuir activamente y ayudar a mantener el estado de inflamación crónica de la artritis reumatoide. El tratamiento con las formulaciones farmacéuticas de la presente invención solo o en combinación con otros agentes anti-R puede prevenir la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para mantener la inflamación crónica y proporcionar al paciente alivio de AR de los síntomas. Otros agentes anti-AR son convencionales y conocidos en la técnica. Por lo tanto, aquí se proporciona un anticuerpo anti-LOXL2 para usar en un método para prevenir o tratar la AR, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficiente de un anticuerpo anti-LOXL2; y opcionalmente, uno o más agentes anti-AR.

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

En este documento se proporciona un anticuerpo anti-LOXL2 para uso en un método para tratar cualquiera de las indicaciones descritas anteriormente mediante la administración de un anticuerpo anti-LOXL2.

En un aspecto, esta invención presenta un uso de anticuerpo anti-LOXL2 en métodos para inhibir la invasividad y la metástasis de células tumorales, poniendo en contacto las células con al menos un agente citotóxico y al menos un anticuerpo anti-LOXL2. En general, el método incluye una etapa de poner en contacto células tumorales metastásicas con una cantidad de al menos un agente citotóxico y al menos un anticuerpo anti-LOXL2, que, en combinación, es eficaz para reducir o inhibir la capacidad invasiva o el potencial metastático de la célula. Alternativamente, de acuerdo

con la presente invención, un anticuerpo anti-LOXL2 puede combinarse con un agente quimioterapéutico para sensibilizar las células tumorales (por ejemplo, la transición del estado EMT al estado MET) para matarlas por el agente quimioterapéutico, por lo tanto, no solo previene o inhibe la invasión tumoral y metástasis, sino que también inhibe el crecimiento del tumor primario.

5 También se puede emplear cualquier agente anticancerígeno adecuado en los métodos.

Como se usa en el presente documento, el término "agente quimioterapéutico" o "quimioterapéutico" (o "quimioterapia", en el caso de tratamiento con un agente quimioterapéutico) pretende abarcar cualquier compuesto químico no proteico (es decir, no peptídico) útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilaminasas que incluyen altretamina, trietilenemelamina, trietilenfosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacin y bullatacinona); una camptotecina (incluido el topotecán análogo sintético); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (criptoficina articular 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobin; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas nitrogenadas como clorambucil, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustine, clorozotocina, foremustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos como los antibióticos enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma1I y caliqueamicina phil1, véase, por ejemplo, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994); dinemicina, incluida la dinamina A; bifosfonatos tales como clodronato, esperamicina, cromóforos de neocarzinostatina y cromomóforos relacionados con el cromoproteína enediina); aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina doxorubicina (Adramycin™) (que incluye morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y deoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicina tal como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como demopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; rellenos de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina demecolcina diaziquna; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; phenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbazona; PSK™; razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquna; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiopeta taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL™, Bristol Meyers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (TAXOTERE™, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucil; gemcitabina (Gemzar™); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vancristina; vinorelbina (Navelbine™); novantrona; tenipósido; edatraxato; daunomicina; aminopterina; xeoloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluye en la definición de "agente quimioterapéutico" los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de la hormona en tumores como los antiestrógenos y los moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM), incluido, por ejemplo, el tamoxifeno (incluido Nolvadex™), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston™); inhibidores de la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (Megace™), exemestano, formestano, fadrozol, vorozol (Rivisor™), letrozol (Femara™) y anastrozol (Arimidex™); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

55 En un ejemplo no limitativo, esta invención incluye un anticuerpo anti-LOXL2 para uso en métodos para inhibir sinérgicamente la invasividad y metástasis de células tumorales, al poner en contacto las células con al menos cisplatino y al menos un anticuerpo anti-LOXL2 (véase Figura 18).

En una realización, el agente antineoplásico en combinación con el modulador LOXL2 es un inhibidor de tirosina quinasa. Por ejemplo, ZD1839 (Iressa™ de AstraZeneca K.K.) muestra un efecto competitivo para el ATP en el sitio de unión a ATP de la tirosina quinasa EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), e inhibe la actividad de la tirosina quinasa al inhibir la autofosforilación de la tirosina quinasa. Como resultado, el efecto anticancerígeno se expresa mediante el bloqueo de una transducción de señales equipada con EGFR (ligandos como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) se unen al dominio extracelular de EGFR, seguido de la activación de la tirosina quinasa

EGFR en el dominio intracelular, lo que no solo autofosforilación de EGFR pero también fosforilación de varias proteínas diana intracelulares, luego transduciendo una señal de proliferación de la superficie celular al núcleo, luego transduciendo las señales de proliferación de la superficie de la célula cancerosa al núcleo, y resultando en proliferación, infiltración, metástasis, angiogénesis de células cancerosas) en asociación con proliferación, infiltración, diferenciación y metástasis. IMC-C225 o cetuximab (Erbix™, que es un anticuerpo monoclonal dirigido al EGFR) reconoce la parte del receptor de EGFR en la superficie de la membrana celular e inhibe la autofosforilación del EGFR, inhibiendo así la actividad de la tirosina quinasa. Herceptin es un anticuerpo monoclonal contra Her2/Neu que es homólogo a EGFR, y el mesilato de imatinib (GLEEVEC™, anteriormente STI-571) puede inhibir ambas actividades de tirosina quinasa de BCR-Abl y c-kit (documento no de patente No. 2). Sorafenib (Nexavar™) es un inhibidor molecular pequeño de la Raf quinasa, PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), receptor de VEGF 2 y 3 quinasa y c-Kit.

Como se usa en este documento, los anticuerpos monoclonales contra antígenos tumorales son anticuerpos provocados contra antígenos expresados por tumores y células leucémicas, preferiblemente antígenos específicos de tumores. El anticuerpo monoclonal también incluye anticuerpos completamente humanos y humanizados.

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

En otra realización, el agente antiangiogénico se combina con un inhibidor de LOXL2 para tratar el cáncer y otras enfermedades asociadas con la angiogénesis anormal o indeseable. Ejemplos de agentes antiangiogénicos incluyen, pero no se limitan a, ácido retinoide y sus derivados, 2-metoxiestradiol, ANGIOSTATIN™, ENDOSTATIN™, suramina, escualamina, inhibidor tisular de la metaloproteínasa 1, inhibidor tisular de metaloproteínasa 2, activador del plasminógeno inhibidor-1, activador del plasminógeno inhibidor-2, inhibidor derivado del cartílago, paclitaxel, factor plaquetario 4, sulfato de protamina (clupeína), derivados de quitina sulfatada (preparados a partir de cáscaras de cangrejo), complejo de polisacárido sulfatado peptidoglicano (sp-pg), estaunsporina, moduladores del metabolismo de la matriz, incluidos, por ejemplo, análogos de prolina ((ácido l-azetidina-2-carboxílico (LACA), cishidroxirolina, d, l-3,4-deshidroprolina, tiaprolina, α-dipiridilo, β-aminopropionitrilo fumarato, 4-propil-5-(4-piridinil)-2(3h)-oxazolona; metotrexato, mitoxantrona, heparina, interferones, 2 macroglobulina-suero, chimp-3, quimostatina, tetradecasulfato de β-ciclodextrina, eponemicina; fumagilina, tiomalato sódico de oro, d-penicilamina (CDPT), beta-1-anticolágenasa sérica, alfa-2-antiplasmina, bisantreno, lobenzarit disódico, ácido n-2-carboxifenil-4-cloroantronílico disódico o "CCA", talidomida; esteroide angiostático, carboxinaminolmidazol; inhibidores de la metaloproteínasa tales como BB94. Otros agentes antiangiogénicos incluyen anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales contra estos factores de crecimiento angiogénicos: bFGF, aFGF, FGF-5, isoformas de VEGF, VEGF-C, HGF/SF y Ang-1/Ang-2. Ferrara N. and Alitalo, K. " Clinical application of angiogenic growth factors and their inhibitors " (1999) Nature Medicine 5: 1359-1364.

Agentes antifibróticos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a compuestos tales como β-aminopropionitrilo (BAPN), así como a los compuestos descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 4,965,288 de Palfreyman, et al., concedida el 23 de octubre de 1990, titulada " Inhibitors of lysyl oxidase, relating to inhibitors of lysyl oxidase and their use in the treatment of diseases and conditions associated with the abnormal deposition of collagen; el documento US 4,997,854 de Kagan, et al., publicado el 5 de marzo de 1991, titulado "Anti-fibrotic agents and methods for inhibiting the activity of lysyl oxidase in situ using adjacently positioned diamine analogue substrate", relacionado con compuestos que inhiben LOX para el tratamiento de diversos estados fibróticos patológicos. Otros inhibidores de ejemplo se describen en el documento US 4,943,593 de Palfreyman, et al., publicado 24 de julio de 1990, titulado "Inhibitors of lysyl oxidase", relacionados con compuestos tales como 2-isobutil-3-fluoro-, cloro o bromo-alilamina, así como, por ejemplo, los documentos US 5,021,456 y US 5,505,714; US 5,120,764; U.S. 5.182.297; 5.252.608 de Estados Unidos (en relación con 2-(1-naftiloximetil)-3-fluoroalilamina); y Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2004/0248871. Los agentes antifibróticos de ejemplo también incluyen las aminas primarias que reaccionan con el grupo carbonilo del sitio activo de las lisil oxidasas, y más particularmente aquellas que producen, después de unirse con el carbonilo, un producto estabilizado por resonancia, como las siguientes aminas primarias: etilendiamina, hidrazina, fenilhidrazina y sus derivados, semicarbazida y derivados de urea, aminonitrilos, como beta-aminopropionitrilo (BAPN), o 2-nitroetilamina, haloaminas saturadas o insaturadas, tales como 2-bromoetilamina, 2-cloroetilamina, 2-trifluoroetilamina, 3-bromopropilamina, p-halobencilaminas, selenohomocistina lactona. En otra realización, los agentes antifibróticos son agentes quelantes de cobre, que penetran o no penetran en las células. Compuestos de ejemplo adicionales incluyen inhibidores indirectos, tales compuestos que bloquean los derivados de aldehído que se originan de la desaminación oxidativa de los residuos lisilo e hidroxilisilo por las lisil oxidasas, tales como las tiolaminas, en particular D-penicilamina, o sus análogos tales como ácido 2-amino-5-mercapto-5-metilhexanoico, ácido D-2-amino-3-metil-3-((2-acetamidoetil)ditio)butanoico, ácido p-2-amino-3-metil-3-((2-aminoetil)ditio)butanoico, sodio-4-((p-1-dimetil-2-amino-2-carboxietil)ditio)butanosulfinato, 2-acetamidoetil-2-acetamidoetanotiol sulfanato, sodio-4-mercaptobutanotiol sulfanato trihidrato.

Los presentes métodos pueden realizarse en células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*, o pueden realizarse en células presentes en un sujeto, por ejemplo, como parte de un protocolo terapéutico *in vivo*. El régimen terapéutico se puede llevar a cabo en seres humanos o en otros animales. El anticuerpo anti-LOXL2 proporcionado en el presente documento se puede administrar en cualquier orden en relación con el agente quimioterapéutico. A veces, el anticuerpo anti-LOXL2 y el agente se administran de forma simultánea o secuencial. Se pueden administrar en diferentes sitios y en diferentes regímenes de dosificación. La eficacia terapéutica mejorada de la terapia de combinación de la presente invención representa una alternativa prometedora a los regímenes convencionales altamente tóxicos de agentes anticancerosos. Los agentes quimioterapéuticos para emplear en tales métodos se han descrito con más detalle anteriormente.

## 10 Ejemplos

La solicitud puede entenderse mejor por referencia a los siguientes ejemplos no limitativos, que se proporcionan como realizaciones de ejemplo de la aplicación.

### Ejemplo 1

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

15 Se inyectaron ratones (BALB/c (00467)) por vía subcutánea (s.c.), 5 veces a intervalos de 2-3 semanas con 0.05 mg de antígeno (Ag) en una formulación adyuvante. Para los péptidos Ags, los péptidos se conjugaron con albúmina de suero bovino y se formularon en adyuvante de Freund (FA) antes de la inmunización. Para la proteína Ags, la proteína se formuló en adyuvante Alhidrogel-Muramil Dipéptido (ALD/MDP).

20 Los ratones fueron inyectados con Ag formulada en PBS, cada día durante 3 días mediante una combinación de s.c., vía intraperitoneal (i.p.) e intravenosa (i.v.), de 0.05 a 0.1 mg/ruta.

Se aislaron células del bazo y ganglios linfáticos de los ratones y se fusionaron con células de mieloma P3X63-Ag8.653 utilizando polietilenglicol al 50%.

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

La biblioteca de hibridomas se clonó utilizando un clasificador de células activadas por fluorescencia con una unidad de deposición celular automática.

Las células viables individuales se clasificaron en placas de 96 pozos con base en los criterios de análisis de fluorescencia de dispersión hacia adelante, dispersión lateral y yoduro de propidio como se describe por Kenney et al.

30 Los sueros y los sobrenadantes se seleccionaron mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando pozos de placa de microtitulación recubiertos con Ag, que luego se incubaron con plasma de ratón o sobrenadante de hibridoma, seguido de conjugado de anticuerpo IgG de ratón de cabra (específico de Fc), conjugado de HRP, seguido de solución de sustrato TMB y reactivo de detención.

35 Los pozos de la placa se lavaron para eliminar el anticuerpo o antígeno no unido entre todas las incubaciones y se determinaron los resultados.

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

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

### Ejemplo 2

45 Los anticuerpos anti-LOXL2 se seleccionaron utilizando una actualización de la criba B de proteínas para evaluar la actividad enzimática de LOXL2.

50 Los candidatos a anticuerpos se seleccionaron inicialmente con base en las pruebas de puntos ELISA. El ELISA en antígenos múltiples se realizó con Soluciones de Anticuerpos y se seleccionaron anticuerpos que mostraban una señal fuerte de ELISA en el antígeno de interés para una caracterización adicional en ensayos enzimáticos. La LOXL2 produce peróxido de hidrógeno cuando el sustrato 1,5-diaminopentano se desamina y la enzima se regenera.

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos para inhibir la actividad enzimática utilizando un ensayo bioquímico que acopla la producción de peróxido (liberado por LOXL2) a HRP y mide la conversión de rojo Amplex en un producto fluorescente. El sobrenadante de hibridoma de anticuerpo (10  $\mu$ L) se añadió a 40  $\mu$ L de mezcla de enzimas (borato de sodio 62.5 mM, pH 8.0, 5 unidades/mL de HRP, LOXL2 125 nM, 10 ppm de antiespumante) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en una placa negra de 96 pozos de área completa. La reacción enzimática se inició con la adición de 50  $\mu$ L de solución de sustrato (borato de sodio 50 mM, reactivo rojo Amplex 100  $\mu$ M, 1,5-diaminopentano 20 mM (DAP), 10 ppm de antiespumante) y se leyó en un lector de placa Molecular Devices M5 en 37°C. El lector de placas se configuró para leer la fluorescencia (ex=544 nm, em=590 nm) en modo cinético durante 1 hora. Los datos se registraron como la pendiente de la respuesta de fluorescencia al tiempo. Estas pendientes se compararon con un control en donde se añadieron medios de hibridoma a la mezcla de enzimas. Las pendientes menores que la del control se consideraron inhibidores.

Los anticuerpos de prueba M1 (asc), M4, M11, M1, M13, M22, M16, M19, M20, M20 (asc) y M25 se probaron contra BAPN (un inhibidor competitivo de LOXL2) como control positivo y LOXL2 como control negativo (véase figura 8).

Un anticuerpo anti-LOXL2 fue designado AB0023. Los anticuerpos anti-LOXL2 repitieron la actividad inhibitoria observada en 10 ml de materiales de preparación en el ensayo enzimático. La inhibición también se repitió en ensayos basados en células (véase más abajo). El análisis de secuencia confirmó que las secuencias de aminoácidos de M01, M16, M19 y M20 son idénticas.

### Ejemplo 3

#### Anticuerpo AB0023 anti-LOXL2 y actividad enzimática

La actividad enzimática de los anticuerpos anti-LOXL2 se puede evaluar y determinarse las IC50.

Se evaluaron M1, M1 (asc), M20 y M20 (asc) en presencia de LOXL2 25 nM y 1.5 DAP 15 mM sobre concentraciones crecientes de anticuerpo.

#### Determinaciones de IC50

Las respuestas a dosis en anticuerpos seleccionados se llevaron a cabo contra LOXL2 usando el ensayo enzimático acoplado descrito anteriormente. Se creó una serie de dilución de anticuerpo en PBST (0.01% Tween-20) y se agregaron 10  $\mu$ L de este a 40  $\mu$ L de mezcla de enzimas (borato de sodio 62.5 mM, pH 8.0, 5 unidades/mL de HRP, LOXL2 125 nM, 10 ppm de antiespumante) e incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en una placa negra de 96 pozos de área completa. La reacción enzimática se inició con la adición de 50  $\mu$ L de solución de sustrato (borato de sodio 50 mM, reactivo rojo Amplex 100  $\mu$ M, 1,5-diaminopentano 20 mM, 10 ppm de antiespumante) y se leyó en un lector de placas M5 usando las condiciones descritas anteriormente. Las pendientes de la respuesta de fluorescencia en función del tiempo se representaron en función de la concentración de anticuerpos y los datos se ajustaron a un ajuste de cuatro parámetros utilizando GraFit. El punto medio de esta gráfica es la IC50 aparente y es la concentración a la que se inhibe el cincuenta por ciento de la respuesta total.

Se encontró que Ab0023 es un inhibidor parcial de la actividad enzimática LOXL2 con una IC50 aparente de aproximadamente 30 nM (véase Figura 9).

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

### Ejemplo 4

El anticuerpo AB0023 anti-LOXL2 es un inhibidor no competitivo

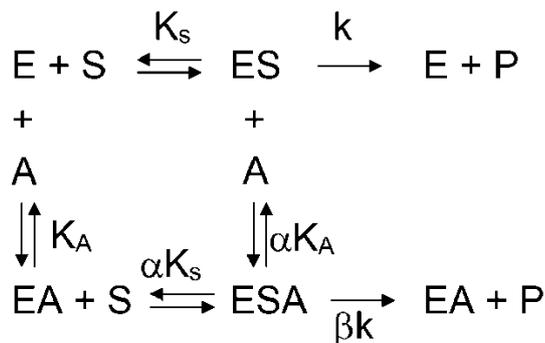
La actividad del Anticuerpo AB0023 anti-LOXL2 se evaluó sobre concentraciones crecientes de 1.5 DAP y sobre concentraciones crecientes de anticuerpo (1  $\mu$ M, 0.005  $\mu$ M, 0.050  $\mu$ M y 0.300  $\mu$ M).

#### Modo de inhibición

El modo de inhibición de anticuerpos contra LOXL2 se llevó a cabo usando el modelo descrito a continuación. En estos experimentos, la dependencia de la tasa de estado estable en la concentración de 1,5-diaminopentano se monitorizó bajo concentraciones crecientes de anticuerpo. El propósito fue evaluar si la  $K_m$  para el sustrato,  $k_{cat}$  o ambos cambian en presencia de anticuerpo. Los datos recopilados se analizaron globalmente con Grafit utilizando el modelo que se muestra en la siguiente figura. E representa la enzima, S representa el sustrato, A representa el anticuerpo y P representa el producto. El parámetro  $\alpha$  describe el efecto del compuesto sobre la afinidad del sustrato. Un valor  $\alpha$  igual a uno describe una situación en la que el compuesto se une igualmente bien a la enzima libre y al complejo enzima-sustrato (como la inhibición no competitiva). Los valores inferiores a uno describen una interacción en la que el compuesto se une al complejo enzima-sustrato (como inhibición no competitiva). Los valores superiores a uno corresponden al compuesto que se une a la enzima libre mejor que al complejo enzima-sustrato (inhibición competitiva como). El valor  $\beta$  describe el efecto del modulador sobre la tasa de la enzima. Los inhibidores tienen valores menores

que uno (para un inhibidor completo  $\beta=0$ ) y los activadores tienen valores mayores que uno.  $K_A$  es la constante de disociación del compuesto,  $K_S$  es la constante de Michaelis para el sustrato y  $k$  es la velocidad catalítica de la enzima. Las tasas de estado estacionario se determinaron a partir de la pendiente de la respuesta de fluorescencia en función del tiempo como se describió anteriormente (determinación de IC50). Los datos se representaron como la dependencia de la tasa de estado estacionario de la concentración de sustrato (1,5-diaminopentano) en varias concentraciones fijas de anticuerpo y se analizaron con GraFit

5



Se determinó que el anticuerpo AB0023 anti-LOXL2 es un inhibidor no competitivo con base en los siguientes resultados:  $\alpha = 1$ ,  $K_i = 0.067$  y  $\beta = 0.5$  (véase Figura 10).

10 Ejemplo 5

Medición cinética de la unión del anticuerpo AB0023 a LOXL2 por resonancia de Plasmón en Superficie

La afinidad de unión y la tasa de desconexión de AB0023 se evaluaron mediante la Resonancia de Plasmón en Superficie (SPR).

15

Las afinidades de unión se midieron usando un instrumento Bio-Rad ProteOn termostatzado a 25°C. Las afinidades de unión se determinaron usando dos métodos, usando acoplamiento de amina; uno en donde se inmovilizó el anticuerpo y se añadió el antígeno (LOXL2), y otro en donde se inmovilizó el antígeno (LOXL2) y se añadió el anticuerpo. El anticuerpo o antígeno se inmovilizó en un chip GLC utilizando una relación 1:1 de NHS a EDC provisto con el kit de inmovilización ProteOn. El chip se activó primero con una mezcla de NHS/EDC y luego el antígeno o el anticuerpo a 1 µg/mL en regulador de acetato, pH 4.5, se hizo fluir sobre la superficie activada para emparejarse. Esto produjo típicamente un acoplamiento de aproximadamente 500 RU. La superficie del chip activado se tapó luego con la adición de etanolamina 1M. Los chips acoplados se almacenaron a 4°C y se regeneraron con hidróxido de sodio 50 mM.

20

Se determinaron las constantes de disociación probando el chip acoplado con una serie de dilución de anticuerpo o antígeno en PBST (0.05% de Tween-20). Los datos se adquirieron en los seis canales disponibles en el ProteOn utilizando un canal no acoplado como referencia. Los datos recopilados se analizaron utilizando el software de gestión ProteOn de Bio-Rad.

25

Se encontró que AB0023 se unía fuertemente a LOXL2 y se liberaba lentamente.  $K_d$  se estimó en 0.1 - 1.0 nM. Además, se encontró que AB0023 tiene las siguientes características:  $k_{on} = 1.68 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{off} = 1.17 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ ,  $K_D = 0.69 \text{ nM}$  y  $t_{1/2} = 98.7$  minutos. véase la figura 11.

30 Ejemplo 6

Se realizó un mapeo de dominios y se encontró que AB0023 se unía al dominio SRCR3-4.

Materiales y métodos

35

Todas las placas se obtuvieron de Corning. El anticuerpo secundario y el sustrato Pico se obtuvieron de Pierce. La peroxidasa de rábano picante (HRP) se obtuvo de Sigma. Todos los reactivos de ProteOn se obtuvieron de Bio-Rad. La LOXL2 se obtuvo de los sistemas de I+D. Los anticuerpos utilizados en este estudio se produjeron en Antibody Solution o mediante ascitos de Aragen Biosciences. Todos los demás reactivos fueron de la más alta calidad posible.

Unión mediante ELISA

40

La unión del anticuerpo a LOXL2 se determinó utilizando un ELISA basado en luminiscencia. Las placas de White Corning se recubrieron con 0.1 µg/mL de LOXL2 o antígeno de interés en regulador borato 50 mM (pH 8.0) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron con un lavador de placas BioTek y se bloquearon con leche desnatada al 5% en PBST (Tween-20 al 0.05%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBST (Tween-20 al 0.05%) y luego se usaron inmediatamente o se almacenaron a 4°C en un desecador para uso futuro. El cuerpo del anticuerpo por analizar se diluyó en serie en PBST (0.01% de Tween-20) y se agregaron 100 µL de cada dilución por

5 pozo. Las placas se incubaron con el artículo de prueba durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se lavaron con PBST (Tween-20 al 0.05%). El anticuerpo de detección (conjugado anti-HRP de ratón) se diluyó 16.000 veces en leche desnatada al 5% en PBST (Tween-20 al 0.05%) y se aplicaron 100 µl por pozo. Las placas se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo de detección y luego se lavaron con PBST (0.05% de PBST). La señal se detectó utilizando el pico del sustrato quimioluminiscente SuperSignal ELISA de Pierce siguiendo las instrucciones del fabricante. La luminiscencia se midió utilizando un lector de placas Molecular Devices M5 con un tiempo de integración de 500 ms que captura todas las longitudes de onda. Los datos se corrigieron contra la señal de fondo y la dependencia de la señal de luminiscencia a la concentración de anticuerpos se ajustó utilizando la ecuación de isoterma de Langmuir utilizando el programa GraFit. En los casos en que la concentración de antígeno fue similar a la constante de disociación, se usó la ecuación cuadrática de unión estrecha. Los valores de disociación informados se obtuvieron de los ajustes a estas ecuaciones; donde PL representa la señal del complejo unido,  $B_{max}$  es la unión máxima,  $K_D$  es la constante de disociación y L es la concentración del ligando.

Ecuación de la isoterma de Langmuir:

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

15 Ecuación de unión ajustada:

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

AB0023 se probó contra MCD-LOXL2, LOXL2 (R&D), SRCR1-2 y SRCR 1-4. Se encontró que AB0023 se une al dominio SRCR3-4 (véase Figura 12).

Ejemplo 7

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

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

Brevemente, AB0023 se amplió a partir de diversas muestras antes de la prueba.

25 Se utilizaron kits de invasión de células de colágeno I y colágeno IV de 96 pozos de Cultrex (Trevigen, Gaithersburg, MD) para los exámenes de detección de sobrenadantes de anticuerpos contra sueros/anticuerpos. Las células MDA MB 231 carecían de suero 24 horas antes de la configuración del ensayo. El día de la preparación, las placas recubiertas con colágeno I y colágeno IV se prepararon al menos 4 horas antes de la configuración del ensayo de invasión (no más de 8 horas antes). Las placas de colágeno I y colágeno IV se recubrieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se colocaron en placas a 20.000 células por pozo en 95 µl de medio libre de suero en la cámara superior de la placa. Ciento cincuenta (150) µl de medio que contenía FBS al 10% y 1x L-glutamina se dividieron en partes alícuotas en las cámaras inferiores de la placa. Usando una pipeta multicanal, se colocaron 5 µl de cada antisuero en las cámaras superiores de la placa. Los antisueros y la mezcla de células se mezclaron cuidadosamente hacia arriba y hacia abajo una vez con la pipeta. Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas.

35 Después de 48 horas, las placas estaban listas para ser leídas. La solución de disociación celular que contiene calceína AM se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas también se lavaron y desmontaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se agregaron 125 µl de solución de disociación celular que contenía calceína AM a los pozos de cámara inferior y las placas se colocaron a 37°C durante 30 minutos. Después de 30 minutos, los lados de las placas se golpearon para soltar las células, y las placas se colocaron en una incubadora durante otros 30 minutos a 37°C. Las placas se desmontaron y la placa inferior se colocó en el lector de placas (SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, Ca) con los ajustes: Fluorescencia, emisión 485-520, lectura superior, placa opaca negra, sensibilidad a 30°C.

Se observó una inhibición consistente de la migración/invasión en el colágeno I (Figura 13) y el colágeno IV, desde los sobrenadantes hasta el material de preparación de 10 mL y los preparados de 100 mL y ascitis.

45 Ensayos de adhesión celular

Se sembraron células MDA-MB231 en placas de 15 cm<sup>2</sup> y se cultivaron en 4.5 g/L de glucosa que contenía DMEM (FBS al 10% y L-glutamina 2 mM) de modo que fueran confluentes el día del ensayo. El medio se aspiró y las células se lavaron 2 veces con 10 ml de EDTA PBS 1 mM por placa. Las células se retiraron de las placas incubando con otros 10 ml de EDTA PBS 1 mM durante 5 minutos a 37°C en un gabinete de bioseguridad y posteriormente se pipetearon las células de la placa en la solución de EDTA PBS. Se determinó la concentración celular y se escindieron suficientes células para el ensayo (50 k/pozo más extra para pipeteo) en un tubo cónico de 15 ml. El sedimento celular

5 se dispersó en DMEM libre de suero precalentado a 500 K células/ml y se añadió  $\text{CuCl}_2$  a una concentración final de 1  $\mu\text{M}$ . Se pipetearon cien (100)  $\mu\text{l}$ /pozo de suspensión celular en una placa de cultivo de tejidos de 96 pozos con fondo en U que contenía 10  $\mu\text{l}$  de la dilución de mAb apropiada. La mezcla de suspensión celular/mAb se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego se transfirieron cien (100)  $\mu\text{l}$ /pozo de células resuspendidas/mAb a placas de 96 pozos recubiertas con colágeno IV (BD Biocoat, BD Biosciences). Las placas se incubaron a 37°C en un gabinete de bioseguridad durante 1 hora. Luego se aspiraron los pozos y se lavaron suavemente dos veces con 200  $\mu\text{l}$  de DPBS (Mediatech) para eliminar las células que no se habían adherido. Luego se agregaron a cada pozo cien (100)  $\mu\text{l}$  de 10  $\mu\text{M}$  de concentración final de Calceína-AM (BD Biosciences) en DPBS para teñir las células que quedaron. Las placas se incubaron a 37°C en un gabinete de bioseguridad durante 1 hora. 10 Las placas se leyeron en un lector de placas Molecular Devices M5 a 494/517 (excitación/emisión). El porcentaje (%) de adhesión se calculó normalizando a PBS o controles de anticuerpos no relacionados.

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

#### Crecimiento celular

15 Los anticuerpos anti-LOXL2 inhibieron el crecimiento celular de cuatro líneas celulares: 231 es una línea celular de cáncer de mama, BT549 es una línea celular de cáncer de mama, HT1080 es un fibrosarcoma y BxPC3 es una línea celular de cáncer de próstata (Figura 17). Por lo tanto, el anticuerpo es eficaz para inhibir el crecimiento de cánceres de diferentes orígenes.

#### Ejemplo 8

20 Inhibición por AB0023 del cambio de tipo EMT

Los cambios epiteliales a mesenquimatosos se evaluaron utilizando inmunohistoquímica.

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

25 Protocolo de tinción con rodamina faloidina

Las células se sembraron 24 horas antes del día de tinción; las células eran aproximadamente 80% confluentes 24 horas después en un portaobjetos de 8 cámaras. Al día siguiente, se aspiró el medio y se enjuagaron las cámaras con PBS 1X. Las células se fijaron luego con 4% de paraformaldehído (PFA) durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego se enjuagaron una vez con solución salina regulada con fosfato 1X (PBS). Para la permeabilización, las células se trataron con saponina al 0.5% (JT Baker, Phillipsburg, NJ) en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. 30 Las cámaras se enjuagaron cuidadosamente una vez con 1X PBS, y se añadió una dilución 1:100 de rodamina faloidina (Invitrogen, Carlsbad, Ca) en PBS a las células y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las cámaras se enjuagaron dos veces con 1X PBS y las diapositivas se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

35 Protocolo de tinción con E-cadherina

Las células se sembraron 24 horas antes del día de la tinción; las células eran aproximadamente 80% confluentes al día siguiente en un portaobjetos de 8 cámaras. Al día siguiente, se aspiró el medio y se enjuagaron las cámaras con PBS 1X. Las células se fijaron luego con metanol helado y luego se incubaron durante 2 minutos a -20°C. Las células se enjuagaron una vez con 1X PBX y se añadió 1  $\mu\text{g/ml}$  de E-cadherina Ab (Calbiochem, Gibbstown, NJ) a las cámaras de portaobjetos. Los portaobjetos se incubaron a 37°C durante 1 hora. Después de enjuagar cuidadosamente las cámaras una vez con 1X PBS, se añadió el Ab secundario (anti-IgG cy3 de ratón conjugado, Jackson Immuno Research, West Grove, Pa) y se incubó a temperatura ambiente durante 30-45 minutos. Las cámaras se enjuagaron dos veces con 1X PBS y se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

45 Medio condicionado de células HS-578t (LOXL2 alto) aplicado a células MCF-7 (LOXL2 bajo/negativo). Las células se tiñeron con rodamina-faloidina (actina F, roja) y Dapi (núcleos, azul).

Se encontró que AB0023 inhibe los cambios de tipo EMT inducidos por medios condicionados de células tumorales que expresan LOXL2 (datos no mostrados).

#### Ejemplo 9

El Anticuerpo AB0023 anti-LOXL2 se une a la matriz asociada a LOXL2.

50 Estudios de internalización y captación de Ab en células Hs578t.

Las células Hs578t se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10% y glutamina 1x. Las células se sembraron en un portaobjetos de vidrio de 8 cámaras (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ) y se dejaron adherir durante la noche. Para baja

confluencia, las células se sembraron a 30-40.000 células por portaobjetos. Se usó baja confluencia para la detección de Lox en el citosol 24 horas después. Para alta confluencia, las células se sembraron a 100.000 células por portaobjetos. Se utilizó una alta confluencia para la detección de Lox asociada con la matriz y el colágeno aproximadamente 48-72 horas después.

- 5 El día siguiente, se añadieron a las cámaras 1 µg/ml (concentración final en medio de crecimiento regular) de anti-Lox M64 o anti-Lox2 M20 monoclonal Ab (mAb). Para la captación continua, los mAb se incubaron con células en diferentes puntos de tiempo: por ejemplo, 3 horas, 8 horas o 24 horas (toda la noche). Después de una cantidad apropiada de captación continua, los medios se retiraron y las cámaras se enjuagaron con 1X PBS. Las células se fijaron en PFA al 4% (paraformaldehído) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de la fijación, las  
10 células se lavaron con PBS 1X a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego se detuvieron en cloruro de amonio 50 mM a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las células se lavaron de nuevo con 1X PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos.

- 15 Las células se permeabilizaron añadiendo regulador de saponina (Saponina al 0.5%/BSA al 1% en PBS) a temperatura ambiente durante 20 minutos. La detección secundaria Ab (Alexa Fluor 488 de asno anti-IgG de ratón, Invitrogen, Carlsbad, CA) se añadió a temperatura ambiente en regulador de saponina y las células se incubaron durante 30-45 minutos. Las células se lavaron luego 3X en regulador saponina. Los portaobjetos se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

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

El análisis por inmunotransferencia e inmunofluorescencia (datos no mostrados) indicó que LOXL2 era predominantemente intracelular a baja densidad, pero se secretaba a alta densidad celular (células confluentes). La LOXL2 se detectó en los medios de células confluentes y también en la matriz extracelular. La inmunofluorescencia en células vivas indicó que AB0023 se unía a LOXL2 asociado con la matriz de colágeno.

- 25 Ejemplo 10 (ejemplo de referencia)

El anticuerpo Anti-LOX M64 se une a LOX

La actividad del anticuerpo anti-LOX M64 se evaluó sobre concentraciones crecientes de 1.5 DAP y sobre concentraciones crecientes de anticuerpo (véase Figura 15).

Materiales y métodos

- 30 Todas las placas se obtuvieron de Corning. El anticuerpo secundario y el sustrato Pico provenían de Pierce. El reactivo rojo Amplex era de Invitrogen. La peroxidasa de rábano picante (HRP), 1,5-diaminopentano, antiespumante fueron de Sigma. Todos los reactivos de ProteOn fueron de Bio-Rad. La LOX fue producida internamente en Arreston Biosciences. Los anticuerpos utilizados en este estudio se produjeron en Antibody Solution o vía ascitis (asc) de Aragen Biosciences. Todos los demás reactivos fueron de la más alta calidad posible.

- 35 Unión mediante ELISA

- La unión de anticuerpo a LOX se determinó usando un ELISA basado en luminiscencia. Las placas de White Corning se recubrieron con 0.1 µg/mL de LOX o antígeno de interés en regulador borato 50 mM (pH 8.0) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron con un lavador de placas BioTek y se bloquearon con leche desnatada al 5% en PBST (Tween-20 al 0.05%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBST (Tween-20 al 0.05%)  
40 y luego se usaron inmediatamente o se almacenaron a 4°C en un desecador para uso futuro. El anticuerpo por ensayar se diluyó en serie en PBST (Tween-20 al 0.01%) y se agregaron 100 uL de cada dilución por pozo. Las placas se incubaron con material de prueba durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se lavaron con PBST (0.05% de Tween-20). El anticuerpo de detección (conjugado anti-HRP de ratón) se diluyó 16000 veces en leche desnatada al 5% en PBST (Tween-20 al 0.05%) y se aplicaron 100 uL por pozo. Las placas se incubaron durante 1 hora con el  
45 anticuerpo de detección y luego se lavaron con PBST (0.05% de PBST). La señal se detectó utilizando el sustrato quimioluminiscente pico SuperSignal ELISA de Pierce siguiendo las instrucciones del fabricante. La luminiscencia se midió utilizando un lector de placas Molecular Devices M5 con un tiempo de integración de 500 ms que captura todas las longitudes de onda. Los datos se corrigieron con respecto a la señal de fondo y la dependencia de la señal de luminiscencia a la concentración de anticuerpos se ajustó utilizando la ecuación de isoterma de Langmuir utilizando el  
50 programa GraFit. En los casos en que la concentración de antígeno fue similar a la constante de disociación, se usó la ecuación cuadrática de unión estrecha. Los valores de disociación informados se obtuvieron de los ajustes a estas ecuaciones; donde PL representa la señal del complejo unido,  $B_{max}$  es la unión máxima,  $K_D$  es la constante de disociación y L es la concentración del ligando.

Ecuación isoterma de Langmuir

- 55 Ecuación de la isoterma de Langmuir:

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

Ecuación de unión ajustada:

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

5 El anticuerpo anti-LOX M64 se probó en tres lotes y se encontró que tenía un KD de 6.6 nM, 5.0 nM y 5.7 nM para el lote 3, el lote 4 y el lote 5, respectivamente (Figura 15).

Ejemplo 11 (ejemplo de referencia)

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

La afinidad de unión de M64 se evaluó mediante la Resonancia de Plasmón en Superficie (SPR).

10 Las afinidades de unión se midieron usando un instrumento Bio-Rad ProteOn termostatzado a 25°C. Las afinidades de unión se determinaron usando dos métodos, usando acoplamiento de amina; uno en donde se inmovilizó el anticuerpo y se añadió el antígeno (LOX), y otro en donde se inmovilizó el antígeno (LOX) y se añadió el anticuerpo. El anticuerpo o antígeno se inmovilizó en un chip GLC utilizando una relación 1:1 de NHS a EDC provisto con el kit de inmovilización ProteOn. El chip se activó primero con una mezcla de NHS/EDC y luego el antígeno o el anticuerpo a 15 típicamente un acoplamiento de aproximadamente 500 RU. La superficie del chip activado se tapó luego con la adición de etanolamina 1M. Los chips acoplados se almacenaron a 4°C y se regeneraron con hidróxido de sodio 50 mM.

20 Las constantes de disociación se determinaron sondeando el chip acoplado con una serie de dilución de anticuerpo o antígeno en PBST (0.05% de Tween-20). Los datos se adquirieron en los seis canales disponibles en el ProteOn utilizando un canal no acoplado como referencia. Los datos recopilados se analizaron utilizando el software de gestión ProteOn de Bio-Rad.

Se encontró que M64 tenía una K<sub>D</sub> de 7 nM (Figura 16).

Ejemplo 12

A continuación, se muestra una lista de secuencias descritas a lo largo de la especificación.

SEQ ID NO	Secuencia
1.	<u>MEWSRVFI</u> <u>FLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELV</u> <u>RPGTSVKV</u> <u>SCKASGYAFTYYLIE</u> <u>WVKQRPGQGLEWIGVIN</u> <u>PGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARNWMNFDYWGQGTTTLTVSS</u>
2.	<u>MRCLAEFLG</u> <u>LLVLWIPGAIGDIVMTQAAPSVSVTPGESVSI</u> <u>SCRSSKSL</u> <u>LHNSGNTYLYWFLQRPGQSPQF</u> <u>LIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIK</u>
3.	<u>MGWSWVFL</u> <u>FLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFRSYDINWVRQRPEQGLEWIGWIF</u> <u>PGDGSTKYNEKFKGKAILTTDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARVYYAMDYWGQGTSTVTVSS</u>
4.	<u>MKLPVRL</u> <u>LVFWIPASSSDVLLTQTPLSLPVS</u> <u>LGDAQASISCRSSQ</u> <u>SIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI</u> <u>YKVS</u> <u>NRFS</u> <u>GV</u> <u>PDRF</u> <u>GGSGSGTDF</u> <u>TLKINRVEAEDLGIYYCFQSSHIPLTFGAGTKLELKRAD</u>
5.	<u>MKLPVRL</u> <u>LVFWIPASSSDVLLTQTPLSLPVS</u> <u>LGDAQASISCRSSQ</u> <u>SIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI</u> <u>YKVS</u> <u>IRFS</u> <u>GV</u> <u>PDRF</u> <u>GGSGSGTDF</u> <u>TLKINRVEAEDLGIYYCFQSSHIPLTFGAGTKLELKRAD</u>

ES 2 700 141 T3

SEQ ID NO	Secuencia
6.	VRLRGGAYIGEGRVEVLKNGEWGTVCDKDWLVSASVVCRELGFSGSAKEAVTGSRLGQGIGPIHLNEIQCT GNEKSIIDCKFNAESQGCNHEEDAGVRCNLRLNGGRNPYEGRVEVLVERNGSLVWGMVCGQNWGIVEAMVV
	CRQLGLGFASNAFQETWYWHGDVNSNKVVMMSGVKCSGTELSLAHCRHDGEDVACPQGGVQYGAGVACS
7.	MRFAWTVLLLGLPLQLCAALVHCAPPAAGQQQPPREPPAAPGAWRQQIQWENNGQVFSLLSLGSQYQPQRRRD PGAAVPGAANASAQQRTPILLIRDNRATAARTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRAREAGASRA ENQTAPGEVPALSNLRPPSRVDGMVGDDPYNPKYSDDNPYYNYDYTYERPRPGGRYRPGYGTGYFQYGLP DLVADPYYIQASTYVQKMSMYNLRCAAEEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVKNQGTSDLFSPRPRY SWEHWSCHQHYHSMDEF SHYDLLDANTQRRVAEGHKASFCELEDTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGCYD TYGADIDCQWIDITDVKPGNYILKVSVNPSYLVPESDYTNNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY
8.	ALVHCAPPAAGQQQPPREPPAAPGAWRQQIQWENNGQVFSLLSLGSQYQPQRRRDPGAAVPGAANASAQQR TPILLIRDNRATAARTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRAREAGASRAENQTAPGEVPALSNLR PPSRVVDGMVGDDPYNPKYSDDNPYYNYDYTYERPRPGGRYRPGYGTGYFQYGLPDLVADPYYIQASTYVQ KMSMYNLRCAAEEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVKNQGTSDLFSPRPRYSWEHWSCHQHYHSMDE FSHYDLLDANTQRRVAEGHKASFCELEDTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGCYD TYGADIDCQWIDITDVKP GNYILKVSVNPSYLVPESDYTNNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY
9.	DDPYNPKYSDDNPYYNYDYTYERPRPGGRYRPGYGTGYFQYGLPDLVADPYYIQASTYVQKMSMYNLRCA AEEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVKNQGTSDLFSPRPRYSWEHWSCHQHYHSMDEF SHYDLLDAN TQRRVAEGHKASFCELEDTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGCYD TYGADIDCQWIDITDVKPGNYILKVSVN PSYLVPESDYTNNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY
10.	gggctgattgagccccgtttttatctgtgagccacgtcctcctcgaggggtcaatctggccaaaa ggagtgatgcgcttcgctggaccgtgctcctgctcggcctttgcagctctgcgcgctagtgactgcgc ccctcccgcgcgcgccaacagcagccccgcgcgagccgcggcggctccggcgcctggcgcagcaga tccaatgggagaacaacgggaggtgttcagcttgctgagcctgggctcacagtlaccagcctcagcgcgc cgggaccgggagcgcgcgctccctggtgagccaacgcctccgcccagcagccccgcactccgatcctgct gatccgcgacaaccgcaccgcccgcggcgcgaacgcggacggccggctcatctggagtaccgctggccgc ccaggcccaccgcccgtcactggttccaagctggctactcgacatctagagccccggaacgtggcgcctcg cgcgcgagaaaccagacagcgcgggagaagttcctgctcagtaacctgcccgcggccagccgctgga cggcatggtggcgacgaccttacaaccctacaagtaactctgacgacaaccttattacaactactacg atacttatgaaaggcccagacctgggggaggtaccggcccggatacggcactggctacttccagtagcgt ctcccagacctggtggccgacctactacatccaggcgtccacgtacgtgcagaagatgtccatgtacaa cctgagatgcgcgggcggaggaaaactgtctggccagtagacatacagggcagatgtcagagattatgatc acagggtgctgctcagatttccccaaagagtgaaaaaccaaggacatcagatttcttaccagccgacca agatattcctgggaatggcacagttgtcatcaacattaccacagtaggatgagtttagccactatgacct gcttgatgccaacaccagaggagagtggtgagggccacaaagcaagtttctgtcttgaagacacatcct gtgactatggctaccacaggcagatttgatgactgcacacacagggattgagtcctggctgttatgat acctatggtgcagacatagactgccagtgattgatattacagatgtaaacctggaaactatctctaaa ggtcagtgtaaaccccagctacctggttctgaatctgactataccaacaatggttgctgctgtgacattc gctacagagacatcatgcgtatgcctcaggctgcacaaatccaccgtattagaaggcaaaagcaaaccc caatggataaaatcagtcctggtgttctgaagtgggaaaaaatagactaacctcagtaggatttatgtatt ttgaaaaagagaacagaaaacaacaaaagaattttgtttggactgttttcaataacaaagcacataactg gattttgaaagccttaagtcaatcattacttggaaattntaatgtttattatttaccatcaactttgtgaat taacacagtgtttcaattctgtaatttcatatttgactcttt

ES 2 700 141 T3

SEQ ID NO	Secuencia
11.	<p>MRFAWTVLLLGPLQLCALVHCAPPAAGQQQPPREPPAAPGAWRQQIQWENNGQVFSLLSLGSQYQPQRRRD            PAAVPGAANASAAQQRTPILLIRDNRATAARTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRARER GASRA            ENQTAPGEVPALSNLRPPSRVDGMVGDDPYNPYKYSDDNPYNYDYTYERPRPGGRYRPGYGTGYFYGLP            DLVADPYYIQASTYVQKMSMYNLRCAAEEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVKNQGTSDFLPSRPRY            SWEWHSCHQHYHSMDEF SHYDLLDANTQRRVAEGHKASFLEDTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGCYDTY            GADIDCQWIDITDVKPGNYILKVSVNPSYLVPESDYTNNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY</p>
12.	<p>atgcgcttcgectggaccgtgctcctgctcgggctttgcagctctgcgcgctagtgcactgcgcccctcc            cgccgcccggccaacagcagccccgcgagccgcccggcggtccggggcgctggcgccagcagatccaat            gggagaacaacgggcaggtgttcagcttgctgagcctgggctcacagtaccagcctcagcgccgcccggac            ccgggcccgcctccctggtgcagccaacgcctccgcccagcagccccgcactccgatcctgctgatccg            cgacaaccgcaccgcccggcggaacgcggacggccggctcatctggagtaccgctggccgcccaggc            ccaccgcccgtcactggttccaagctggctactcgacatctagagcccgcgaacgtggcgccctcgcgcgcg            gagaaccagacagcgcccgggagaagtccctgcgctcagtaacctgcccggcccagccgctggacggcat            ggtggcgagcacccttacaaccctacaagctactctgacgacaacccttattacaactactacgatactt            atgaaaggcccagacctgggggcaggtaccggcccggatacggcactggctacttccagtagggtctccca</p>
	<p>gacctggtggccgaccccactacatccaggcgtccacgtacgtgcagaagatgtccatgtacaacctgag            atgcgcgccggaggaaaactgtctggccagtagcagcatacagggcagatgtcagagattatgatcacaggg            tgctgctcagatttccccaaagagtgaaaaaccaaggacatcagatttcttaccagccgaccaagatat            tcctgggaatggcacagttgtcatcaacattaccacagtaggatgagtttagccactatgacctgcttga            tgccaacaccagaggagagtggtgaaggccacaagcaagtttctgtcttgaagacacatcctgtgact            atggctaccacaggcgatttgcagtagtactgcacacacacagggttagtgctcctggctgttatgatacctat            ggtgcagacatagactgccagtggtgatattacagatgtaaacctggaaactatacctaaagggtcag            tgtaaaccccagctacctggttccctgaatctgactataccaacaatggttgcgctgtgacattcgctaca            caggacatcatgcgtagcctcaggctgcacaatttcaccgtattag</p>
13.	<p>MRFAWTVLLLGPLQLCALVHCAPPAAGQQQPPREPPAAPGAWRQQIQWENNGQVFSLLSLGSQYQPQRRRD            PAAVPGAANASAAQQRTPILLIRDNRATAARTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRARER GASRA            ENQTAPGEVPALSNLRPPSRVDGMVGDDPYNPYKYSDDNPYNYDYTYERPRPGGRYRPGYGTGYFYGLP            DLVADPYYIQASTYVQKMSMYNLRCAAEEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVKNQGTSDFLPSRPRY            SWEWHSCHQHYHSMDEF SHYDLLDANTQRRVAEGHKASFLEDTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGCYDTY            GADIDCQWIDITDVKPGNYILKVSVNPSYLVPESDYTNNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY</p>

ES 2 700 141 T3

SEQ ID NO	Secuencia
14.	<p>gggccaggactgagaaaggggaaaggggaaggggtgccacgtccgagcagccgccttgactggggaagggctc  gaatcccacccttggcattgcttgggtggagactgagatacccgtgctccgctcgcctccttgggtgaagat  ttctccttccctcacgtgatttgagccccgtttttattttctgtgagccacgtcctcctcgagcgggggtca  atctggcaaaaggagtgatgcgcttccgctggaccgtgctcctgctcgggcctttgcagctctgcgcgcta  gtgcaactgcgccccctcccgcgcccggccaacagcagccccgcgagccgcccgggctccgggcccctg  gcccagcagatccaatgggagaacaacgggcaggtgttcagcttgctgagcctgggctcacagtaccagc  ctcagcgcgcccgggaccggggcggcggcctccctgggtgcagccaacgcctccgcccagcagccccgact  ccgatcctgctgatccgcgacaaccgcaccgcccggggcgaacgcggagccgggctcatctggagtcac  cgctggcccggcccaggcccaccgcccgtcactgggtccaagctggctactcgacatctagagcccgcgaag  ctgggcccctcgcgcgcccggagaaccagacagcgcgggagaagtccctgctctcagtaacctgcggcccgc  agccgctgggacggcatgggtgggagcagacccttacaaccctacaagtactctgacgacaacccttatta  caactactacgatacttatgaaaggcccagacctgggggacaggtaccggcccggatacggcactggctact  tccagtacggctcctccagacctgggtggcggaccctactacatccaggcgtccacgtacgtgcagaagatg  tccatgtacaacctgagatgcgcggcggaggaaaactgtctggccagtacagcatacagggcagatgctcag  agattatgatcacaggggtgctgctcagatttccccaaagagtgaaaaaccaagggacatcagatttcttac  ccagccgaccaagatattcctgggaatggcacagttgtcatcaacattaccacagtatggatgagtttagc  cacttgtacctgcttgatgccaaccccagaggagatgggctgaaggccacaaagcaagtttctgtcttga  agacacatcctgtgactatggctaccacaggcggatttgcagtgactgcacacacacagggattgagtcctg  gctgttatgatacctatgggtgcagacatagactgccagtggttgatattacagatgtaaaacctggaaac  tatatcctaaaggtcagtgtaaaccccagctacctgggttccctgaatctgactataccaacaatgttgtgcg  ctgtgacattcgtctacacaggacatcatgcgatgcctcaggctgcacaatttcaccgtattagaaggcaa  agcaaaactcccaatggataaatcagtgccctgggtgttctgaagtgggaaaaaatagactaacttcagtagg  atztatgtattttgaaaaagagaacagaaaaacaacaaagaatttttgtttggactgttttcaataacaaa  gcacataactggattttgaaacgcttaagtcatcattacttgggaaatttttaatgtttattatttacatca  ctttgtgaattaacacagtgtttcaattctgtaattacatatttgactctttcaaaaaaaaaaaaaaaaaaa  aaaaa</p>
15.	<p>MRFawTVLLLGLPLQLCALVHCAPPAAGQQQPPREPPAAPGAWRQQIQWENNGQVFSLLSLGSQYQPQRRRD  PGAAVPGAANASAAQQPRTPILLIRDNRTAAGRTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRAREAGPSRA  ENQTAPGEVPALSNLRPPSRVDGMVGDDPYNPYKYSDDNPYNYDYTYERPRPGGRYRPGYGTGYFQYGLP  DLVADPYYIQASTYVQKMSMYNLRCAAENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVKNQGTSDFLPSRPRY  SWEWHSCHQHYHSMDEFSHLYLLDANTQRRWAEGHKASFCLDTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGYDITY  GADIDCQWIDITDVKPGNYILKVSVNPSYLVPESDYTNNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY</p>
16.	<p>ccgcccgcctcccggcttgccttccaggactgagaaaggggaaaggggaaggggtgccacgtccgagcagccgc  cttgactggggaagggctcgaatcccacccttggcattgcttgggtggagactgagatacccgtgctccgct  cgctccttgggtgaagatttctccttccctcacgtgatttgagccccgtttttattttctgtgagccacg  tctcctcgcagcgggggtcaatctggcaaaaggagtgatgcgcttccgctggaccgtcctcctgctcgggccc  tttgagctctgcgcgctagtgcactgcgccccctcccgcgcccggccaacagcagccccccgcgagccgc  cggcggctccgggcccctggcgcagcagatccaatgggagaacaacgggcaggtgttcagcttgctgagc  ctgggctcacagtaccagcctcagcgcgcccgggaccgggcccgcgcccctccctgggtgcagccaacgcctc  cgcccagcagccccgactccgatcctgctgatccgcgacaaccgcaccgcccggcgcgaacgcggacgg  cgggctcatctggagtcaccgctggcccggcccaggcccaccgcccgtcactgggtccaagctggctactcg  acatctagagcccgcgaagctggcgcctcgcgcgcccggagaaccagacagcgcgggagaagttcctgcccct</p>

ES 2 700 141 T3

SEQ ID NO	Secuencia
	<p>cagtaacctgcgccgcccagccgctggacggcatggtggggcgacgaccttacaacccctacaagtact  ctgacgacaacccttattacaactactacgatacttatgaaaggcccagacctgggggaggtaccggccc  ggatacggcactggctacttccagtacggctctcccagacctggggcgacccctactacatccaggcgtc  cacgtacgtgcagaagatgtccatgtacaacctgagatgcgcgccgaggaaaactgtctggccagtacag  catacagggcagatgtcagagattatgatcacagggctgctgctcagatttccccaaagagtgaaaaacaa  gggacatcagatttcttaccagccgaccaagatattcctgggaatggcacagttgtcatcaacattacca  cagtatggatgagtttagccactatgacctgcttgatgccaacacccagaggaggtggctgaaggccaca  aagcaagtttctgtcttgaagacacatcctgtgactatggctaccacagggcagtttgcagtgactgcacac  acacagggattgagtcctggctgttatgatacctatggtgcagacatagactgccagtggttgatattac  agatgtaaacctggaaactatacctaaaggctcagtgtaaaccccagctacctggttcctgaatctgact  ataccaacaatggtgtgctgtgacattcgctacacaggacatcatgctatgctcaggctgcacaatt  tcaccgtattagaaggcaagcaaaactcccaatggataaaatcagtgccctgggttctgaagtgggaaaa  atagactaacttcagtaggatttatgtattttgaaaagagaacagaaaaacaaaagaatttttggttg  gactgttttcaataacaaagcacataactggattttgaaacgcttaagtcattacttggaaattttta  atgtttattatttaccatcactttgtgaattaacacagtgtttcaattctgtaattacataattgactctt  caaagaaatccaaatctctatgttcttttgaattgtagtcaaaatggtcagattatctaaatgaat  gagccaaatgactttgaactgaaacttttctaaagtgtggaactttagtgaacataataataatgggt  ttatacgacagcaacgga</p>
17.	<p>MRFWTVLLLLGPLQLCALVHCAPPAAGQQQPPREPPAAPGAWRQQIQWENNGQVFSLLSLGSQYQPQRRRD  PGAAPVGAANASAAQPRTPILLIRDNRATAARTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRAREAGASRA  ENQTAPGEVPALSNLRPPSRVDGMVGDDPYNPKYSDDNPYYNYDYTYERPRPGGRYRPGYGTGYFYGLP  DLVADPYYIQASTYVQKMSMYNLRCAAEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVKNQGTSDFLPSRPRY  SWEWHSCHQHYHSMDEFSHYDLLDANTQRRVAEGHKASFCLEDTSCDYGYHRRFACHTAHTQGLSPGCDTY  GADIDCQWIDITDVKPGNYILKVSVNPSYLVPESDYTNNVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY</p>
18.	<p>ggtcaatctggcaaaaggagtgatgcgcttcgctggaccgctgctcctgctcgggcttggcagctctgcg  cgctagtgcactgcgccccctcccgccgcccgaacagcagcccccgcgagccgcccggcgtccggggc  gcctggcgccagcagatccaatgggagaacaacgggcaggtgttcagcttgcagcctgggctcacagta  ccagcctcagcgccgcccgggacccgggcccgcgctccctgggagcagcaacgcctccgcccagcagcccc  gcactccgatcctgctgatccgacacacccgaccgcccggcggcgaacgcggacggccggctcatctgga  gtcaccgctggccgccccagggcccaccgcccgtcactggttccaagctggctactcgacatctagagcccg  cgaagctggcgccctcgcgccgggagaaccagacagcggcgggagaagttcctgcgctcagtaacctgccc  cgcccagccgctggacggcatggtggggcgacgaccttacaacccctacaagtactctgacgacaaccct  tattacaactactacgatacttatgaaaggcccagacctgggggaggtaccggcccggatagggcactgg  ctacttccagtacggctctcccagacctggggcgacccctactacatccaggcgtccacgtacgtgcaga  agatgtccatgtacaacctgagatgcgcgccgaggaaaactgtctggccagtacagcatacagggcagat  gtcagagattatgatcacagggctgctgctcagatttccccaaagagtgaaaaaccaagggacatcagattt  cttaccagccgaccaagatattcctgggaatggcacagttgtcatcaacattaccacagtatggatgagt  ttagccactatgacctgcttgatgccaacacccagaggagagtggtgctgaaggccacaaagcaagtttctgt  cttgaagacacatcctgtgactatggctaccacagggcagtttgcagtgactgcacacacacagggattgag  tcctggctgttatgatacctatggtgcagacatagactgccagtggttgatattacagatgtaaacctg  gaaactatacctaaaggctcagtgtaaaccccagctacctggttcctgaatctgactataccaacaatggt  gtgctgtgacattcgctacacaggacatcatgctatgctcaggctgcacaatttaccgctattagaa  ggcaagcaaaactcccaatggataaatcagtgccctgggttct</p>

ES 2 700 141 T3

SEQ ID NO	Secuencia
19.	<p>MRFAWTVLLLGLPLQLCALVHCAPPAAGQQQPPREPPAAPGAWRQQIQWENNGQVFSLLSLGSQYQPQRRRD                      PAAVPGAANASAAQQRTPILLIRDNRATAARTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRAREAGASRA                      ENQTAPGEVPALSNLRPPSRVDGMVGDDPYNPKYSDDNPYNYDYDYERPRPGGRYRPGYGTGYFYGLP                      DLVADPYYIQASTYVQKMSMYNLRCAAEEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVKNQGTSDFLPSRPRY                      SWEWHSCHQHYHSMDEFSHYDLLDANTQRRVAEGHKASFCLEDTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGCYDTY                      GADIDCQWIDITDVKPGNYILKVSVNPSYLVPESDYTNNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY</p>
20.	<p>ggtcaatctggcaaaaggagtgatgcgcttcgctggaccgtgctcctgctcgggctttgcagctctgcg                      cgctagtgcactgcgccccctcccgccgcccggccaacagcagcccccgcgagccgcccggcgctccgggc                      gcctggcgccagcagatccaatgggagaacaacgggcagggtgttcagcttgctgagcctgggctcacagta                      ccagcctcagcgccgcccgggaccggggcgccgctccctgggagcgaacgcctccgcccagcagcccc                      gactccgatcctgctgatccgagacaaccgcaccgcccggcgcggaacgcccagcggcctcatctgga                      gtcaccgctggcggccccaggcccaccgcccgtcactggttccaagctggctactcgacatctagagcccc                      cgaagctggcgccctcgcgcgcggaaccagacagcgcccgggagaagttcctgcgctcagtaacctgccc                      cgcccagccgctggacggcatggtggcgacgaccttacaaccctacaagtaactctgacgacaacct</p>
	<p>tattacaactactacgatacttatgaaaggcccagacctgggggaggtaccggcccggatacggcactgg                      ctacttccagtaacggtctcccagacctggggggaccctactacatccaggcgtccacgtacgtgcaga                      agatgtccatgtacaacctgagatgcccggggaggaaaactgtctggccagtaacagcatacagggcagat                      gtcagagattatgatcacagggtgctgctcagatttccccaaagagtgaaaaaccaaggacatcagattt                      ctaccagccgaccaagatattcctgggaatggcacagttgtcatcaacattaccacagatggatgagt                      ttagccactatgacctgcttgatgccaaccccagaggagagtggtgaaggccacaagcaagtttctgt                      ctgaagacacatcctgtgactatggctaccacaggcgatttgcatgtaactgcacacacacagggattgag                      tccctgctgttatgatacctatgggagcagacatagactgccagtggtgatattacagatgtaaaacctg                      gaaactatctcctaaaggctcagtgtaaaccccagctacctggttccctgaatctgactataccaacaatgtt                      gtgcgctgtgacattcgtcacacaggacatcatgctatgcccaggtgcacaatttaccgctattagaa                      ggcaaagcaaaactcccaatggataaatcagtgccctggtgttctgaa</p>
21.	<p>MRFAWTVLLLGLPLQLCALVHCAPPAAGQQQPPREPPAAPGAWRQQIQWENNGQVFSLLSLGSQYQPQRRRD                      PAAVPGAANASAAQQRTPILLIRDNRATAARTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRAREAGASRA                      ENQTAPGEVPALSNLRPPSRVDGMVGDDPYNPKYSDDNPYNYDYDYERPRPGGRYRPGYGTGYFYGLP                      DLVADPYYIQASTYVQKMSMYNLRCAAEEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVKNQGTSDFLPSRPRY                      SWEWHSCHQHYHSMDEFSHYDLLDANTQRRVAEGHKASFCLEDTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGCQWID                      ITDVKPGNYILKVSVNPSYLVPESDYTNNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY</p>
22.	<p>Gttcagcttgctgagcctgggctcacagtaaccagcctcagcgcccgggaccggggcgccgcccgtccctg                      gtgagccaacgcctccgcccagcagccccgactccgatcctgctgatccgagacaaccgcaccgcccgg                      gcggaacgcccagcggcccggctcatctggagtcaccgctggcccggccccaggcccaccgcccgtcactggtt                      ccaagctggctactcgacatctagagcccgggaagctggcgccctcgcgcgcgagagaaccagacagcgccgg                      gagaagttcctgctcagtaacctgcccggcccagcccgtggacggcatggtggggcagcacccttac                      aaccctacaagtaactctgacgacaacccttattacaactactacgatacttatgaaaggcccagacctgg                      gggcaggtaccggcccggatacggcactggctacttccagtaacgtaagtaacccccaaagctccgctggaagc                      accgctgcacctggtccccagctatgtggcttcttctcagctggctgctgctggggcgccggggccccggctc                      ctgagatccgaccctccccagcgcctgagtgccagccctggaatccagtgcaaacccgcccgtctgg                      cccctcctgcttcttttcacattgctttgcagtcgggggggtccccagttctcttctgctgctcctccgctcc                      actctgagctcccgggtggggaaggtgaggagtaagggacctagaggggtagggagttggagcggggggg                      gccgggtgtttcactgctgcccggctgcccgtgacgtttaggtctcccagacctggtg</p>

ES 2 700 141 T3

SEQ ID NO	Secuencia
23.	FSLLSLGSQYQPQRRRDPGA AVPGAANAS AQQPRTPI LLIRDNR TAAARTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWF QAGYSTSRAREAGASRAENQTAPGEVPALSNLRPPSRVDGMVGDDPYNPKYSDDNPNYNYDYERPRPG GRYPGYGTGYFQYGLPDLV
24.	MEWSRVFI FLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVRPGTSVKV SCKAS <u>GYAFTYYLIE</u> WVKQRPGQGLEWIG <u>VINPGSGGTNYNEKFKG</u> KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCAR <u>NWMNFDY</u> WGQGTTLTVSS
25.	QVQLVQSGAEL <u>KKPGASVKV SCKAS</u> <u>GYAFTYYLIE</u> WVKQAPGQGLEWIG <u>VINPGSGGTNYNEKFKG</u> RATLTADKS <u>TSTAYMELSSLRSEDS</u> AVYFCAR <u>NWMNFDY</u> WGQGTTLTVSS
26.	QVQLVQSGAEV <u>KKPGASVKV SCKAS</u> <u>GYAFTYYLIE</u> WVRQAPGQGLEWIG <u>VINPGSGGTNYNEKFKG</u> RATLTADKS <u>TSTAYMELSSLRSEDT</u> AVYFCAR <u>NWMNFDY</u> WGQGTTLTVSS
27.	QVQLVQSGAEV <u>KKPGASVKV SCKAS</u> <u>GYAFTYYLIE</u> WVRQAPGQGLEWIG <u>VINPGSGGTNYNEKFKG</u> RATITADKS <u>TSTAYMELSSLRSEDT</u> AVYFCAR <u>NWMNFDY</u> WGQGTTLTVSS
28.	QVQLVQSGAEV <u>KKPGASVKV SCKAS</u> <u>GYAFTYYLIE</u> WVRQAPGQGLEWIG <u>VINPGSGGTNYNEKFKG</u> RVTITADKS <u>TSTAYMELSSLRSEDT</u> AVYFCAR <u>NWMNFDY</u> WGQGTTLTVSS
29.	MRCLA EFLGLLVLWIPGAIGDIVMTQAAPSVSVTPGESVSI <u>CRSSKSLLSNGNTYLY</u> WFLQRPQSPQFLIY <u>RMSNLAS</u> GVPDRFSGSG
30.	DIVMTQT <u>PLSLSVTPGQPASIS</u> <u>CRSSKSLLSNGNTYLY</u> WFLQKPGQSPQFLIY <u>RMSNLAS</u> GVPDRFSGSGTAFTLKI SRVEAEDVG VYYC <u>MQHLEYPYT</u> FGGGTKVEIK
31.	DIVMTQT <u>PLSLSVTPGQPASIS</u> <u>CRSSKSLLSNGNTYLY</u> WFLQKPGQSPQFLIY <u>RMSNLAS</u> GVPDRFSGSGTDFTLKI SRVEAEDVG VYYC <u>MQHLEYPYT</u> FGGGTKVEIK
32.	DIVMTQT <u>PLSLSVTPGQPASIS</u> <u>CRSSKSLLSNGNTYLY</u> WYLOKPGQSPQFLIY <u>RMSNLAS</u> GVPDRFSGSGTDFTLKI SRVEAEDVG VYYC <u>MQHLEYPYT</u> FGGGTKVEIK
33.	MEWSRVFI FLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVRPGTSVKV SCKAS
34.	WVKQRPGQGLEWIG
35.	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCAR
36.	WGQGTTLTVSS

ES 2 700 141 T3

SEQ ID NO	Secuencia
37.	QVQL <u>Y</u> QSGAEL <u>KK</u> PG <u>A</u> SVKVSCKAS
38.	WVKQ <u>A</u> PGQGLEWIG
39.	<u>R</u> ATLTADKS <u>T</u> STAYM <u>E</u> LSSL <u>R</u> SE <u>D</u> SAVYFCAR
40.	WGQGTT <u>V</u> TVSS
41.	GYAFTYYLIE
42.	VINPGSGGTNYNEKFKG
43.	NWNMFDY
44.	QVQL <u>Y</u> QSGAE <u>VKK</u> PG <u>A</u> SVKVSCKAS
45.	WVRQ <u>A</u> PGQGLEWIG
46.	<u>R</u> ATLTADKS <u>T</u> STAYM <u>E</u> LSSL <u>R</u> SE <u>D</u> <u>I</u> AVYFCAR
47.	<u>R</u> AT <u>I</u> TADKS <u>T</u> STAYM <u>E</u> LSSL <u>R</u> SE <u>D</u> <u>I</u> AVYFCAR
48.	<u>R</u> V <u>T</u> <u>I</u> TADKS <u>T</u> STAYM <u>E</u> LSSL <u>R</u> SE <u>D</u> <u>I</u> AVY <u>Y</u> CAR
49.	MRCLAEFLGLLVLWIPGAIGDIVMTQAAPSVSVTPGESVSISC
50.	WFLQRPGQSPQFLIY
51.	GVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC
52.	FGGGTKLEIK
53.	DIVMTQ <u>T</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>L</u> SVTPG <u>Q</u> <u>P</u> ASISC
54.	WFLQ <u>K</u> PGQSPQFLIY
55.	GVPDRFSGSGSGTAFTL <u>K</u> ISRVEAEDVGVYYC
56.	FGGGTK <u>V</u> EIK
57.	RSSKLLHSNGNTYLY
58.	RMSNLAS
59.	MQHLEYPYT
60.	GVPDRFSGSGSGT <u>D</u> FTL <u>K</u> ISRVEAEDVGVYYC

ES 2 700 141 T3

SEQ ID NO	Secuencia
61.	WY <u>LQ</u> KPGQSPQFLIY
62.	<p>Los sitios de escisión alternativos pueden estar entre los aminoácidos 21 y 22 de la preproteína en comparación con la SEQ ID NO: 8</p> <pre> APPAAGQQQPPREPPAAPGAWRQQIQWENNGQVFSLLSLGSQYQPQRRRDPGAAVPGAANASAQQPRTPIIL LIRDNRATAARTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRAREAGASRAENQTAPGEVPALSNLRPPSRV DGMVGDDPYNPYKYSDDNPYNYDYDYERPRPGGRYPGYGTGYFQYGLPDLVADPYYIQASTYVQKMSMY NLRCAAENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVKNQGTSDFLPSRPRYSWEWHSCHQHYHSMDEFSHYD LLDANTQRRVAEGHKASFCL EDTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGCYD TYGADIDCQWIDITDVKPGNYIL KVSVNPSYLVPESDYTNNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY                     </pre>
63.	<p>Los sitios de escisión alternativos pueden estar entre los aminoácidos 27 y 28 de la preproteína en comparación con la SEQ ID NO: 8</p> <pre> QQQPPREPPAAPGAWRQQIQWENNGQVFSLLSLGSQYQPQRRRDPGAAVPGAANASAQQPRTPIILLIRDNR ATAARTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRAREAGASRAENQTAPGEVPALSNLRPPSRVDGMVGD DPYNPYKYSDDNPYNYDYDYERPRPGGRYPGYGTGYFQYGLPDLVADPYYIQASTYVQKMSMYNLRCAA EENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVKNQGTSDFLPSRPRYSWEWHSCHQHYHSMDEFSHYDLLDANT QRRVAEGHKASFCL EDTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGCYD TYGADIDCQWIDITDVKPGNYILKVSVNP SYLVPESDYTNNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY                     </pre>
64.	<p>Secuencia de ARNm de LOX humana</p> <pre> ATGCGCTTCGCCCTGGACCGTGC'TCC'TGC'TCGGGCC'TTTGCAGCTCTGCGCGCTAGTGCACTGCGCCCTCC CGCCGCCGCCAACAGCAGCCCCCGCGCGAGCCGCCGGCGGC'TCCGGCGCC'TGGCGCCAGCAGATCCAAT GGGAGAACAAACGGGCAGGTGTTTCACTGCTGAGCCTGGGC'TCACAGTACCAGCCTCAGCGCCGCCGGGAC CCGGGCGCCCGCGTCCCTGGTGCAGCCAAACGCTCCGCCAGCAGCCCCGCAC'TCCGATCCTGCTGATCCG CGACAACCGCACCCGCCCGCGCGCGAACGCGGACGGCCGGC'TCATCTGGAGTCACCGCTGGCCGCCCCAGGC CCACCGCCCGTCACTGGTTCCAAGCTGGCTACTCGACATCTAGAGCCCGGAAGCTGGCGCCTCGCGCGCG GAGAACCAGACAGCGCCGGGAGAAGTTCCTGCGCTCAGTAACCTGCGGCCGCCAGCCGCTGGACGGCAT GGTGGGCGACGACCCTTACAACCCCTACAAGTACTCTGACGACAACCCTTATTACAACACTACTACGATACTT ATGAAAGGCCAGACC'TGGGGGCGAGTACC'GGCCCGGATACGGCAC'TGGC'TACTTCCAGTACGGTCTCCCA GACCTGGTGGCCGACCCCTACTACATCCAGGCGTCCACGTACGTGCAGAAGATGTCCATGTACAACCTGAG ATGCGCGCGCGAGGAAAAC'TGCT'GGCCAGTACAGCATAACAGGGCAGATGTCAGAGATTATGATCACAGGG TGCTGCTCAGATTTCCCAAAGAGTGAAAACCAAGGGACATCAGATTTCTTACCAGCCGACCAAGATAT TCCTGGGAATGGCACAGTTGTCATCAACATACCACAGTATGGATGAGTTTAGCCACATGACCTGCTTGA TGCCAACACCCAGAGGAGAGTGGCTGAAGGCCACAAAGCAAGTTTCTGCTTGAAGACACATCCTGTGACT ATGGCTACCACAGGCGATTTGCATGTACTGCACACACACAGGGATTGAGTCC'TGGCTGTTATGATACCTAT GGTGCAGACATAGACTGCCAGTGGATTGATATTACAGATGTAAAACCTGGAAACTATATCCTAAAGGTCAG TGTAACCCAGCTACCTGGTTCCTGAATCTGACTATACCAACAATGTTGTGCGCTGTGACATTCGCTACA CAGGACATCATGCGTATGCCTCAGGCTGCACAATTTACCCGTAT                     </pre>

ES 2 700 141 T3

SEQ ID NO	Secuencia
65.	<p>Secuencia de proteina LOX humana</p> <p>MRFWTVLLLLGPLQLCALVHCAPPAAGQQQPPREPPAAPGAWRQQIQWENNGQVFSLLSLGSLGQYQPQRRRD            PGAAVPGAANASAAQQPRTPIILLIRDNRATAARTRTAGSSGVTAGRPRPTARHWFQAGYSTSRAREAGASRA            ENQTAPGEVPALSNLRPPSRVDGMVGDDPYNPYKYSDDNPYYNYDYTYERPRPGGRYRPGYGTGYFYGLP            DLVADPYYIQASTYVQKMSMYNLRCAAEEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVKNQGT\$DFLPSRPRY            SWEWHSCHQHYHSMDEFSHYDLLDANTQRRVAEGHKASFCLEDTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGCYDITY            GADIDCQWIDITDVKPGNYILKVSVNPSYLVPE\$DYTNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY</p>

Listado de secuencias

- <110> Gilead Biologics, Inc.
- <120> INHIBIDORES DE LOX Y LOXL2 Y USOS DE LOS MISMOS
- 5 <130> AHB/FP6835391
- <140>
- <141> 2008-08-01
- <150> 08830207.0
- <151> 2008-08-01
- 10 <150> PCT/US2008/072039
- <151> 2008-08-01
- <150> 60/963,282
- <151> 2007-08-02
- <150> 60/963,249
- 15 <151> 2007-08-02
- <150> 60/963,214
- <151> 2007-08-02
- <150> 60/963,248
- <151> 2007-08-02
- 20 <150> 60/963,246
- <151> 2007-08-02
- <160> 70
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- 25 <211> 135
- <212> PRT
- <213> Mus sp.
- <400> 1

ES 2 700 141 T3

Met Glu Trp Ser Arg Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly  
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg  
 20 25 30

Pro Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe  
 35 40 45

Thr Tyr Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn  
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val  
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 115 120 125

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 130 135

<210> 2

<211> 132

5 <212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

ES 2 700 141 T3

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro  
 1 5 10 15

Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ser  
 20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser  
 35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg  
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala  
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe  
 85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr  
 100 105 110

Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys  
 130

<210> 3

<211> 135

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 3

ES 2 700 141 T3

Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly  
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Arg Ser Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn  
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 115 120 125

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 130 135

<210> 4

<211> 133

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 4

ES 2 700 141 T3

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser  
 1 5 10 15

Ser Ser Asp Val Leu Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser  
 20 25 30

Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val  
 35 40 45

His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly  
 50 55 60

Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly  
 65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Gly Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 85 90 95

Lys Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe  
 100 105 110

Gln Ser Ser His Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu  
 115 120 125

Leu Lys Arg Ala Asp  
 130

<210> 5

<211> 133

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 5

ES 2 700 141 T3

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser  
 1 5 10 15

Ser Ser Asp Val Leu Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser  
 20 25 30

Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val  
 35 40 45

His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly  
 50 55 60

Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Ile Arg Phe Ser Gly  
 65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Gly Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 85 90 95

Lys Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe  
 100 105 110

Gln Ser Ser His Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu  
 115 120 125

Leu Lys Arg Ala Asp  
 130

<210> 6

<211> 210

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 6

ES 2 700 141 T3

Val Arg Leu Arg Gly Gly Ala Tyr Ile Gly Glu Gly Arg Val Glu Val  
1 5 10 15

Leu Lys Asn Gly Glu Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Lys Trp Asp Leu  
20 25 30

Val Ser Ala Ser Val Val Cys Arg Glu Leu Gly Phe Gly Ser Ala Lys  
35 40 45

Glu Ala Val Thr Gly Ser Arg Leu Gly Gln Gly Ile Gly Pro Ile His  
50 55 60

Leu Asn Glu Ile Gln Cys Thr Gly Asn Glu Lys Ser Ile Ile Asp Cys  
65 70 75 80

Lys Phe Asn Ala Glu Ser Gln Gly Cys Asn His Glu Glu Asp Ala Gly  
85 90 95

Val Arg Cys Asn Leu Arg Leu Asn Gly Gly Arg Asn Pro Tyr Glu Gly  
100 105 110

Arg Val Glu Val Leu Val Glu Arg Asn Gly Ser Leu Val Trp Gly Met  
115 120 125

Val Cys Gly Gln Asn Trp Gly Ile Val Glu Ala Met Val Val Cys Arg  
130 135 140

Gln Leu Gly Leu Gly Phe Ala Ser Asn Ala Phe Gln Glu Thr Trp Tyr  
145 150 155 160

Trp His Gly Asp Val Asn Ser Asn Lys Val Val Met Ser Gly Val Lys  
165 170 175

Cys Ser Gly Thr Glu Leu Ser Leu Ala His Cys Arg His Asp Gly Glu  
180 185 190

Asp Val Ala Cys Pro Gln Gly Gly Val Gln Tyr Gly Ala Gly Val Ala  
195 200 205

Cys Ser  
210

<210> 7

<211> 417

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 700 141 T3

Met Arg Phe Ala Trp Thr Val Leu Leu Leu Gly Pro Leu Gln Leu Cys  
1 5 10 15

Ala Leu Val His Cys Ala Pro Pro Ala Ala Gly Gln Gln Gln Pro Pro  
20 25 30

Arg Glu Pro Pro Ala Ala Pro Gly Ala Trp Arg Gln Gln Ile Gln Trp  
35 40 45

Glu Asn Asn Gly Gln Val Phe Ser Leu Leu Ser Leu Gly Ser Gln Tyr  
50 55 60

Gln Pro Gln Arg Arg Arg Asp Pro Gly Ala Ala Val Pro Gly Ala Ala  
65 70 75 80

Asn Ala Ser Ala Gln Gln Pro Arg Thr Pro Ile Leu Leu Ile Arg Asp  
85 90 95

Asn Arg Thr Ala Ala Ala Arg Thr Arg Thr Ala Gly Ser Ser Gly Val  
100 105 110

Thr Ala Gly Arg Pro Arg Pro Thr Ala Arg His Trp Phe Gln Ala Gly  
115 120 125

Tyr Ser Thr Ser Arg Ala Arg Glu Ala Gly Ala Ser Arg Ala Glu Asn  
130 135 140

Gln Thr Ala Pro Gly Glu Val Pro Ala Leu Ser Asn Leu Arg Pro Pro  
145 150 155 160

Ser Arg Val Asp Gly Met Val Gly Asp Asp Pro Tyr Asn Pro Tyr Lys  
165 170 175

Tyr Ser Asp Asp Asn Pro Tyr Tyr Asn Tyr Tyr Asp Thr Tyr Glu Arg  
180 185 190

Pro Arg Pro Gly Gly Arg Tyr Arg Pro Gly Tyr Gly Thr Gly Tyr Phe  
195 200 205

Gln Tyr Gly Leu Pro Asp Leu Val Ala Asp Pro Tyr Tyr Ile Gln Ala  
210 215 220

Ser Thr Tyr Val Gln Lys Met Ser Met Tyr Asn Leu Arg Cys Ala Ala  
225 230 235 240

ES 2 700 141 T3

Glu Glu Asn Cys Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Arg Ala Asp Val Arg Asp  
 245 250 255

Tyr Asp His Arg Val Leu Leu Arg Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln  
 260 265 270

Gly Thr Ser Asp Phe Leu Pro Ser Arg Pro Arg Tyr Ser Trp Glu Trp  
 275 280 285

His Ser Cys His Gln His Tyr His Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr  
 290 295 300

Asp Leu Leu Asp Ala Asn Thr Gln Arg Arg Val Ala Glu Gly His Lys  
 305 310 315 320

Ala Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr Ser Cys Asp Tyr Gly Tyr His Arg  
 325 330 335

Arg Phe Ala Cys Thr Ala His Thr Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr  
 340 345 350

Asp Thr Tyr Gly Ala Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp  
 355 360 365

Val Lys Pro Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val Ser Val Asn Pro Ser Tyr  
 370 375 380

Leu Val Pro Glu Ser Asp Tyr Thr Asn Asn Val Val Arg Cys Asp Ile  
 385 390 395 400

Arg Tyr Thr Gly His His Ala Tyr Ala Ser Gly Cys Thr Ile Ser Pro  
 405 410 415

Tyr

<210> 8

<211> 401

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 700 141 T3

Ala Leu Val His Cys Ala Pro Pro Ala Ala Gly Gln Gln Gln Pro Pro  
1 5 10 15

Arg Glu Pro Pro Ala Ala Pro Gly Ala Trp Arg Gln Gln Ile Gln Trp  
20 25 30

Glu Asn Asn Gly Gln Val Phe Ser Leu Leu Ser Leu Gly Ser Gln Tyr  
35 40 45

ES 2 700 141 T3

Gln Pro Gln Arg Arg Arg Asp Pro Gly Ala Ala Val Pro Gly Ala Ala  
50 55 60

Asn Ala Ser Ala Gln Gln Pro Arg Thr Pro Ile Leu Leu Ile Arg Asp  
65 70 75 80

Asn Arg Thr Ala Ala Ala Arg Thr Arg Thr Ala Gly Ser Ser Gly Val  
85 90 95

Thr Ala Gly Arg Pro Arg Pro Thr Ala Arg His Trp Phe Gln Ala Gly  
100 105 110

Tyr Ser Thr Ser Arg Ala Arg Glu Ala Gly Ala Ser Arg Ala Glu Asn  
115 120 125

Gln Thr Ala Pro Gly Glu Val Pro Ala Leu Ser Asn Leu Arg Pro Pro  
130 135 140

Ser Arg Val Asp Gly Met Val Gly Asp Asp Pro Tyr Asn Pro Tyr Lys  
145 150 155 160

Tyr Ser Asp Asp Asn Pro Tyr Tyr Asn Tyr Tyr Asp Thr Tyr Glu Arg  
165 170 175

Pro Arg Pro Gly Gly Arg Tyr Arg Pro Gly Tyr Gly Thr Gly Tyr Phe  
180 185 190

Gln Tyr Gly Leu Pro Asp Leu Val Ala Asp Pro Tyr Tyr Ile Gln Ala  
195 200 205

Ser Thr Tyr Val Gln Lys Met Ser Met Tyr Asn Leu Arg Cys Ala Ala  
210 215 220

Glu Glu Asn Cys Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Arg Ala Asp Val Arg Asp  
225 230 235 240

Tyr Asp His Arg Val Leu Leu Arg Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln  
245 250 255

Gly Thr Ser Asp Phe Leu Pro Ser Arg Pro Arg Tyr Ser Trp Glu Trp  
260 265 270

His Ser Cys His Gln His Tyr His Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr  
275 280 285

Asp Leu Leu Asp Ala Asn Thr Gln Arg Arg Val Ala Glu Gly His Lys  
290 295 300

ES 2 700 141 T3

Ala Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr Ser Cys Asp Tyr Gly Tyr His Arg  
305 310 315 320

Arg Phe Ala Cys Thr Ala His Thr Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr  
325 330 335

Asp Thr Tyr Gly Ala Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp  
340 345 350

Val Lys Pro Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val Ser Val Asn Pro Ser Tyr  
355 360 365

Leu Val Pro Glu Ser Asp Tyr Thr Asn Asn Val Val Arg Cys Asp Ile  
370 375 380

Arg Tyr Thr Gly His His Ala Tyr Ala Ser Gly Cys Thr Ile Ser Pro  
385 390 395 400

Tyr

<210> 9

<211> 249

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 700 141 T3

Asp Asp Pro Tyr Asn Pro Tyr Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Pro Tyr Tyr  
 1 5 10 15  
 Asn Tyr Tyr Asp Thr Tyr Glu Arg Pro Arg Pro Gly Gly Arg Tyr Arg  
 20 25 30  
 Pro Gly Tyr Gly Thr Gly Tyr Phe Gln Tyr Gly Leu Pro Asp Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Asp Pro Tyr Tyr Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Val Gln Lys Met Ser  
 50 55 60  
 Met Tyr Asn Leu Arg Cys Ala Ala Glu Glu Asn Cys Leu Ala Ser Thr  
 65 70 75 80  
 Ala Tyr Arg Ala Asp Val Arg Asp Tyr Asp His Arg Val Leu Leu Arg  
 85 90 95  
 Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln Gly Thr Ser Asp Phe Leu Pro Ser  
 100 105 110  
 Arg Pro Arg Tyr Ser Trp Glu Trp His Ser Cys His Gln His Tyr His  
 115 120 125

ES 2 700 141 T3

Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr Asp Leu Leu Asp Ala Asn Thr Gln  
 130 135 140

Arg Arg Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr  
 145 150 155 160

Ser Cys Asp Tyr Gly Tyr His Arg Arg Phe Ala Cys Thr Ala His Thr  
 165 170 175

Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr Asp Thr Tyr Gly Ala Asp Ile Asp  
 180 185 190

Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Lys Pro Gly Asn Tyr Ile Leu  
 195 200 205

Lys Val Ser Val Asn Pro Ser Tyr Leu Val Pro Glu Ser Asp Tyr Thr  
 210 215 220

Asn Asn Val Val Arg Cys Asp Ile Arg Tyr Thr Gly His His Ala Tyr  
 225 230 235 240

Ala Ser Gly Cys Thr Ile Ser Pro Tyr  
 245

<210> 10

<211> 1604

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> base modificada

<222> (1530)..(1530)

<223> a, c, g, t, desconocidos u otros

10 <400> 10

ES 2 700 141 T3

gggcgtgatt tgagccccgt ttttattttc tgtgagccac gtccctcctcg aggggggtaa 60  
 tctggccaaa aggagtgatg cgcttcgcct ggaccgtgct cctgctcggg cctttgcagc 120  
 tctgcgcgct agtgcaactgc gcccctcccg ccgccggcca acagcagccc ccgcgcgagc 180  
 cgccggcggc tccggggcgc tggcgccagc agatccaatg ggagaacaac gggcaggtgt 240  
 tcagcttgct gagcctgggc tcacagtacc agcctcagcg ccgccgggac ccggggcgccg 300  
 ccgtccctgg tgcagccaac gcctccgccc agcagccccg cactccgatc ctgctgatcc 360  
 gcgacaaccg caccgcccgc gcgcgaacgc ggacggccgg ctcatctgga gtcaccgctg 420  
 gccgccccag gccaccgcc cgctcactggt tccaagctgg ctactcgaca tctagagccc 480  
 gcgaacgtgg cgcctcgcgc gcggagaacc agacagcgcc gggagaagt cctgcgctca 540  
 gtaacctgcg gccgcccagc cgcgtggacg gcatggtggg cgacgaccct tacaaccct 600  
 acaagtactc tgacgacaac ccttattaca actactacga tacttatgaa aggccagac 660  
 ctgggggagc gtaccggccc ggatacggca ctggctactt ccagtacggt ctcccagacc 720  
 tgggtggcga cccctactac atccaggcgt ccacgtacgt gcagaagatg tccatgtaca 780  
 acctgagatg cgcggcggag gaaaactgtc tggccagtac agcatacagg gcagatgtca 840  
 gagattatga tcacaggggtg ctgctcagat ttccccaaag agtgaaaaac caagggacat 900  
 cagatttctt acccagccga ccaagatatt cctgggaatg gcacagttgt catcaacatt 960  
 accacagtat ggatgagttt agccactatg acctgcttga tgccaacacc cagaggagag 1020  
 tggctgaagg ccacaaagca agtttctgtc ttgaagacac atcctgtgac tatggctacc 1080  
 acagcgcatt tgcatgtact gcacacacac agggattgag tcctggctgt tatgatacct 1140  
 atggtgcaga catagactgc cagtggattg atattacaga tgtaaaacct ggaaactata 1200  
 tcctaaaggt cagtgtaac cccagctacc tggttcctga atctgactat accaacaatg 1260  
 ttgtgcgctg tgacattcgc tacacaggac atcatgcgta tgcctcaggc tgcacaattt 1320  
 caccgtatta gaaggcaaag caaaactccc aatggataaa tcagtgcctg gtgttctgaa 1380  
 gtgggaaaaa atagactaac ttcagtagga tttatgtatt ttgaaaaaga gaacagaaaa 1440  
 caacaaaaga atttttgttt ggactgtttt caataacaaa gcacataact ggattttgaa 1500  
 cgcttaagtc aatcattact tggaaattn taatgtttat tatttacatc aactttgtga 1560  
 attaacacag tgtttcaatt ctgtaatttc atatttgact cttt 1604

<210> 11

<211> 417

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

ES 2 700 141 T3

Met Arg Phe Ala Trp Thr Val Leu Leu Leu Gly Pro Leu Gln Leu Cys  
 1 5 10 15

Ala Leu Val His Cys Ala Pro Pro Ala Ala Gly Gln Gln Gln Pro Pro  
 20 25 30

Arg Glu Pro Pro Ala Ala Pro Gly Ala Trp Arg Gln Gln Ile Gln Trp  
 35 40 45

Glu Asn Asn Gly Gln Val Phe Ser Leu Leu Ser Leu Gly Ser Gln Tyr  
 50 55 60

Gln Pro Gln Arg Arg Arg Asp Pro Gly Ala Ala Val Pro Gly Ala Ala  
 65 70 75 80

Asn Ala Ser Ala Gln Gln Pro Arg Thr Pro Ile Leu Leu Ile Arg Asp  
 85 90 95

Asn Arg Thr Ala Ala Ala Arg Thr Arg Thr Ala Gly Ser Ser Gly Val



ES 2 700 141 T3

Val Lys Pro Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val Ser Val Asn Pro Ser Tyr  
370 375 380

Leu Val Pro Glu Ser Asp Tyr Thr Asn Asn Val Val Arg Cys Asp Ile  
385 390 395 400

Arg Tyr Thr Gly His His Ala Tyr Ala Ser Gly Cys Thr Ile Ser Pro  
405 410 415

Tyr

<210> 12

<211> 1254

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 700 141 T3

atgcgcttcg cctggaccgt gctcctgctc gggcctttgc agctctgctc gctagtgcac 60  
 tgcgcccctc ccgcccggcg ccaacagcag cccccgcgag agcccgggc ggctccgggc 120  
 gcctggcgcc agcagatcca atgggagaac aacgggcagg tggtcagctt gctgagcctg 180  
 ggctcacagt accagcctca gcgcccggcg gaccggggcg ccgccgtccc tgggtgcagcc 240  
 aacgcctccg cccagcagcc ccgcactccg atcctgctga tccgcgacaa ccgcaccgcc 300  
 gcggcgcgaa cgcggacggc cggctcatct ggagtcaccg ctggccgccc caggcccacc 360  
 gccgctcact ggttccaagc tggctactcg acatctagag cccgcgaacg tggcgctcctg 420  
 cgcgcggaga accagacagc gccgggagaa gttcctgctc tcagtaacct gcggcccgcc 480  
 agccgcgtgg acggcatggt gggcgacgac cttacaacc cctacaagta ctctgacgac 540  
 aacccttatt acaactacta cgatacttat gaaaggcca gacctggggg caggtaccgg 600  
 cccggatacg gcaactgcta cttccagtac ggtctccag acctggtggc cgaccctac 660  
 tacatccagg cgtccacgta cgtgcagaag atgtccatgt acaacctgag atgcgcccgcg 720  
 gaggaaaact gtctggccag tacagcatac agggcagatg tcagagatta tgatcacagg 780  
 gtgctgctca gatttcccca aagagtgaaa aaccaagga catcagattt cttaccagc 840  
 cgaccaagat attcctggga atggcacagt tgtcatcaac attaccacag tatggatgag 900  
 tttagccaact atgacctgct tgatgccaac acccagagga gagggtgta aggccacaaa 960  
 gcaagtttct gtcttgaaga cacatcctgt gactatggct acccagggcg atttgcatgt 1020  
 actgcacaca cacagggatt gagtctggc tgttatgata cctatggtgc agacatagac 1080  
 tgccagtgga ttgatattac agatgtaaaa cctggaaact ataccctaa ggtcagtgta 1140  
 aaccccagct acctggttcc tgaatctgac tataccaaca atgttgtgag ctgtgacatt 1200  
 cgctacacag gacatcatgc gtatgcctca ggctgcacaa tttcaccgta ttag 1254

<210> 13

<211> 417

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 700 141 T3

Met Arg Phe Ala Trp Thr Val Leu Leu Leu Gly Pro Leu Gln Leu Cys  
1 5 10 15

Ala Leu Val His Cys Ala Pro Pro Ala Ala Gly Gln Gln Gln Pro Pro  
20 25 30

Arg Glu Pro Pro Ala Ala Pro Gly Ala Trp Arg Gln Gln Ile Gln Trp  
35 40 45

Glu Asn Asn Gly Gln Val Phe Ser Leu Leu Ser Leu Gly Ser Gln Tyr  
50 55 60

Gln Pro Gln Arg Arg Arg Asp Pro Gly Ala Ala Val Pro Gly Ala Ala  
65 70 75 80

Asn Ala Ser Ala Gln Gln Pro Arg Thr Pro Ile Leu Leu Ile Arg Asp  
85 90 95

Asn Arg Thr Ala Ala Ala Arg Thr Arg Thr Ala Gly Ser Ser Gly Val  
100 105 110

Thr Ala Gly Arg Pro Arg Pro Thr Ala Arg His Trp Phe Gln Ala Gly  
115 120 125

Tyr Ser Thr Ser Arg Ala Arg Glu Arg Gly Ala Ser Arg Ala Glu Asn  
130 135 140

Gln Thr Ala Pro Gly Glu Val Pro Ala Leu Ser Asn Leu Arg Pro Pro  
145 150 155 160

Ser Arg Val Asp Gly Met Val Gly Asp Asp Pro Tyr Asn Pro Tyr Lys  
165 170 175

Tyr Ser Asp Asp Asn Pro Tyr Tyr Asn Tyr Tyr Asp Thr Tyr Glu Arg  
180 185 190

Pro Arg Pro Gly Gly Arg Tyr Arg Pro Gly Tyr Gly Thr Gly Tyr Phe  
195 200 205

Gln Tyr Gly Leu Pro Asp Leu Val Ala Asp Pro Tyr Tyr Ile Gln Ala  
210 215 220

Ser Thr Tyr Val Gln Lys Met Ser Met Tyr Asn Leu Arg Cys Ala Ala

ES 2 700 141 T3

225					230						235					240
Glu	Glu	Asn	Cys	Leu	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Arg	Ala	Asp	Val	Arg	Asp	
				245					250						255	
Tyr	Asp	His	Arg	Val	Leu	Leu	Arg	Phe	Pro	Gln	Arg	Val	Lys	Asn	Gln	
			260					265					270			
Gly	Thr	Ser	Asp	Phe	Leu	Pro	Ser	Arg	Pro	Arg	Tyr	Ser	Trp	Glu	Trp	
		275					280					285				
His	Ser	Cys	His	Gln	His	Tyr	His	Ser	Met	Asp	Glu	Phe	Ser	His	Tyr	
	290					295					300					
Asp	Leu	Leu	Asp	Ala	Asn	Thr	Gln	Arg	Arg	Val	Ala	Glu	Gly	His	Lys	
305					310					315					320	
Ala	Ser	Phe	Cys	Leu	Glu	Asp	Thr	Ser	Cys	Asp	Tyr	Gly	Tyr	His	Arg	
				325					330					335		
Arg	Phe	Ala	Cys	Thr	Ala	His	Thr	Gln	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	Cys	Tyr	
			340					345					350			
Asp	Thr	Tyr	Gly	Ala	Asp	Ile	Asp	Cys	Gln	Trp	Ile	Asp	Ile	Thr	Asp	
		355					360					365				
Val	Lys	Pro	Gly	Asn	Tyr	Ile	Leu	Lys	Val	Ser	Val	Asn	Pro	Ser	Tyr	
	370					375					380					
Leu	Val	Pro	Glu	Ser	Asp	Tyr	Thr	Asn	Asn	Val	Val	Arg	Cys	Asp	Ile	
385					390					395					400	
Arg	Tyr	Thr	Gly	His	His	Ala	Tyr	Ala	Ser	Gly	Cys	Thr	Ile	Ser	Pro	
				405					410					415		

Tyr

<210> 14

<211> 1780

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 14

ES 2 700 141 T3

gggccaggac tgagaaaggg gaaaggggaag ggtgccacgt ccgagcagcc gccttgactg 60  
 ggggaagggtc tgaatcccac ccttggcatt gcttgggtgga gactgagata cccgtgctcc 120  
 gctcgcctcc ttggttgaag atttctcctt ccctcacgtg atttgagccc cgttttttatt 180  
 ttctgtgagc cacgtcctcc tcgagcgggg tcaatctggc aaaaggagtg atgcgcttcg 240  
 cctggaccgt gctcctgctc gggcctttgc agctctgcgc gctagtgcac tgcgcccctc 300  
 ccgcccggc ccaacagcag cccccgcgcg agccgcccgc ggtccgggc gcctggcgcc 360  
 agcagatcca atgggagaac aacgggcagg tgttcagctt gctgagcctg ggctcacagt 420  
 accagcctca gcgcccggc gaccggggcg ccgcccctcc tggcgcagcc aacgcctccg 480  
 cccagcagcc ccgcactccg atcctgctga tccgcgacaa ccgcaccgcc gcggggcgaa 540  
 cgcggacggc cggctcatct ggagtcaccg ctggccgccc caggcccacc gcccgctcact 600  
 ggttccaagc tggctactcg acatctagag cccgcgaagc tgggccctcg cgcgcggaga 660  
 accagacagc gccgggagaa gttcctgctc tcagtaacct gcggccgcc agccgcgtgg 720  
 acggcatggt gggcgacgac cttacaacc cctacaagta ctctgacgac aacccttatt 780  
 acaactacta cgatacttat gaaaggccca gacctggggg caggtaccgg cccggatacg 840  
 gcactggcta cttccagtac ggtctcccag acctggtggc cgaccccctac tacatccagg 900  
 cgtccacgta cgtgcagaag atgtccatgt acaacctgag atgcgcggcg gaggaaaact 960  
 gtctggccag tacagcatac agggcagatg tcagagatta tgatcacagg gtgctgctca 1020  
 gatttcccc aagagtgaaa aaccaagga catcagattt cttaccagc cgaccaagat 1080  
 attcctggga atggcacagt tgtcatcaac attaccacag tatggatgag tttagccact 1140  
 tgtacctgct tgatgccaac acccagagga gatgggctga aggccacaaa gcaagtttct 1200  
 gtcttgaaga cacatcctgt gactatggct accacaggcg atttgcatgt actgcacaca 1260  
 cacagggatt gagtcctggc tgttatgata cctatggtgc agacatagac tgccagtgga 1320  
 ttgatattac agatgtaaaa cctggaaact atatcctaaa ggtcagtgta aaccccagct 1380  
 acctggttcc tgaatctgac tataccaaca atgttgtgcg ctgtgacatt cgctacacag 1440  
 gacatcatgc gtatgcctca ggctgcacaa tttcaccgta ttagaaggca aagcaaaaact 1500  
 cccaatggat aatcagtgcc ctggtgttct gaagtgggaa aaaatagact aacttcagta 1560  
 ggatttatgt attttgaaaa agagaacaga aaacaacaaa agaatttttg tttggactgt 1620  
 tttcaataac aaagcacata actggatttt gaacgcttaa gtcatcatta cttgggaaat 1680  
 ttttaatggt tattatttac atcactttgt gaattaacac agtgtttcaa ttctgtaatt 1740  
 acatatttga ctctttcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1780

<210> 15

<211> 417



ES 2 700 141 T3

Arg Glu Pro Pro Ala Ala Pro Gly Ala Trp Arg Gln Gln Ile Gln Trp  
35 40 45

Glu Asn Asn Gly Gln Val Phe Ser Leu Leu Ser Leu Gly Ser Gln Tyr  
50 55 60

Gln Pro Gln Arg Arg Arg Asp Pro Gly Ala Ala Val Pro Gly Ala Ala  
65 70 75 80

Asn Ala Ser Ala Gln Gln Pro Arg Thr Pro Ile Leu Leu Ile Arg Asp  
85 90 95

Asn Arg Thr Ala Ala Gly Arg Thr Arg Thr Ala Gly Ser Ser Gly Val  
100 105 110

Thr Ala Gly Arg Pro Arg Pro Thr Ala Arg His Trp Phe Gln Ala Gly  
115 120 125

Tyr Ser Thr Ser Arg Ala Arg Glu Ala Gly Pro Ser Arg Ala Glu Asn  
130 135 140

Gln Thr Ala Pro Gly Glu Val Pro Ala Leu Ser Asn Leu Arg Pro Pro  
145 150 155 160

Ser Arg Val Asp Gly Met Val Gly Asp Asp Pro Tyr Asn Pro Tyr Lys  
165 170 175

Tyr Ser Asp Asp Asn Pro Tyr Tyr Asn Tyr Tyr Asp Thr Tyr Glu Arg  
180 185 190

Pro Arg Pro Gly Gly Arg Tyr Arg Pro Gly Tyr Gly Thr Gly Tyr Phe  
195 200 205

Gln Tyr Gly Leu Pro Asp Leu Val Ala Asp Pro Tyr Tyr Ile Gln Ala  
210 215 220

Ser Thr Tyr Val Gln Lys Met Ser Met Tyr Asn Leu Arg Cys Ala Ala  
225 230 235 240

Glu Glu Asn Cys Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Arg Ala Asp Val Arg Asp  
245 250 255

Tyr Asp His Arg Val Leu Leu Arg Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln  
260 265 270

Gly Thr Ser Asp Phe Leu Pro Ser Arg Pro Arg Tyr Ser Trp Glu Trp  
275 280 285

ES 2 700 141 T3

His Ser Cys His Gln His Tyr His Ser Met Asp Glu Phe Ser His Leu  
 290 295 300

Tyr Leu Leu Asp Ala Asn Thr Gln Arg Arg Trp Ala Glu Gly His Lys  
 305 310 315 320

Ala Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr Ser Cys Asp Tyr Gly Tyr His Arg  
 325 330 335

Arg Phe Ala Cys Thr Ala His Thr Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr  
 340 345 350

Asp Thr Tyr Gly Ala Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp  
 355 360 365

Val Lys Pro Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val Ser Val Asn Pro Ser Tyr  
 370 375 380

Leu Val Pro Glu Ser Asp Tyr Thr Asn Asn Val Val Arg Cys Asp Ile  
 385 390 395 400

Arg Tyr Thr Gly His His Ala Tyr Ala Ser Gly Cys Thr Ile Ser Pro  
 405 410 415

Tyr

<210> 16

<211> 1935

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 16

ES 2 700 141 T3

ccgcgcccgt	ccccgttgcc	ttccaggact	gagaaagggg	aaaggggaag	gtgccacgtc	60
cgagcagccg	ccttgactgg	ggaaggggtct	gaatcccacc	cttggcattg	cctggtggag	120
actgagatac	ccgtgctccg	ctcgcctcct	tggttgaaga	tttctccttc	cctcacgtga	180
tttgagcccc	gtttttattt	tctgtgagcc	acgtcctcct	cgagcggggg	caatctggca	240
aaaggagtga	tgcgcttcgc	ctggaccgtg	ctcctgctcg	ggcctttgca	gctctgcgcg	300
ctagtgcact	gcgcccctcc	cgccgcccgg	caacagcagc	ccccgcgcga	gccgcccggc	360
gctccggggc	cctggcgcca	gcagatccaa	tgggagaaca	acgggcaggt	gttcagcttg	420
ctgagcctgg	gctcacagta	ccagcctcag	cgccgcccgg	acccgggcgc	cgccgtccct	480
ggtgcagcca	acgcctccgc	ccagcagccc	cgcaactccga	tcctgctgat	ccgcgacaac	540
cgcaccgccg	cggcgcgaac	gcggaaggcc	ggctcatctg	gagtcaccgc	tggccgcccc	600
aggcccaccg	cccgtcactg	gttccaagct	ggctactcga	catctagagc	ccgcgaagct	660

ES 2 700 141 T3

ggcgcctcgc gcgcggagaa ccagacagcg ccgggagaag ttcctgcgct cagtaacctg 720  
 cggccgcccga gccgcgtgga cggcatgggtg ggcgacgacc cttacaaccc ctacaagtac 780  
 tctgacgaca acccttatta caactactac gatacttatg aaaggcccag acctgggggc 840  
 aggtaccggc ccggatacgg cactggctac ttccagtacg gtctcccaga cctgggtggcc 900  
 gaccctact acatccaggc gtccacgtac gtgcagaaga tgtccatgta caacctgaga 960  
 tgcgcggcgg aggaaaactg tctggccagt acagcataca gggcagatgt cagagattat 1020  
 gatcacaggg tgctgctcag atttcccaa agagtgaaaa accaaggac atcagatttc 1080  
 ttaccagcc gaccaagata ttcctgggaa tggcacagtt gtcacaca ttaccacagt 1140  
 atggatgagt ttagccacta tgacctgctt gatgccaca cccagaggag agtggctgaa 1200  
 ggccacaaag caagtttctg tcttgaagac acatcctgtg actatggcta ccacaggcga 1260  
 tttgcatgta ctgcacacac acagggattg agtcctggct gttatgatac ctatggtgca 1320  
 gacatagact gccagtgat tgatattaca gatgtaaaac ctggaaacta taccctaaag 1380  
 gtcagtgtaa accccagcta cctggttcct gaatctgact ataccaaca tgttgtgcgc 1440  
 tgtgacattc gctacacagg acatcatgcg tatgcctcag gctgcacaat ttcaccgtat 1500  
 tagaaggcaa agcaaaactc ccaatggata aatcagtgcc tgggtgttctg aagtgggaaa 1560  
 aatagacta acttcagtag gatttatgta ttttgaaaa gagaacagaa aacaacaaaa 1620  
 gaatTTTTgt ttggactggt ttcaataaca aagcacataa ctggattttg aacgcttaag 1680  
 tcatcattac ttgggaaatt tttaatgttt attatttaca tcactttgtg aattaacaca 1740  
 gtgtttcaat tctgtaatta catatttgac tctttcaaag aaatccaaat ttctcatggt 1800  
 ccttttgaaa ttgtagtgca aaatggtcag tattatctaa atgaatgagc caaaatgact 1860  
 ttgaactgaa acttttctaa agtgctggaa ctttagtgaa acataataat aatgggttta 1920  
 tacgacagca acgga 1935

<210> 17

<211> 417

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 17

ES 2 700 141 T3

Met Arg Phe Ala Trp Thr Val Leu Leu Leu Gly Pro Leu Gln Leu Cys  
1 5 10 15

Ala Leu Val His Cys Ala Pro Pro Ala Ala Gly Gln Gln Gln Pro Pro  
20 25 30

Arg Glu Pro Pro Ala Ala Pro Gly Ala Trp Arg Gln Gln Ile Gln Trp  
35 40 45

Glu Asn Asn Gly Gln Val Phe Ser Leu Leu Ser Leu Gly Ser Gln Tyr  
50 55 60

ES 2 700 141 T3

Gln Pro Gln Arg Arg Arg Asp Pro Gly Ala Ala Val Pro Gly Ala Ala  
65 70 75 80

Asn Ala Ser Ala Gln Gln Pro Arg Thr Pro Ile Leu Leu Ile Arg Asp  
85 90 95

Asn Arg Thr Ala Ala Ala Arg Thr Arg Thr Ala Gly Ser Ser Gly Val  
100 105 110

Thr Ala Gly Arg Pro Arg Pro Thr Ala Arg His Trp Phe Gln Ala Gly  
115 120 125

Tyr Ser Thr Ser Arg Ala Arg Glu Ala Gly Ala Ser Arg Ala Glu Asn  
130 135 140

Gln Thr Ala Pro Gly Glu Val Pro Ala Leu Ser Asn Leu Arg Pro Pro  
145 150 155 160

Ser Arg Val Asp Gly Met Val Gly Asp Asp Pro Tyr Asn Pro Tyr Lys  
165 170 175

Tyr Ser Asp Asp Asn Pro Tyr Tyr Asn Tyr Tyr Asp Thr Tyr Glu Arg  
180 185 190

Pro Arg Pro Gly Gly Arg Tyr Arg Pro Gly Tyr Gly Thr Gly Tyr Phe  
195 200 205

Gln Tyr Gly Leu Pro Asp Leu Val Ala Asp Pro Tyr Tyr Ile Gln Ala  
210 215 220

Ser Thr Tyr Val Gln Lys Met Ser Met Tyr Asn Leu Arg Cys Ala Ala  
225 230 235 240

Glu Glu Asn Cys Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Arg Ala Asp Val Arg Asp  
245 250 255

Tyr Asp His Arg Val Leu Leu Arg Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln  
260 265 270

Gly Thr Ser Asp Phe Leu Pro Ser Arg Pro Arg Tyr Ser Trp Glu Trp  
275 280 285

His Ser Cys His Gln His Tyr His Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr  
290 295 300

Asp Leu Leu Asp Ala Asn Thr Gln Arg Arg Val Ala Glu Gly His Lys  
305 310 315 320

ES 2 700 141 T3

Ala Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr Ser Cys Asp Tyr Gly Tyr His Arg  
325 330 335

Arg Phe Ala Cys Thr Ala His Thr Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr  
340 345 350

Asp Thr Tyr Gly Ala Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp  
355 360 365

Val Lys Pro Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val Ser Val Asn Pro Ser Tyr  
370 375 380

Leu Val Pro Glu Ser Asp Tyr Thr Asn Asn Val Val Arg Cys Asp Ile  
385 390 395 400

Arg Tyr Thr Gly His His Ala Tyr Ala Ser Gly Cys Thr Ile Ser Pro  
405 410 415

Tyr

<210> 18

<211> 1322

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 18

ES 2 700 141 T3

ggtcaatctg gcaaaaggag tgatgcgctt cgcttgacc gtgctcctgc tcgggccttt 60  
 gcagctctgc gcgctagtgc actgcgcccc tcccgccgcc ggccaacagc agccccgcg 120  
 cgagccgcg gcggctccgg gcgcctggcg ccagcagatc caatgggaga acaacgggca 180  
 ggtgttcagc ttgctgagcc tgggctcaca gtaccagcct cagcgccgcc gggacccggg 240  
 cgccgcgctc cctggtgcag ccaacgcctc cgcccagcag ccccgactc cgatcctgct 300  
 gatccgcgac aaccgcaccg ccgcgccgcg aacgcggacg gccggctcat ctggagtcac 360  
 cgctggccgc cccaggccca ccgcccgtca ctggttccaa gctggctact cgacatctag 420  
 agcccgcgaa gctggcgcct cgcgcgcgga gaaccagaca gcgccgggag aagttcctgc 480  
 gctcagtaac ctgcccgcgc ccagccgcgt ggacggcatg gtgggcgacg acccttacia 540  
 cccctacaag tactctgacg acaaccctta ttacaactac tacgatactt atgaaaggcc 600  
 cagacctggg ggcaggtacc ggccccgata cggcactggc tacttccagt acggtctccc 660  
 agacctggtg gccgaccctt actacatcca ggcgtccacg tacgtgcaga agatgtccat 720  
 gtacaacctg agatgcgcgg cggaggaaaa ctgtctggcc agtacagcat acagggcaga 780  
 tgtcagagat tatgatcaca ggggtgctgct cagatttccc caaagagtga aaaaccaagg 840  
 gacatcagat ttcttaccba gccgaccaag atattcctgg gaatggcaca gttgtcatca 900  
 acattaccac agtatggatg agtttagcca ctatgacctg cttgatgcca acaccagag 960  
 gagagtggct gaaggccaca aagcaagttt ctgtcttgaa gacacatcct gtgactatgg 1020  
 ctaccacagg cgatttgcat gtactgcaca cacacagga ttgagtcctg gctgttatga 1080  
 tacctatggt gcagacatag actgccagtg gattgatatt acagatgtaa aacctggaaa 1140  
 ctatatccta aaggctcagt taaaccccag ctacctggtt cctgaatctg actataccaa 1200  
 caatgttgtg cgctgtgaca ttcgctacac aggacatcat gcgtatgcct caggctgcac 1260  
 aatttcaccg tattagaagg caaagcaaaa ctcccaatgg ataaatcagt gcctgggtgtt 1320  
 ct 1322

<210> 19

<211> 417

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

ES 2 700 141 T3

Met Arg Phe Ala Trp Thr Val Leu Leu Leu Gly Pro Leu Gln Leu Cys  
1 5 10 15

Ala Leu Val His Cys Ala Pro Pro Ala Ala Gly Gln Gln Gln Pro Pro  
20 25 30

Arg Glu Pro Pro Ala Ala Pro Gly Ala Trp Arg Gln Gln Ile Gln Trp  
35 40 45

Glu Asn Asn Gly Gln Val Phe Ser Leu Leu Ser Leu Gly Ser Gln Tyr  
50 55 60

Gln Pro Gln Arg Arg Arg Asp Pro Gly Ala Ala Val Pro Gly Ala Ala  
65 70 75 80

Asn Ala Ser Ala Gln Gln Pro Arg Thr Pro Ile Leu Leu Ile Arg Asp  
85 90 95

Asn Arg Thr Ala Ala Ala Arg Thr Arg Thr Ala Gly Ser Ser Gly Val  
100 105 110

Thr Ala Gly Arg Pro Arg Pro Thr Ala Arg His Trp Phe Gln Ala Gly  
115 120 125

Tyr Ser Thr Ser Arg Ala Arg Glu Ala Gly Ala Ser Arg Ala Glu Asn  
130 135 140

Gln Thr Ala Pro Gly Glu Val Pro Ala Leu Ser Asn Leu Arg Pro Pro  
145 150 155 160

Ser Arg Val Asp Gly Met Val Gly Asp Asp Pro Tyr Asn Pro Tyr Lys  
165 170 175

ES 2 700 141 T3

Tyr Ser Asp Asp Asn Pro Tyr Tyr Asn Tyr Tyr Asp Thr Tyr Glu Arg  
 180 185 190  
 Pro Arg Pro Gly Gly Arg Tyr Arg Pro Gly Tyr Gly Thr Gly Tyr Phe  
 195 200 205  
 Gln Tyr Gly Leu Pro Asp Leu Val Ala Asp Pro Tyr Tyr Ile Gln Ala  
 210 215 220  
 Ser Thr Tyr Val Gln Lys Met Ser Met Tyr Asn Leu Arg Cys Ala Ala  
 225 230 235 240  
 Glu Glu Asn Cys Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Arg Ala Asp Val Arg Asp  
 245 250 255  
 Tyr Asp His Arg Val Leu Leu Arg Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln  
 260 265 270  
 Gly Thr Ser Asp Phe Leu Pro Ser Arg Pro Arg Tyr Ser Trp Glu Trp  
 275 280 285  
 His Ser Cys His Gln His Tyr His Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr  
 290 295 300  
 Asp Leu Leu Asp Ala Asn Thr Gln Arg Arg Val Ala Glu Gly His Lys  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr Ser Cys Asp Tyr Gly Tyr His Arg  
 325 330 335  
 Arg Phe Ala Cys Thr Ala His Thr Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr  
 340 345 350  
 Asp Thr Tyr Gly Ala Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp  
 355 360 365  
 Val Lys Pro Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val Ser Val Asn Pro Ser Tyr  
 370 375 380  
 Leu Val Pro Glu Ser Asp Tyr Thr Asn Asn Val Val Arg Cys Asp Ile  
 385 390 395 400  
 Arg Tyr Thr Gly His His Ala Tyr Ala Ser Gly Cys Thr Ile Ser Pro  
 405 410 415  
 Tyr

ES 2 700 141 T3

<210> 20

<211> 1325

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 20

```

ggtcaatctg gcaaaaggag tgatgcgctt cgcctggacc gtgctcctgc tcgggccttt      60
gcagctctgc gcgctagtgc actgcgcccc tcccgcgcgc ggccaacagc agcccccgcg      120
cgagccgccg gcggctccgg gcgcctggcg ccagcagatc caatgggaga acaacgggca      180
ggtgttcagc ttgctgagcc tgggctcaca gtaccagcct cagcgcgcgc gggaccocggg      240
cgccgcgcgc cctggtgcag ccaacgcctc cgcccagcag ccccgcactc cgatcctgct      300
gatccgcgac aaccgcaccg ccgcggcgcg aacgcggacg gccggctcat ctggagtca      360
cgctggccgc cccaggccca ccgcccgctc ctggttccaa gctggctact cgacatctag      420
agcccgcgaa gctggcgcct cgcgcgcgga gaaccagaca gcgccgggag aagttcctgc      480
gctcagtaac ctgcggccgc ccagccgcgt ggacggcatg gtgggcgacg acccttacia      540
cccctacaag tactctgacg acaaccctta ttacaactac tacgatactt atgaaaggcc      600
cagacctggg ggcaggtacc ggcccggata cggcactggc tacttccagt acggtctccc      660
agacctggtg gccgaccctt actacatcca ggcgtccacg tacgtgcaga agatgtccat      720
gtacaacctg agatgcgcgg cggaggaaaa ctgtctggcc agtacagcat acagggcaga      780
tgtcagagat tatgatcaca gggtgctgct cagatttccc caaagagtga aaaaccaagg      840
gacatcagat ttcttaccca gccgaccaag atattcctgg gaatggcaca gttgtcatca      900
acattaccac agtatggatg agtttagcca ctatgacctg cttgatgcca acaccagag      960
gagagtggct gaaggccaca aagcaagttt ctgtcttgaa gacacatcct gtgactatgg     1020
ctaccacagg cgatttgcat gtactgcaca cacacagga ttgagtcctg gctggtatga     1080
tacctatggt gcagacatag actgccagtg gattgatatt acagatgtaa aacctggaaa     1140
ctatatccta aaggctcagt taaaccccag ctacctggtt cctgaatctg actataccaa     1200
caatgttgtg cgctgtgaca ttcgctacac aggacatcat gcgtatgcct caggctgcac     1260
aatttcaccg tattagaagg caaagcaaaa ctcccaatgg ataaatcagt gcctggtggt     1320
ctgaa                                             1325

```

<210> 21

<211> 407

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 21

ES 2 700 141 T3

Met Arg Phe Ala Trp Thr Val Leu Leu Leu Gly Pro Leu Gln Ieu Cys  
1 5 10 15

Ala Leu Val His Cys Ala Pro Pro Ala Ala Gly Gln Gln Gln Pro Pro



ES 2 700 141 T3

His Ser Cys His Gln His Tyr His Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr  
 290 295 300

Asp Leu Leu Asp Ala Asn Thr Gln Arg Arg Val Ala Glu Gly His Lys  
 305 310 315 320

Ala Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr Ser Cys Asp Tyr Gly Tyr His Arg  
 325 330 335

Arg Phe Ala Cys Thr Ala His Thr Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Gln  
 340 345 350

Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Lys Pro Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val  
 355 360 365

Ser Val Asn Pro Ser Tyr Leu Val Pro Glu Ser Asp Tyr Thr Asn Asn  
 370 375 380

Val Val Arg Cys Asp Ile Arg Tyr Thr Gly His His Ala Tyr Ala Ser  
 385 390 395 400

Gly Cys Thr Ile Ser Pro Tyr  
 405

<210> 22

<211> 842

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 22

ES 2 700 141 T3

gttcagcttg ctgagcctgg gctcacagta ccagcctcag cgccgccggg acccgggcgc 60  
 cgccgtccct ggtgcagcca acgcctccgc ccagcagccc cgcactccga tcctgctgat 120  
 ccgcgacaac cgcaccgccg cggcgcgaac gcggacggcc ggctcatctg gagtcaccgc 180  
 tggccgcccc aggccaccg cccgtcactg gttccaagct ggctactcga catctagagc 240  
 ccgcgaagct ggcgcctcgc gcgcggagaa ccagacagcg ccgggagaag ttctgctgct 300  
 cagtaacctg cggccgcca gccgcgtgga cggcatggtg ggcgacgacc cttacaacc 360  
 ctacaagtac tctgacgaca acccttatta caactactac gatacttatg aaaggccag 420  
 acctgggggc aggtaccggc ccggatacgg cactggctac ttccagtacg gtaagtaccc 480  
 ccaagtccgc tggaagcacc cgtgcacctg gtcccagct atgtggcttc ttctcgacgt 540  
 ggctgcctgg gcgcggcggg ccccggctct cgcagatccg acccctcccc acgcgcctgc 600  
 agtggcagcc ctggaatcca gtgcaaaccg cgcgtctggc ccctcctgct tccttttcac 660  
 attgctttgc agtcccggg gtccccagtt ctcttgctgt cctccgctcc actctgcagt 720  
 cccggtgggc gaagggtag gagtaagga cctagagggg tagggagttg gagcgggggg 780  
 cgccgggttg tttcactgct gcgccctcg cctgctgacg tttaggtctc ccagacctgg 840

tg 842

<210> 23

<211> 162

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

ES 2 700 141 T3

Phe Ser Leu Leu Ser Leu Gly Ser Gln Tyr Gln Pro Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10 15

Asp Pro Gly Ala Ala Val Pro Gly Ala Ala Asn Ala Ser Ala Gln Gln  
 20 25 30

Pro Arg Thr Pro Ile Leu Leu Ile Arg Asp Asn Arg Thr Ala Ala Ala  
 35 40 45

Arg Thr Arg Thr Ala Gly Ser Ser Gly Val Thr Ala Gly Arg Pro Arg  
 50 55 60

Pro Thr Ala Arg His Trp Phe Gln Ala Gly Tyr Ser Thr Ser Arg Ala  
 65 70 75 80

Arg Glu Ala Gly Ala Ser Arg Ala Glu Asn Gln Thr Ala Pro Gly Glu  
 85 90 95

Val Pro Ala Leu Ser Asn Leu Arg Pro Pro Ser Arg Val Asp Gly Met  
 100 105 110

Val Gly Asp Asp Pro Tyr Asn Pro Tyr Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Pro  
 115 120 125

Tyr Tyr Asn Tyr Tyr Asp Thr Tyr Glu Arg Pro Arg Pro Gly Gly Arg  
 130 135 140

Tyr Arg Pro Gly Tyr Gly Thr Gly Tyr Phe Gln Tyr Gly Leu Pro Asp  
 145 150 155 160

Leu Val

<210> 24

<211> 135

<212> PRT

5 <213> Mus sp.

<400> 24

Met Glu Trp Ser Arg Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly  
 1 5 10 15

ES 2 700 141 T3

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg  
 20 25 30

Pro Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe  
 35 40 45

Thr Tyr Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn  
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val  
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Asn Trp Asn Met Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 115 120 125

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 130 135

<210> 25

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 25

ES 2 700 141 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Tyr Tyr  
 20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 26

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 26

ES 2 700 141 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Tyr Tyr  
 20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 27

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 27

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

ES 2 700 141 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Tyr Tyr  
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 28

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 28

ES 2 700 141 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Tyr Tyr  
 20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 29

<211> 132

5 <212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 29

ES 2 700 141 T3

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro  
1 5 10 15

Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ser  
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser  
35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg  
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala  
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe  
85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr  
100 105 110

Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
115 120 125

Leu Glu Ile Lys  
130

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 30

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

ES 2 700 141 T3

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 31

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 31

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

ES 2 700 141 T3

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 32

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 33

10 <211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

15 <400> 33

ES 2 700 141 T3

Met Glu Trp Ser Arg Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly  
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg  
20 25 30

Pro Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
35 40

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 34

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
1 5 10

10 <210> 35

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 35

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln  
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg  
20 25 30

<210> 36

<211> 11

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 36

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
1 5 10

25 <210> 37

<211> 11

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 37

**Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala**  
**1 5 10 15**

**Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser**  
**20 25**

<210> 38

<211> 14

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 38

15 **Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly**  
**1 5 10**

<210> 39

<211> 32

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 39

**Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu**  
**1 5 10 15**

**Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg**  
**20 25 30**

25 <210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 40

**Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**

<210> 41

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 41

10 **Gly Tyr Ala Phe Thr Tyr Tyr Leu Ile Glu**  
**1 5 10**

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 42

**Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys**  
**1 5 10 15**

**Gly**

<210> 43

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

25 <400> 43

**Asn Trp Asn Met Phe Asp Tyr**  
**1 5**

<210> 44

<211> 25

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 44

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
 20 25

<210> 45

5 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

10 <400> 45

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

<210> 46

<211> 32

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 46

Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg  
 20 25 30

20 <210> 47

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 47

ES 2 700 141 T3

Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg  
20 25 30

<210> 48

<211> 32

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 48

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
20 25 30

10 <210> 49

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 49

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro  
1 5 10 15

Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ser  
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys  
35 40

<210> 50

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 50

**Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Phe Leu Ile Tyr**  
**1 5 10 15**

<210> 51

<211> 32

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 51

**Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr**  
**1 5 10 15**

**Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys**  
**20 25 30**

10 <210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 52

**Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys**  
**1 5 10**

<210> 53

<211> 23

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 53

**Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly**  
**1 5 10 15**

25 **Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys**  
**20**

<210> 54

<211> 15

<212> PRT



<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

5 <400> 58

**Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser**

**1 5**

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 59

**Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr**

**1 5**

15 <210> 60

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 60

**Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr**

**1 5 10 15**

**Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys**

**20 25 30**

<210> 61

<211> 15

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 61

**Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Phe Leu Ile Tyr**

30 **1 5 10 15**

<210> 62



ES 2 700 141 T3

Arg Asp Pro Gly Ala Ala Val Pro Gly Ala Ala Asn Ala Ser Ala Gln  
50 55 60

Gln Pro Arg Thr Pro Ile Leu Leu Ile Arg Asp Asn Arg Thr Ala Ala  
65 70 75 80

Ala Arg Thr Arg Thr Ala Gly Ser Ser Gly Val Thr Ala Gly Arg Pro  
85 90 95

Arg Pro Thr Ala Arg His Trp Phe Gln Ala Gly Tyr Ser Thr Ser Arg  
100 105 110

Ala Arg Glu Ala Gly Ala Ser Arg Ala Glu Asn Gln Thr Ala Pro Gly  
115 120 125

Glu Val Pro Ala Leu Ser Asn Leu Arg Pro Pro Ser Arg Val Asp Gly  
130 135 140

Met Val Gly Asp Asp Pro Tyr Asn Pro Tyr Lys Tyr Ser Asp Asp Asn  
145 150 155 160

Pro Tyr Tyr Asn Tyr Tyr Asp Thr Tyr Glu Arg Pro Arg Pro Gly Gly  
165 170 175

Arg Tyr Arg Pro Gly Tyr Gly Thr Gly Tyr Phe Gln Tyr Gly Leu Pro  
180 185 190

Asp Leu Val Ala Asp Pro Tyr Tyr Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Val Gln  
195 200 205

Lys Met Ser Met Tyr Asn Leu Arg Cys Ala Ala Glu Glu Asn Cys Leu  
210 215 220

Ala Ser Thr Ala Tyr Arg Ala Asp Val Arg Asp Tyr Asp His Arg Val  
225 230 235 240

Leu Leu Arg Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln Gly Thr Ser Asp Phe  
245 250 255

Leu Pro Ser Arg Pro Arg Tyr Ser Trp Glu Trp His Ser Cys His Gln  
260 265 270

His Tyr His Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr Asp Leu Leu Asp Ala  
275 280 285

Asn Thr Gln Arg Arg Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu  
290 295 300

ES 2 700 141 T3

Glu Asp Thr Ser Cys Asp Tyr Gly Tyr His Arg Arg Phe Ala Cys Thr  
305 310 315 320

Ala His Thr Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr Asp Thr Tyr Gly Ala  
325 330 335

Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Lys Pro Gly Asn  
340 345 350

Tyr Ile Leu Lys Val Ser Val Asn Pro Ser Tyr Leu Val Pro Glu Ser  
355 360 365

Asp Tyr Thr Asn Asn Val Val Arg Cys Asp Ile Arg Tyr Thr Gly His  
370 375 380

His Ala Tyr Ala Ser Gly Cys Thr Ile Ser Pro Tyr  
385 390 395

<210> 63

<211> 390

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 63

ES 2 700 141 T3

Gln Gln Gln Pro Pro Arg Glu Pro Pro Ala Ala Pro Gly Ala Trp Arg  
 1 5 10 15

Gln Gln Ile Gln Trp Glu Asn Asn Gly Gln Val Phe Ser Leu Leu Ser  
 20 25 30

Leu Gly Ser Gln Tyr Gln Pro Gln Arg Arg Arg Asp Pro Gly Ala Ala  
 35 40 45

Val Pro Gly Ala Ala Asn Ala Ser Ala Gln Gln Pro Arg Thr Pro Ile  
 50 55 60

Leu Leu Ile Arg Asp Asn Arg Thr Ala Ala Ala Arg Thr Arg Thr Ala  
 65 70 75 80

Gly Ser Ser Gly Val Thr Ala Gly Arg Pro Arg Pro Thr Ala Arg His  
 85 90 95

Trp Phe Gln Ala Gly Tyr Ser Thr Ser Arg Ala Arg Glu Ala Gly Ala  
 100 105 110

Ser Arg Ala Glu Asn Gln Thr Ala Pro Gly Glu Val Pro Ala Leu Ser  
 115 120 125

Asn Leu Arg Pro Pro Ser Arg Val Asp Gly Met Val Gly Asp Asp Pro  
 130 135 140

ES 2 700 141 T3

Tyr Asn Pro Tyr Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Pro Tyr Tyr Asn Tyr Tyr  
 145 150 155 160

Asp Thr Tyr Glu Arg Pro Arg Pro Gly Gly Arg Tyr Arg Pro Gly Tyr  
 165 170 175

Gly Thr Gly Tyr Phe Gln Tyr Gly Leu Pro Asp Leu Val Ala Asp Pro  
 180 185 190

Tyr Tyr Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Val Gln Lys Met Ser Met Tyr Asn  
 195 200 205

Leu Arg Cys Ala Ala Glu Glu Asn Cys Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Arg  
 210 215 220

Ala Asp Val Arg Asp Tyr Asp His Arg Val Leu Leu Arg Phe Pro Gln  
 225 230 235 240

Arg Val Lys Asn Gln Gly Thr Ser Asp Phe Leu Pro Ser Arg Pro Arg  
 245 250 255

Tyr Ser Trp Glu Trp His Ser Cys His Gln His Tyr His Ser Met Asp  
 260 265 270

Glu Phe Ser His Tyr Asp Leu Leu Asp Ala Asn Thr Gln Arg Arg Val  
 275 280 285

Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr Ser Cys Asp  
 290 295 300

Tyr Gly Tyr His Arg Arg Phe Ala Cys Thr Ala His Thr Gln Gly Leu  
 305 310 315 320

Ser Pro Gly Cys Tyr Asp Thr Tyr Gly Ala Asp Ile Asp Cys Gln Trp  
 325 330 335

Ile Asp Ile Thr Asp Val Lys Pro Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val Ser  
 340 345 350

Val Asn Pro Ser Tyr Leu Val Pro Glu Ser Asp Tyr Thr Asn Asn Val  
 355 360 365

Val Arg Cys Asp Ile Arg Tyr Thr Gly His His Ala Tyr Ala Ser Gly  
 370 375 380

Cys Thr Ile Ser Pro Tyr  
 385 390

<210> 64

ES 2 700 141 T3

<211> 1251

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 64

```

atgcgcttcg cctggaccgt gctcctgctc gggcctttgc agctctgctc gctagtgcac      60
tgcgcccctc ccgcccgcgg ccaacagcag cccccgcgcg agccgcccgc ggctccgggc      120
gcctggcgcc agcagatcca atgggagaac aacgggcagc tggtcagctt gctgagcctg      180
ggctcacagt accagcctca gcgccgccgg gaccggggcg ccgccgtccc tggcgcagcc      240
aacgcctccg ccagcagacc ccgactccg atcctgctga tccgcgacaa ccgcaccgcc      300
gcggcgcgaa cgcggacggc cggctcatct ggagtcaccg ctggccgccc caggcccacc      360
gcccgctcact ggttccaagc tggctactcg acatctagag cccgcgaagc tggcgcctcg      420
cgcgcggaga accagacagc gccgggagaa gttcctgctc tcagtaacct gcggccgccc      480
agccgcgtgg acggcatggt gggcgacgac cttacaacc cctacaagta ctctgacgac      540
aaccccttatt acaactacta cgatacttat gaaaggccca gacctggggg caggtaccgg      600
cccggatacg gcactggcta cttccagtac ggtctcccag acctggtggc cgaccctac      660
tacatccagg cgtccacgta cgtgcagaag atgtccatgt acaacctgag atgcgcggcg      720
gaggaaaact gtctggccag tacagcatac agggcagatg tcagagatta tgatcacagg      780
gtgctgctca gatttcccca aagagtgaaa aaccaagga catcagattt cttaccocagc      840
cgaccaagat attcctggga atggcacagt tgatcatcaac attaccacag tatggatgag      900
tttagccact atgacctgct tgatgccaac acccagagga gagtggctga aggccacaaa      960
gcaagtttct gtcttgaaga cacatcctgt gactatggct accacaggcg atttgcattg      1020
actgcacaca cacagggatt gagtcctggc tgttatgata cctatggtgc agacatagac      1080
tgccagtgga ttgatattac agatgtaaaa cctggaaact atatcctaaa ggtcagtgta      1140
aaccocagct acctggttcc tgaatctgac tataccaaca atggtgtgcg ctgtgacatt      1200
5 cgctacacag gacatcatgc gtatgcctca ggctgcacaa tttcaccgta t      1251

```

<210> 65

<211> 417

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 65

ES 2 700 141 T3

Met Arg Phe Ala Trp Thr Val Leu Leu Leu Gly Pro Leu Gln Leu Cys  
1 5 10 15

Ala Leu Val His Cys Ala Pro Pro Ala Ala Gly Gln Gln Gln Pro Pro  
20 25 30

Arg Glu Pro Pro Ala Ala Pro Gly Ala Trp Arg Gln Gln Ile Gln Trp  
35 40 45

ES 2 700 141 T3

Glu Asn Asn Gly Gln Val Phe Ser Leu Leu Ser Leu Gly Ser Gln Tyr  
 50 55 60

Gln Pro Gln Arg Arg Arg Asp Pro Gly Ala Ala Val Pro Gly Ala Ala  
 65 70 75 80

Asn Ala Ser Ala Gln Gln Pro Arg Thr Pro Ile Leu Leu Ile Arg Asp  
 85 90 95

Asn Arg Thr Ala Ala Ala Arg Thr Arg Thr Ala Gly Ser Ser Gly Val  
 100 105 110

Thr Ala Gly Arg Pro Arg Pro Thr Ala Arg His Trp Phe Gln Ala Gly  
 115 120 125

Tyr Ser Thr Ser Arg Ala Arg Glu Ala Gly Ala Ser Arg Ala Glu Asn  
 130 135 140

Gln Thr Ala Pro Gly Glu Val Pro Ala Leu Ser Asn Leu Arg Pro Pro  
 145 150 155 160

Ser Arg Val Asp Gly Met Val Gly Asp Asp Pro Tyr Asn Pro Tyr Lys  
 165 170 175

Tyr Ser Asp Asp Asn Pro Tyr Tyr Asn Tyr Tyr Asp Thr Tyr Glu Arg  
 180 185 190

Pro Arg Pro Gly Gly Arg Tyr Arg Pro Gly Tyr Gly Thr Gly Tyr Phe  
 195 200 205

Gln Tyr Gly Leu Pro Asp Leu Val Ala Asp Pro Tyr Tyr Ile Gln Ala  
 210 215 220

Ser Thr Tyr Val Gln Lys Met Ser Met Tyr Asn Leu Arg Cys Ala Ala  
 225 230 235 240

Glu Glu Asn Cys Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Arg Ala Asp Val Arg Asp  
 245 250 255

Tyr Asp His Arg Val Leu Leu Arg Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln  
 260 265 270

Gly Thr Ser Asp Phe Leu Pro Ser Arg Pro Arg Tyr Ser Trp Glu Trp  
 275 280 285

His Ser Cys His Gln His Tyr His Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr  
 290 295 300

ES 2 700 141 T3

Asp Leu Leu Asp Ala Asn Thr Gln Arg Arg Val Ala Glu Gly His Lys  
 305 310 315 320

Ala Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr Ser Cys Asp Tyr Gly Tyr His Arg  
 325 330 335

Arg Phe Ala Cys Thr Ala His Thr Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr  
 340 345 350

Asp Thr Tyr Gly Ala Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp  
 355 360 365

Val Lys Pro Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val Ser Val Asn Pro Ser Tyr  
 370 375 380

Leu Val Pro Glu Ser Asp Tyr Thr Asn Asn Val Val Arg Cys Asp Ile  
 385 390 395 400

Arg Tyr Thr Gly His His Ala Tyr Ala Ser Gly Cys Thr Ile Ser Pro  
 405 410 415

**Tyr**

<210> 66

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 66

**Trp Glu Trp His Ser Cys His Gln His Tyr His**  
 1 5 10

10 <210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 67

**Trp Ile Trp His Asp Cys His Arg His Tyr His**  
 1 5 10

<210> 68

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)..(14)

10 <223> Cualquier aminoácido

<400> 68

**Asp Ile Asp Cys Gln Trp Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Xaa Pro Gly**  
**1 5 10 15**

**Asn Tyr**

<210> 69

<211> 18

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 69

**Asp Ile Asp Cys Gln Trp Val Asp Ile Thr Asp Val Pro Pro Pro Gly**  
**1 5 10 15**

20 **Asp Tyr**

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 70

**Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr**  
**1 5**

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a una proteína de tipo lisil oxidasa 2 (LOXL2), e inhibe la actividad enzimática de la proteína LOXL2, en donde la inhibición no es competitiva, que es un anticuerpo aislado, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo compite por la unión a LOXL2 con otro anticuerpo que se une específicamente a una región de LOXL2 que comprende la SEQ ID NO: 6.
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado que comprende (a) CDR de cadena pesada variable que tienen las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 41, 42 y 70; y (b) CDR de cadena ligera variable que tienen las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 57, 58 y 59.
- 10 3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es humanizado o humano y/o es un Fv, un scFv, un Fab, un F(ab')<sub>2</sub>, un anticuerpo diseñado, o monoclonal.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo está marcado con un marcador terapéutico, de diagnóstico o detectable.
- 15 5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquier reivindicación precedente, para uso en un método para reducir el crecimiento tumoral, reducir la metástasis, inhibir la angiogénesis, tratar la fibrosis o disminuir la formación de matriz extracelular.
6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para el uso de la reivindicación 5, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se usa en combinación con un segundo agente terapéutico.
- 20 7. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de la reivindicación 1.
8. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-LOXL2 humanizado o fragmento del mismo que se une específicamente a LOXL2, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo inhibe la actividad enzimática de la proteína LOXL2, en donde la inhibición no es competitiva, y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:
- 25 1 (a) CDR de cadena pesada variable que tienen las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 41, 42 y 70; y (b) CDR de cadena ligera variable que tienen las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 57, 58 y 59;
- 30 2 (a) una cadena pesada variable que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28; y (b) una cadena ligera variable que tiene al menos 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO: 30, 31 y 32; y
- 35 3 (a) una cadena pesada variable que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28; y (b) una cadena ligera variable que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO: 30, 31 y 32.
9. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 8, en donde el anticuerpo anti-LOXL2 comprende una cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 27 y una cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 31.
10. Un vector que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9.
- 40 11. Un método *in vitro*, que comprende: detectar un nivel de LOXL2 en una muestra de un sujeto, en donde el nivel de LOXL2 en la muestra en comparación con una muestra de referencia indica la presencia de un tumor, metástasis, angiogénesis, o fibrosis en el sujeto y la detección se lleva a cabo poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a LOXL2, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es el anticuerpo de la reivindicación 1.
- 45 12. El método de la reivindicación 11, en donde el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (1) (a) CDR de cadena pesada variable que tienen las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 41, 42 y 70; y (b) CDR de cadena ligera variable que tienen las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 57, 58 y 59;
- 50 (2) (a) una cadena pesada variable que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28; y (b) una cadena ligera variable que tiene al menos 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO: 30, 31 y 32; y

(3) (a) una cadena pesada variable que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28; y (b) una cadena ligera variable que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO: 30, 31 y 32.

5 13. El método de la reivindicación 11, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 27 y una cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 31.

14. Una célula huésped transfectada con el vector de la reivindicación 10.

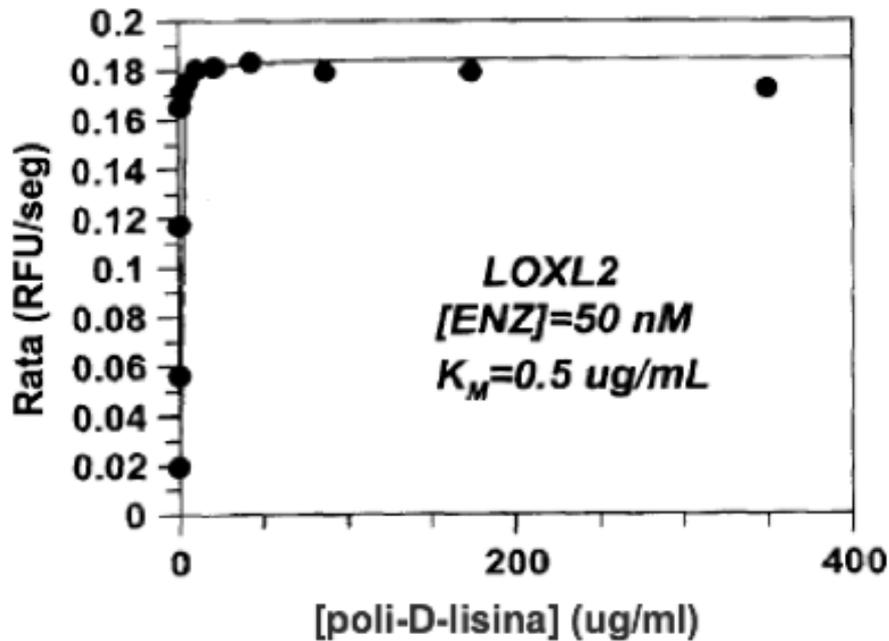
15. Un anticuerpo recombinante o fragmento del mismo producido por la célula huésped de la reivindicación 14.

16. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

10

**FIGURA 1****Enzimología lisil oxidasa**

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



**FIGURA 2**

**Modos comunes de inhibición enzimática**

Inhibición competitiva

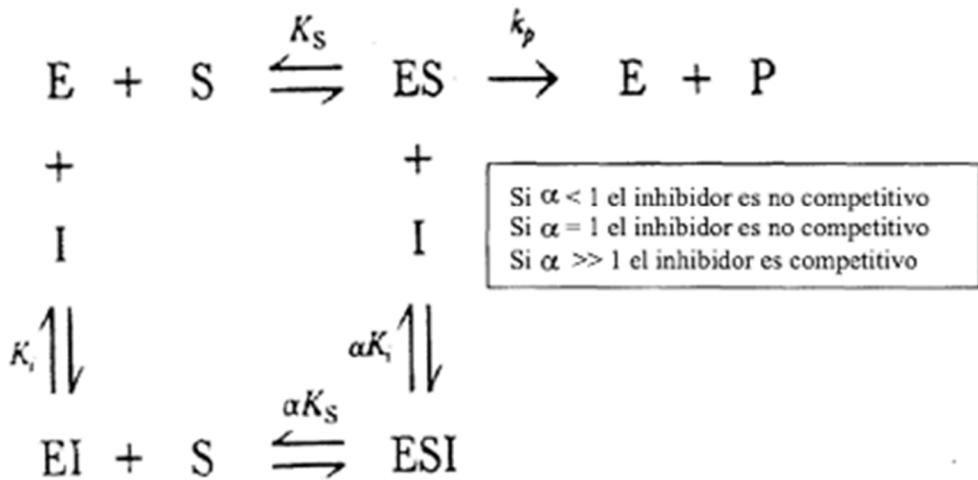
- El inhibidor típicamente tiene similitud estructural con el sustrato
- Inhibición notable a concentraciones de sustrato bajas pero puede superar a concentraciones de sustrato altas

Inhibición no competitiva

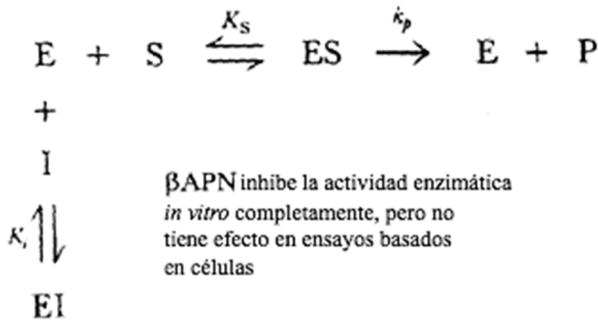
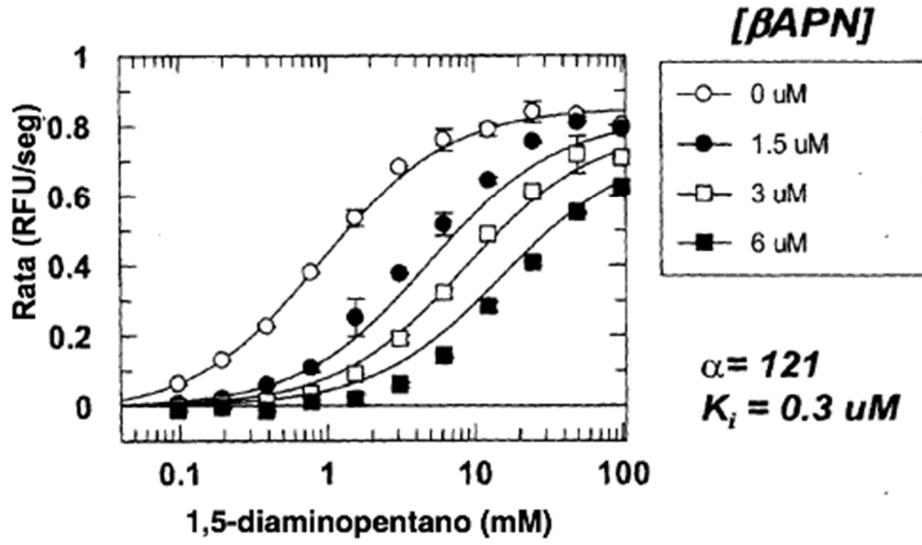
- El inhibidor se une al sitio que queda disponible después de que el sustrato se une al sitio activo
- Inhibición más notable a altas concentraciones de sustrato

Inhibición no competitiva

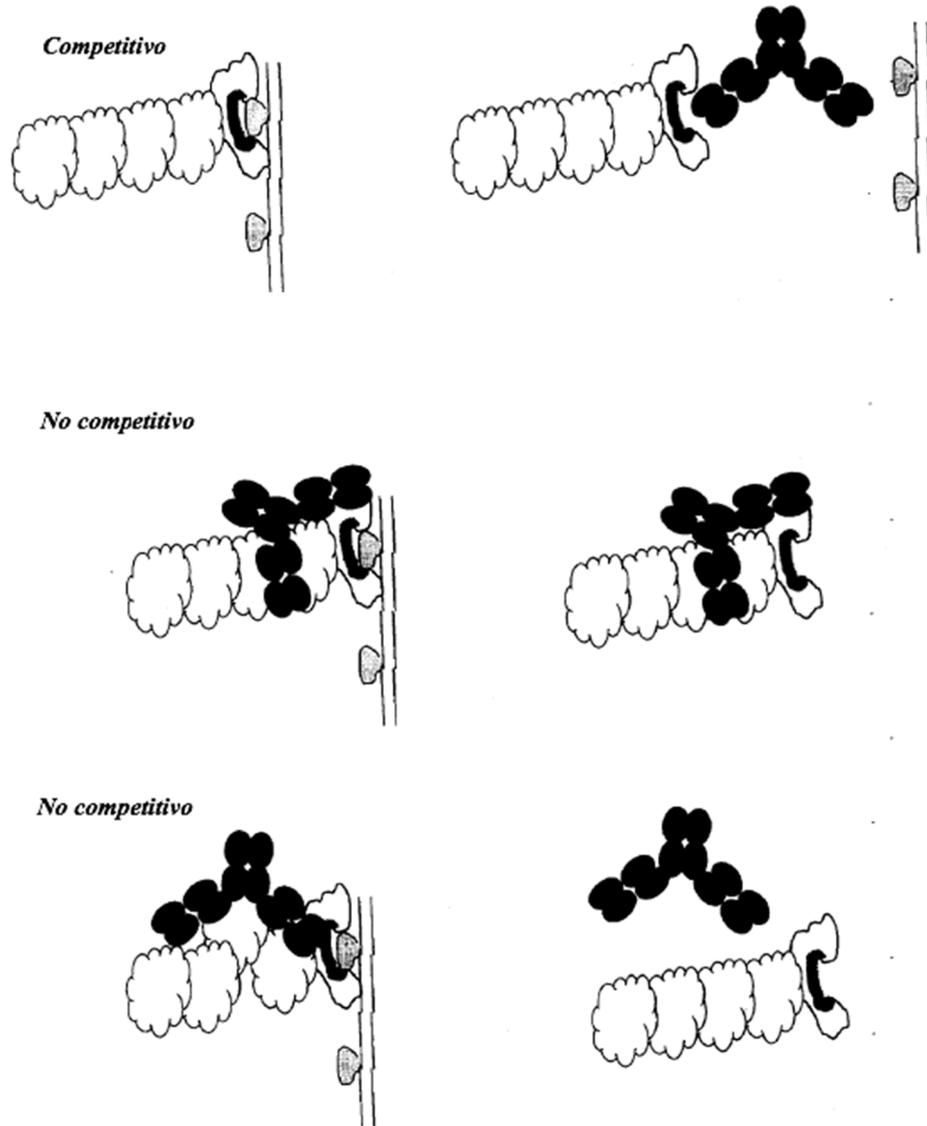
- El inhibidor se une a un sitio alejado del sitio de unión al sustrato
- La inhibición relativa es la misma a todas las concentraciones del sustrato



**FIGURA 3**  
 **$\beta$ APN es un inhibidor competitivo de LOXL2**

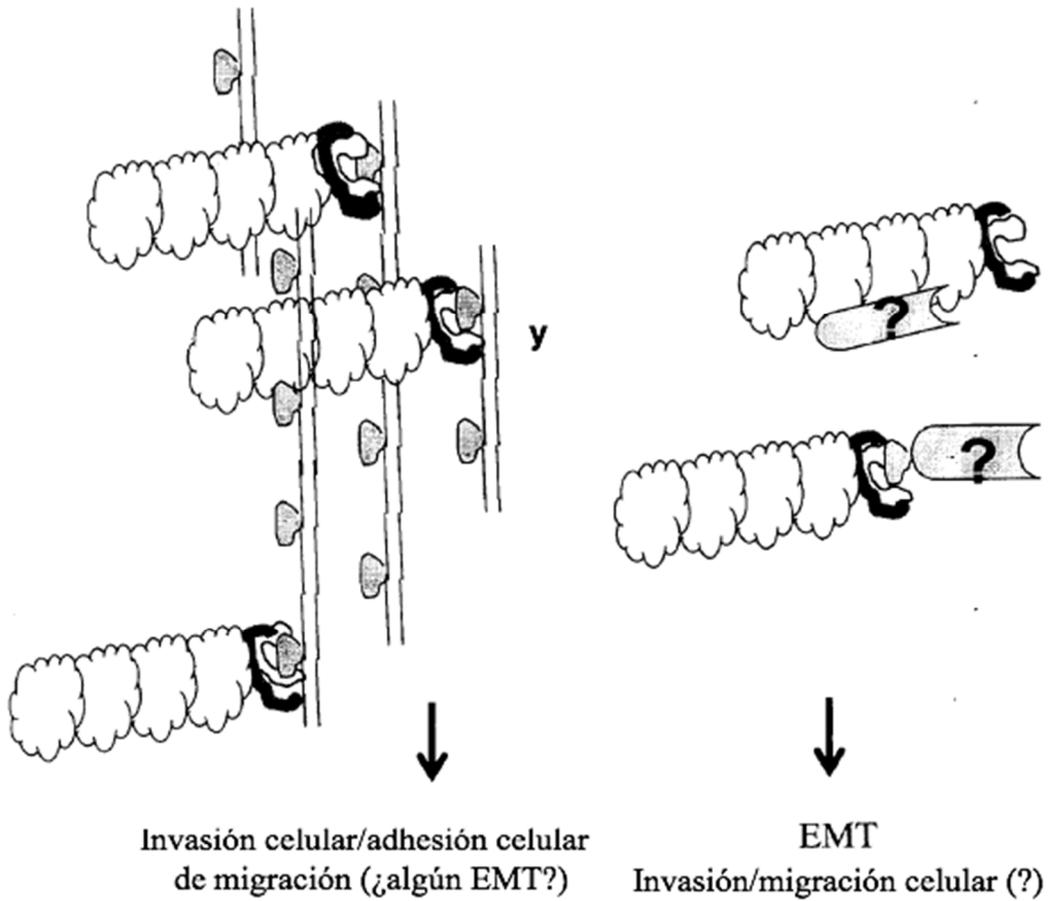


**FIGURA 4**  
**Modos de inhibición enzimática: LOXL2**



**Figura 5**  
**LOXL2 extracelular: localización y función**

A densidad celular alta, LOXL2 es secretado y detectado unido a la matriz y, en medios condicionados, un anticuerpo de bloqueo puede, idealmente, unir todos los estados e inhibir todas las actividades



**Figura 6**

**Anticuerpo anti-LOXL2 monoclonal de murino**

A. Cadena pesada variable

*MEWSRVFIFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVRPGTS  
VKVSCKASGYAFTYYLIEWVKQRPGQGLEWIGVI  
NPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSS  
LTSDDSAVYFCARNWMNFDYWGQGTTTLTVSS*  
(SEQ ID NO: 1)

B. Cadena ligera variable

*MRCLAEFLGLLVLWIPGAIGDIVMTQAAPSVSVTPG  
ESVSISCRSSKSLHNSGNTYLYWFLQRPGQSPQFL  
IYRMSNLAGVPDFRFSGSGSGTAFTLRISRVEAED  
VGVYYCMQHLEYPYTFGGGKLEIK*  
(SEQ ID NO: 2)

**Figura 7**  
**Anticuerpo anti-LOXL2**

A. Cadena pesada variable

MGWSWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVKPGASVKLSC  
KASGYTFRSYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTKYNEK  
FKGKAILTTDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARVYYAMD  
YWGQGTSVTVSS...(SEQ ID NO: 3)

B. Cadena ligera variable 1

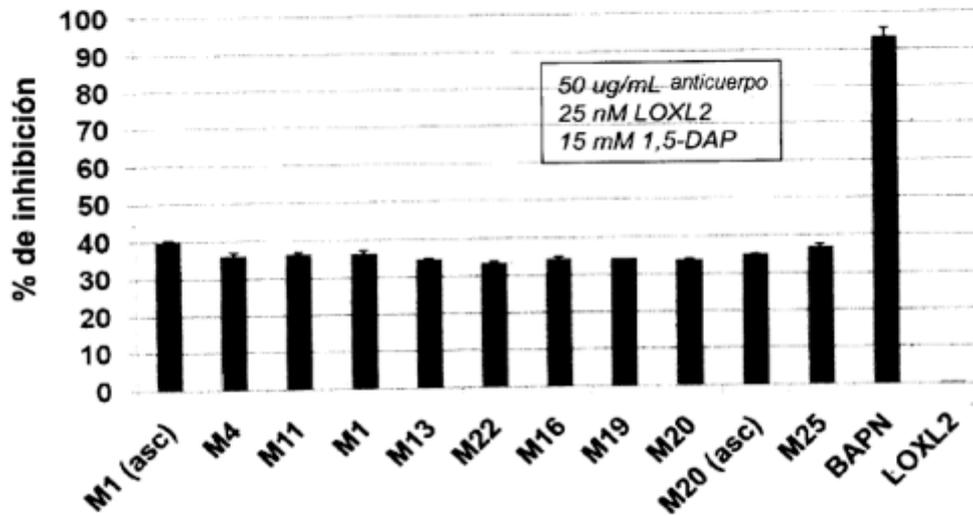
MKLPVRLVLMFWIPASSSDVLLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS  
QSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRF  
GGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGIYYCFQSSHIPLTFGAGTKLE  
LKRAD...(SEQ ID NO: 4)

C. Cadena ligera variable 2

MKLPVRLVLMFWIPASSSDVLLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS  
QSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSIRFSGVPDRFG  
GGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGIYYCFQSSHIPLTFGAGTKLEL  
KRAD...(SEQ ID NO: 5)

**Figura 8**

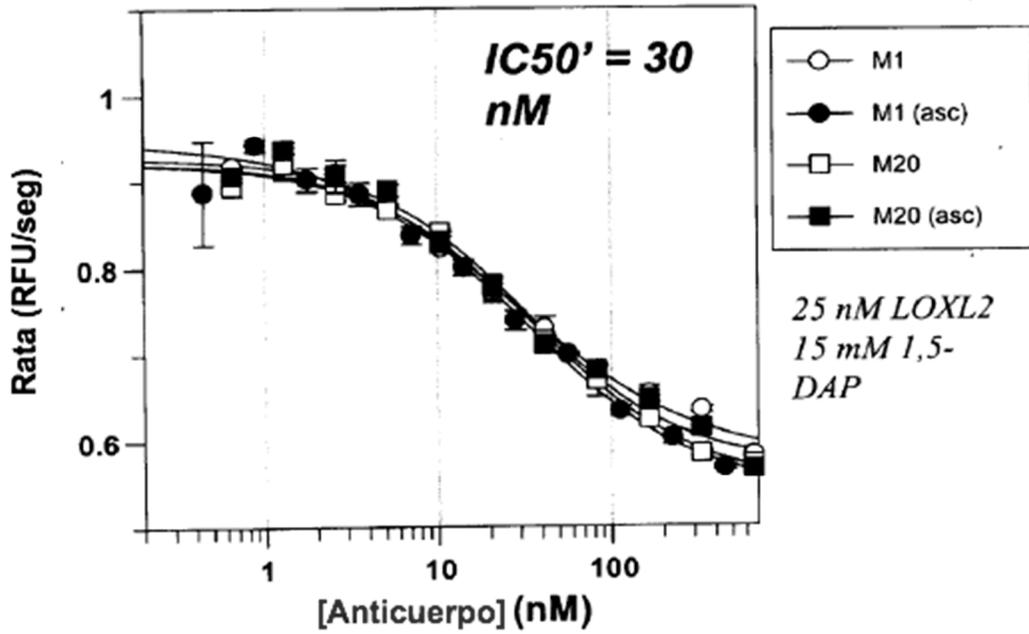
Anticuerpos anti-LOXL2: Evaluación de actualización de la proteína de criba B de la actividad enzimática de LOXL2



Anticuerpo anti-LOXL2 designado AB0023

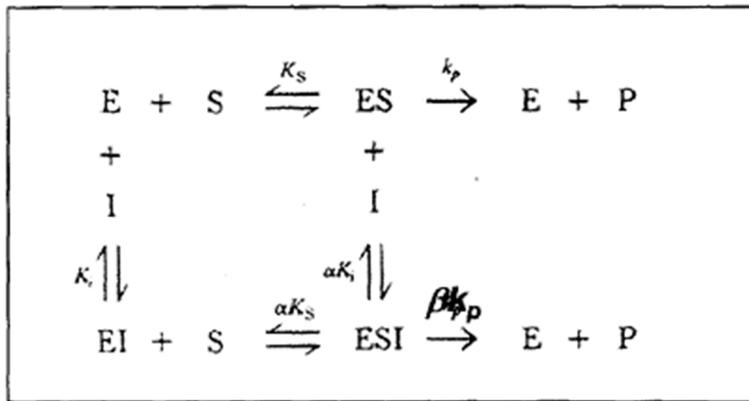
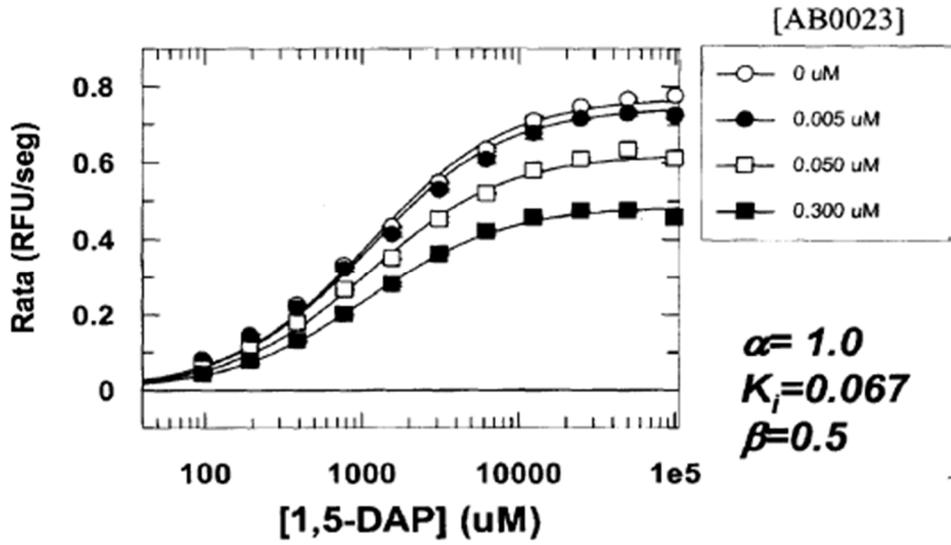
- Actividad inhibitoria repetida observada de anticuerpos  $\alpha$ -LOXL2 en 10 ml del material de preparación en ensayo enzimático
- La inhibición también se repite en ensayos basados en células.
- Análisis de secuencia confirma que M01, M16, M19, M20 son idénticos

**Figura 9**  
**Anticuerpo anti-LOXL2 AB0023 y actividad enzimática**



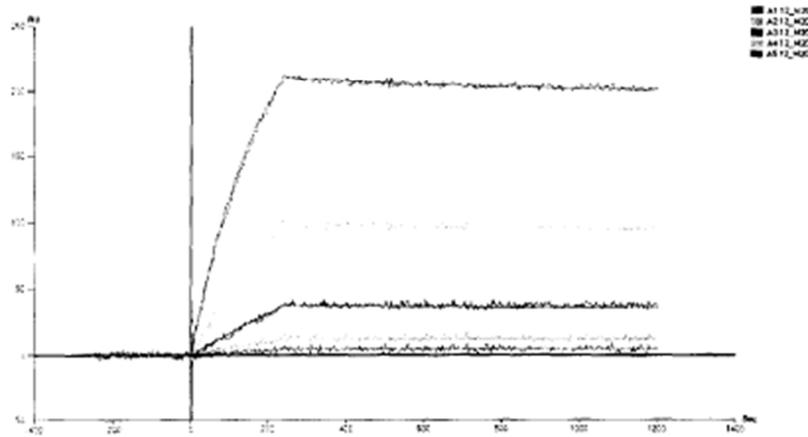
AB0023 es un inhibidor parcial de la actividad enzimática de LOXL2 con un IC<sub>50</sub> aparente de ~ 30 nM

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



**Figura 11**

**Anticuerpo anti-LOXL2 AB0023: afinidad de unión y  
y tasa de decrecimiento**



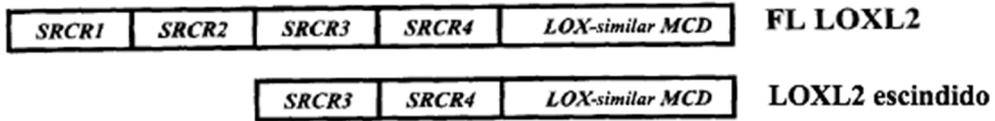
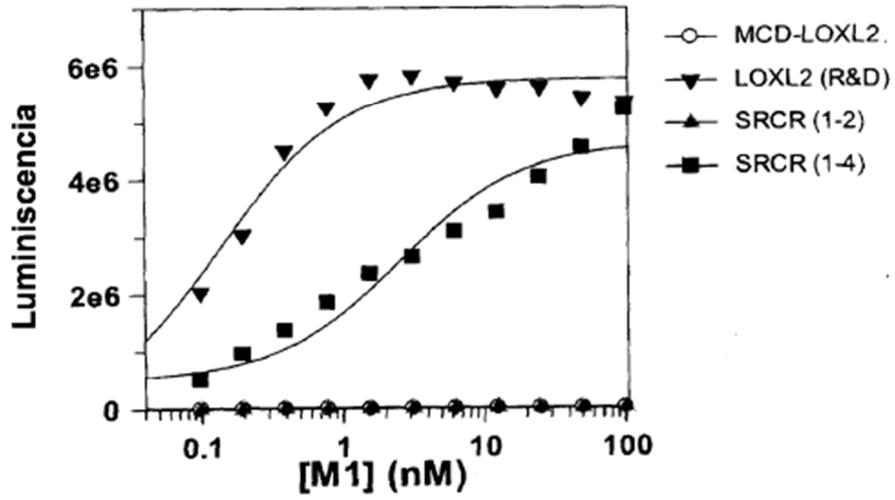
**Análisis usando ProteOn**

**1 ug/mL AB0023 (M20) inmovilizado en el LOXL2 chip en  
concentraciones variables fue aplicado al chip**

- $k_{encendido} = 1.68 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
- $k_{apagado} = 1.17 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
- $K_D = 0.69 \text{ nM}$
- $t_{1/2} = 98.7 \text{ min}$

**El anticuerpo se une muy fuertemente y se libera muy lentamente  
Estimación de Kd a partir de varios métodos 0.1-1-0 nM**

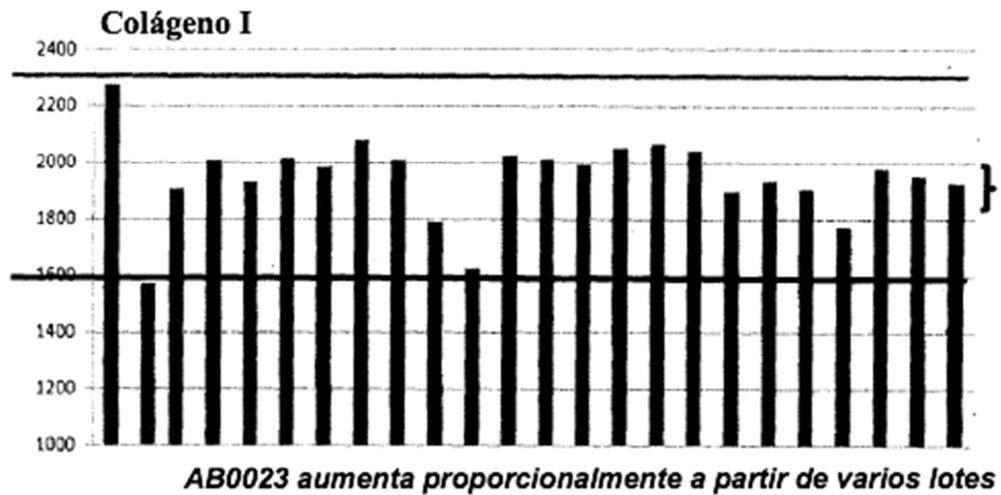
**Figura 12**  
 Mapeo de dominio del anticuerpo anti-LOXL2 AB0023  
 AB0023 se une al dominio SRCR 3-4



**AB0023 se une al dominio SRCR 3-4**

**Figura 13**

Anticuerpo anti-LOXL2 AB0023: Ensayos basados en célula



- Inhibición consistente de migración/invasión en colágeno I y colágeno IV, desde sobrenadantes a través de 10ml del material de preparación y aumenta proporcionalmente a preparación 100ml y material de ascitis
- Inhibición parcial también observada en ensayo de adhesión de células

FIGURA 14

A. AB0023 (Clon M20 de la proteína hLOXL2 de criba B) vs. Variantes 1-4 humanizadas

CDR1 GYAFTYYLIE  
 CDR2 VINPFGSGGTNYNEKFKG  
 CDR3 NWMNFDY

Residuos en AB0023 humanizado que difiere del map de ratón (en *delineado en cursiva*):

M20 VH .pro	MEWSRVFI <del>FLLSVTAGVHSQVQLQDSGAELVRF</del> PGTSVKVSKASG <b>YAFTYYLIE</b> WVKORPGQGLEWIGVI	70
Variante 1 Vh .pro	----- <del>QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASG<b>YAFTYYLIE</b>WVKQAPGQGLEWIGVI</del>	51
Variante 2 Vh .pro	----- <del>QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASG<b>YAFTYYLIE</b>WVRAAPGQGLEWIGVI</del>	51
Variante 3 Vh .pro	----- <del>QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASG<b>YAFTYYLIE</b>WVRAAPGQGLEWIGVI</del>	51
Variante 4 Vh .pro	----- <del>QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASG<b>YAFTYYLIE</b>WVRAAPGQGLEWIGVI</del>	51
M20 VL .pro	<b>NP</b> GGSGTNYNEK <b>FKGR</b> ATLTADKSSSTAYMQLSLSLTSDDSAVYFCAR <b>NNMFDY</b> WGQGTTLTVSS	135
Variante 1 Vh .pro	<b>NP</b> GGSGTNYNEK <b>FKGR</b> ATLTADKSTSTAYMELSSLRS <b>ED</b> SAVYFCAR <b>NNMFDY</b> WGQGTTLTVSS	116
Variante 2 Vh .pro	<b>NP</b> GGSGTNYNEK <b>FKGR</b> ATLTADKSTSTAYMELSSLRS <b>ED</b> TAVYFCAR <b>NNMFDY</b> WGQGTTLTVSS	116
Variante 3 Vh .pro	<b>NP</b> GGSGTNYNEK <b>FKGR</b> ATLTADKSTSTAYMELSSLRS <b>ED</b> TAVYFCAR <b>NNMFDY</b> WGQGTTLTVSS	116
Variante 4 Vh .pro	<b>NP</b> GGSGTNYNEK <b>FKGR</b> ATLTADKSTSTAYMELSSLRS <b>ED</b> TAVYFCAR <b>NNMFDY</b> WGQGTTLTVSS	116

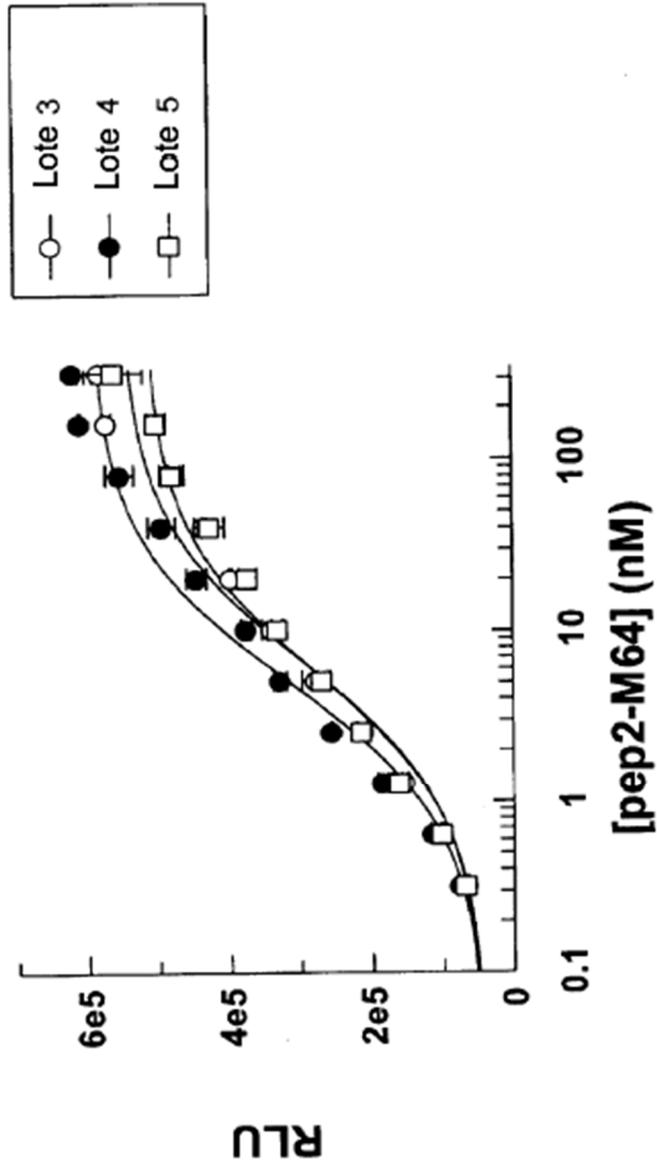
B. AB0023 (Clon M20 de la proteína hLOXL2 de pantalla B) VL (V) vs. Variantes 1-3 humanizadas

CDR1 RSSKSLLSHNGNTYLY  
 CDR2 RMSNLAS  
 CDR3 MQHLEYPYT

Residuos en AB0023 humanizado que difiere del map de ratón (en *delineado en cursiva*):

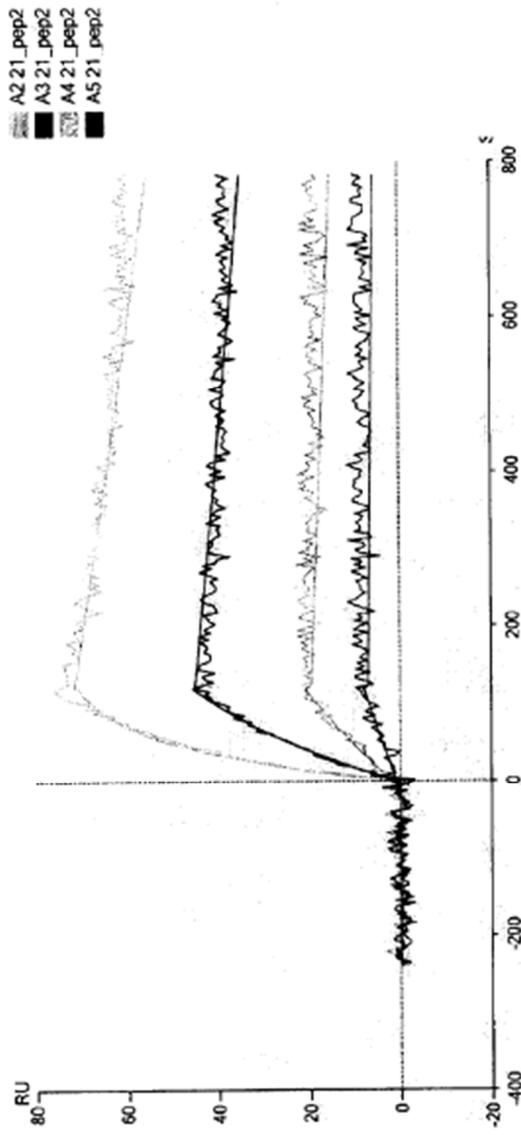
M20 VL .pro	MRCLAEFLGLLVLWIPGAI <del>GDIVMTQAA</del> PSVSVTPGESVSI <b>SCRSSKSLLSHNGNTYLY</b> WFLQKPGQSPQ	70
Variante 1 Vh .pro	----- <del>DI</del> VMTQTPLSLSVTPGQPASIS <b>CRSSKSLLSHNGNTYLY</b> WFLQKPGQSPQ	50
Variante 2 Vh .pro	----- <del>DI</del> VMTQTPLSLSVTPGQPASIS <b>CRSSKSLLSHNGNTYLY</b> WFLQKPGQSPQ	50
Variante 3 Vh .pro	----- <del>DI</del> VMTQTPLSLSVTPGQPASIS <b>CRSSKSLLSHNGNTYLY</b> WFLQKPGQSPQ	50
M20 VL .pro	<b>FLIYRMSNLAS</b> GVDPDRFSGSGGTFTLRISRVEAE <b>DGVVYCMQHL</b> EYPYTFGGGTKLEIK	132
Variante 1 Vh .pro	<b>FLIYRMSNLAS</b> GVDPDRFSGSGGTFTLRISRVEAE <b>DGVVYCMQHL</b> EYPYTFGGGTKVEIK	112
Variante 2 Vh .pro	<b>FLIYRMSNLAS</b> GVDPDRFSGSGGTFTLRISRVEAE <b>DGVVYCMQHL</b> EYPYTFGGGTKVEIK	112
Variante 3 Vh .pro	<b>FLIYRMSNLAS</b> GVDPDRFSGSGGTFTLRISRVEAE <b>DGVVYCMQHL</b> EYPYTFGGGTKVEIK	112

**Figura 15**  
**Unión de M64 al LOX**



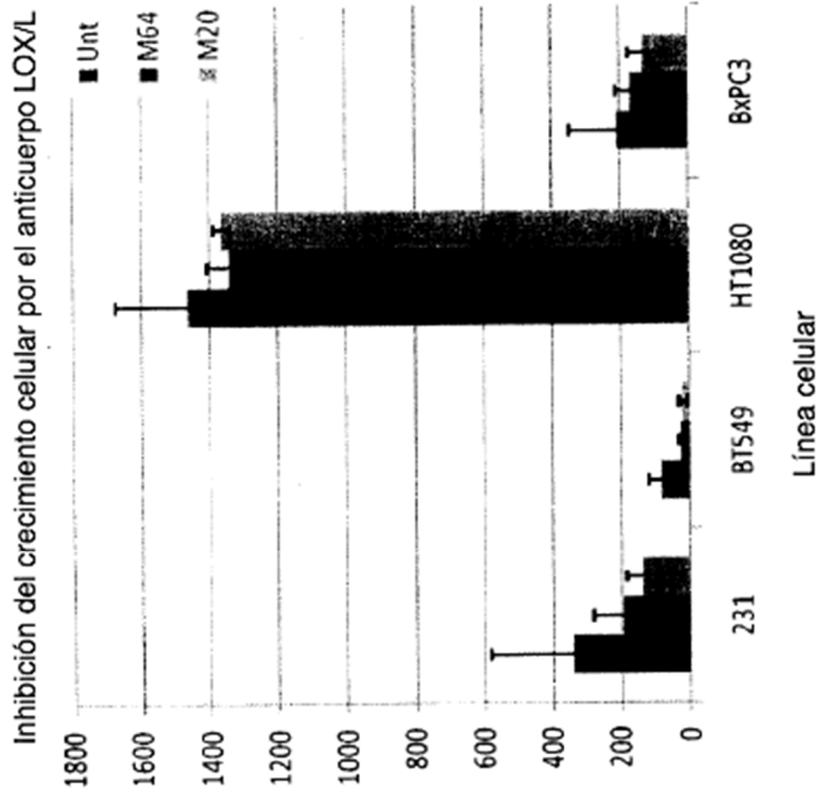
[muerto.LOX]=0.1 ug/mL  
1/16000 secundario

**Figura 16**  
**Unión de M64 a LOXFL vía SPR**



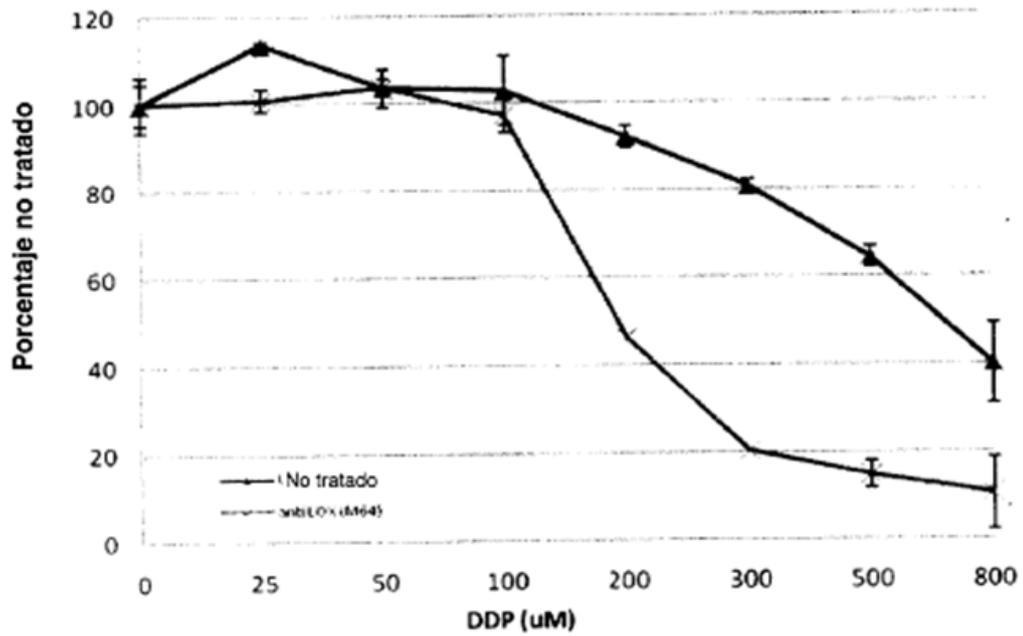
$[LOXFL]=0.1 \text{ ug/mL}$   
 $K_D=7 \text{ nM}$

Figura 17



**Figura 18**  
**Sinergia cisplatino y anti-LOX**

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



**IC50s**

Línea celular	No tratado (uM)	Anti-LOX (M64) (uM)
231	261.8±72.3	242.2±14.4
HT1080	207.5±6.9	194.2±22.7
MiaPaCa 2	664.6±112.8	174.7±5.7
BT549	384±244.3	197.3±28.5