

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 976**

51 Int. Cl.:
C07K 14/72 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03792528 .6**
96 Fecha de presentación: **21.08.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1534750**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2005**

54 Título: **Usos terapéuticos de anticuerpos monoclonales contra el receptor de tipo 1 de la angiotensina II**

30 Prioridad:
21.08.2002 GB 0219524

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.08.2012

73 Titular/es:
**QUEEN MARY & WESTFIELD COLLEGE
MILE END ROAD
LONDON E1 4NS, GB**

72 Inventor/es:
**VINSON, Gavin Paul;
PUDDEFOOT, John Richard y
BARKER, Stewart**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 385 976 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

Usos terapéuticos de anticuerpos monoclonales contra el receptor de tipo 1 de la angiotensina II

La presente invención se refiere a usos terapéuticos de anticuerpos monoclonales contra el receptor de tipo 1 de la angiotensina II, en particular en el tratamiento del cáncer.

5 La angiotensina II juega un papel central en la homeostasis de los electrolitos en mamíferos y en el control de la presión sanguínea (Peach *Physiol. Rev* 57 313-370 (1977); Vinson y col., "The Adrenal Cortex", Prentice Hall, Englefield Heights (1992)). Se han reconocido dos tipos principales de receptores de la angiotensina II, denominados tipos 1 y 2 (AT1 y AT2), pero la mayoría de las bien conocidas acciones de la angiotensina II se producen a través del subtipo AT1 (Herblin y col., *Am. J. Hypertens.* 4 299S-302S (1991); Ouali y col., *J. Steroid*
10 *Biochem. Mol. Biol.* 43 271-280 (1992)).

Se ha usado un anticuerpo monoclonal, 6313/G2, contra el subtipo de receptor AT1 (Barker y col., *J. Mol. Endocrinol.* 11241-245 (1993)) para estudiar la distribución del receptor (Vinson y col., *Mol. Med Today* 1 35-38 (1995)). El anticuerpo monoclonal se ha sugerido para su uso como agente terapéutico para controlar la vasoconstricción, por ejemplo, en el tratamiento de la hipertensión o de contracciones uterinas.

15 El anticuerpo se ha usado como un agente específico de imagen en varios tejidos, por ejemplo, cáncer de laringe (Marsigliante y col., *Cancer Letters* 110 19-27 (1996)), de riñón (Harrison-Bernard y col., *Am. J. Physiol.* 42 F170-F177 (1997); Cheng y col., *Am. J. Physiol.* 43 F10-F17 (1998)) y de cerebro (Yang y col., *J. Neuroscience* 17 1660-1669 (1997)). Se ha demostrado que el anticuerpo bloquea la internalización del receptor AT1 inducida por la angiotensina II y la activación de la PKC, pero por el contrario promueve la respuesta al calcio (Kapas y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 204 1292-1298 (1994); Vinson y col., *J. Endocrinol.* 141 R5-R9 (1994)). Se ha informado de la presencia de los receptores AT1 y AT2 en los tumores de mama con una producción local de angiotensina (Inwang y col., *Brit. J. Cancer* 75 1279-1283 (1997); Tahmasebi y col., *Eur. J. Cancer* 34 1777-1782 (1998)).

25 El anticuerpo monoclonal 6313/G2 es secretado por una línea celular de hibridoma depositada el 21 de julio de 1993 en la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales (*European Collection of Animal Cell Cultures*, ECACC), Porton Down, Reino Unido, bajo el tratado de Budapest, y designado mediante el número de acceso 93072117. El depósito fue realizado por el Dr. Gavin P Vinson y el Dr. Stewart Barker, Departamento de Bioquímica, Queen Mary & Westfield College, Mile End Road, Londres E1 4NS. El depositante ha autorizado al solicitante a mencionar el material depositado en la solicitud y ha dado su consentimiento incondicional e irrevocable para que el material depositado se haga disponible al público según la Norma 28(1)(d) de la Convención Europea de Patentes

30 La línea celular de hibridoma produce un anticuerpo que se une específicamente a los residuos de aminoácidos 8 a 17 del receptor AT1 del músculo liso vascular de rata, cuya secuencia también se encuentra en el receptor AT1 de células humanas y bovinas. El epítipo de la secuencia es como sigue:

EDGIKRIQDD

35 O, alternativamente expresado como,

NH₂-Glu-Asp-Gly-Ile-Lys-Arg-Ile-Gln-Asp-Asp-COOH

Ahora se ha averiguado sorprendentemente que los anticuerpos monoclonales contra la secuencia peptídica que comprende la secuencia N-terminal del receptor de la angiotensina II de tipo 1 tienen usos terapéuticos adicionales en ciertas dolencias médicas en las que dichos usos no habían sido sugeridos o mostrados previamente.
40 Adicionalmente, estos efectos terapéuticos se observan en la capacidad de los anticuerpos monoclonales de bloquear las acciones perjudiciales de la angiotensina II en las dolencias médicas aludidas, conservando las acciones beneficiosas de la molécula. Ahora se ha comprendido un importante papel funcional para la secuencia N-terminal completa.

Según un primer aspecto de la invención se prevé un anticuerpo monoclonal que se une a un péptido consistente en
45 la secuencia

EDGIKRIQDD

para su uso en el tratamiento del cáncer.

Este aspecto de la invención también se extiende al uso del anticuerpo monoclonal que se une a un péptido consistente en la secuencia

50 EDGIKRIQDD

en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En lo anterior, y a lo largo de esta memoria descriptiva, los residuos de aminoácidos están designados por la nomenclatura habitual de letra única de la IUPAC. Las designaciones de letra única pueden correlacionarse con las clásicas designaciones de tres letras de los residuos de aminoácidos como sigue:

	A = Ala	G = Gly	M = Met	S = Ser
5	C = Cys	H = His	N = Asn	T = Thr
	D = Asp	I = Ile	P = Pro	V = Val
	E = Glu	K = Lys	Q = Gln	W = Trp
	F = Phe	L = Leu	R = Arg	Y = Tyr

10 Según se usa en este documento, el término "péptido" incluye un oligopéptido o un polipéptido, y estos términos pueden usarse de forma intercambiable.

En este documento también se describe el uso de un anticuerpo monoclonal contra una secuencia peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos:

EDGIKRIQDD

15 O un fragmento activo de la misma y/o un mutante conservativo de la misma. Esta secuencia se toma a partir de la secuencia del receptor de tipo 1 de la angiotensina II de rata, residuos 8 a 17. Las sustituciones conservativas en este fragmento serían D para E, E para D, A para G, L o I, R para K, K para R, N para Q, o cualquier combinación de estas.

20 La secuencia EDGIKRIQDD está completamente conservada al 100% entre las especies humana, chimpancé, murina (AT1b) y (AT1 b), bovina, canina, ovina, conejo y rata (AT1b). Las variaciones se observan en el residuo 8 para la cobaya, que tiene Q, la rata (AT1a) que tiene D y el jerbo, que tiene D. Las homologías de secuencia para estas especies para la región completa 1 a 45 de la secuencia N-terminal se muestran en la Figura 9.

Consecuentemente, una secuencia consenso preferida para el péptido correspondiente a los residuos 8 a 17 del receptor de tipo 1 de la angiotensina II tiene la estructura:

EDGIKRIQDD

25 en la que los siguientes residuos pueden ser cada uno independientemente como sigue: el residuo 8 puede ser E, D o Q, el residuo 9 puede ser D o E, el residuo 10 puede ser G o A, el residuo 11 puede ser I o A, el residuo 12 puede ser K o R, el residuo 13 puede ser R o K, el residuo 14 puede ser I o A, el residuo 15 puede ser Q o N, y los residuos 16 y 17 pueden ser D o E.

30 El péptido será generalmente antigénico y capaz de estimular la producción de anticuerpos que, cuando se administran, pueden usarse en el tratamiento del cáncer.

35 Los péptidos y otras moléculas usadas para preparar anticuerpos monoclonales para su uso según la invención pueden ser transformados en antigénicos, o presentados en una variedad de formas. Preferiblemente una región antigénica (tal como un fragmento o subfragmento peptídico) de una molécula según la invención contendrá la secuencia de aminoácidos de elección unida a un péptido o proteína portadora. Generalmente se prefiere tener una pluralidad, por ejemplo, de 5 a 10, copias de una secuencia peptídica (por ejemplo, una o más de las secuencias anteriores) unidas al portador. El portador puede ser por conveniencia generalmente una proteína grande, que es inerte en el sentido material, y que deriva de una especie o género diferente al que está asociado con la hormona de crecimiento natural. Algunos ejemplos de portadores incluyen albúminas tales como la albúmina sérica humana, la albúmina sérica bovina o la ovoalbúmina (aunque probablemente no muchos péptidos serán capaces de ser portados en este último caso). Alternativamente puede usarse hemocianina de lapa californiana. El portador procederá generalmente preferiblemente de una especie diferente a aquella en la que se basa el fragmento.

No es esencial que las secuencias peptídicas según se describió anteriormente estén unidas a albúminas: pueden estar unidas a otras macromoléculas tales como β -galactosidasa, especialmente de origen bacteriano.

45 También se describen en este documento anticuerpos monoclonales contra moléculas que son péptidos o que tienen regiones peptídicas que comparten una secuencia de homología sustancial (por ejemplo mayor del 30%, del 50% o incluso del 70%, adecuadamente del 80%, del 85%, del 90% o del 95%) con los péptidos anteriores. De forma similar, las sustituciones conservativas de aminoácidos pueden no disminuir la inmunogenicidad o la antigenicidad. Por lo tanto, homólogos antigenéticamente similares crearán anticuerpos que se unen a los receptores de tipo 1 de la angiotensina II en la misma región que definen los péptidos anteriores. Se sabe que el uso de homólogos puede ser un medio para esquivar la "auto" tolerancia. Por lo tanto, el uso de las correspondientes secuencias de otras especies puede ser ventajoso esta invención.

Alternativamente es posible preparar anticuerpos monoclonales contra moléculas que son o que comprenden péptidos que sólo que incluyen polímeros de secuencias según se describió anteriormente. Las secuencias apropiadas pueden polimerizarse mediante reticulación de dos residuos de cisteína para formar puentes de disulfuro, o bien usando agentes de acoplamiento químicos externos (tales como carbodiimida, glutaraldehído u otros dialdehídos o ácidos carboxílicos di (o poli) funcionales. Como alternativa adicional podrían usarse técnicas de ADN recombinante para producir un polímero peptídico.

Debería mencionarse que el acoplamiento químico (que podría tener lugar, por ejemplo a través de la intervención de residuos de lisina) y la formación de puentes de disulfuro no se limitan a cuando los residuos de acoplamiento están en el extremo de la secuencia: los residuos internos también podrían ser apropiados. Pueden añadirse residuos de acoplamiento, por ejemplo, residuos de cisteína, según se desee.

Puede encontrarse que no sea necesario acoplar ninguna de las secuencias descritas anteriormente con péptidos externos. Pueden ser antigénicos por sí mismos. En dicho caso, puede ser recomendable seleccionar unos coadyuvantes en particular, tales como DEAE dextrano y Merck 7426.

Los anticuerpos monoclonales para su uso según la presente invención pueden prepararse inmunizando ratones endogámicos mediante la técnica estándar de Kohler & Milstein (Nature 256 495-497 (1975)). Puede sintetizarse un péptido correspondiente a las secuencias de epítipo descritas anteriormente mediante cualquier ruta conveniente química o biológica, que a continuación es conjugado con albúmina sérica bovina (BSA), u otra molécula adecuada, y después usado para inmunizar los ratones. Después de una inyección de recuerdo del conjugado del péptido-BSA, se extraen los bazo de los ratones y se combinan los esplenocitos con células de mieloma de ratón. Los híbridos mixtos de mieloma-linfocito pueden seleccionarse entonces mediante un crecimiento en hipoxantina, timidina y aminopterina en un medio de cultivo celular apropiado para inhibir la proliferación de las células de mieloma no fusionadas y los híbridos de mieloma.

Las células de hibridoma pueden cribarse mediante ELISA buscando reactividad frente al epítipo usado en el receptor de tipo 1 de la angiotensina II mediante adaptaciones de la técnica descrita en Engvall y col., Immunochem. 8 871 (1991). Alternativamente, puede usarse la técnica de captura de anticuerpos descrita en Beckmann y col., J. Immunol. 144 4212 (1990). Las células de hibridoma positivas pueden inyectarse intraperitonealmente en ratones Balb/c singénicos para producir una ascitis que contiene altas concentraciones de anticuerpos monoclonales creados contra el epítipo usado de la secuencia N-terminal del receptor del tipo 1 de la angiotensina II descrito anteriormente. Alternativamente, se pueden hacer crecer las células de hibridoma *in vitro* en matraces o frascos rotatorios mediante diversas técnicas. Los anticuerpos monoclonales producidos en ascitis de ratón pueden purificarse mediante precipitación con sulfato amónico, seguida de una cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente puede usarse una cromatografía de afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o a la proteína G, como puede usarse la cromatografía de afinidad basada en la unión del epítipo para generar el anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal 6313/G2 se preparó según se describe en Barker y col., J. Mol. Endocrinol. 11 241-245 (1993). Los usos del anticuerpo en el tratamiento de la hipertensión y del control de las contracciones uterinas se describieron en el documento WO-A-9509186. Sin embargo, no había ninguna sugerencia de una utilidad más amplia en otras potenciales áreas terapéuticas.

El receptor de tipo 1 de la angiotensina II de rata se describe en Murphy y col., Nature 351 233-236 (1992), y el dominio extracelular identificado que contiene al menos los residuos 8 a 17 está representado por la secuencia de aminoácidos

EDGIKRIQDD

Los epítipos de los residuos de la secuencia N-terminal 1 a 45, preferiblemente 8 a 17, del receptor de tipo 1 de la angiotensina II descritos anteriormente pueden variarse o modificarse mediante sustitución, y/o inserción, y/o deleción de aminoácidos, de forma que la forma global y/o la conformación del epítipo todavía sea antigénica.

En las formas de realización preferidas de la invención, el anticuerpo monoclonal es 6313/G2. El anticuerpo monoclonal 6313/G2 es secretado por una línea celular de hibridoma depositada el 21 de julio 1993 en la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales (ECACC), Porton Down, Reino Unido, bajo el tratado de Budapest, y designado mediante el número de acceso 93072117. La línea celular de hibridoma puede cultivarse adecuadamente en condiciones estándar.

En los usos de la presente invención, el tratamiento del cáncer puede incluir, pero no se limita a, la inhibición de la metástasis, la inhibición de la unión a las proteínas de la matriz de las células tumorales, la inhibición de la invasión por las células tumorales y la inhibición de la proliferación celular tumoral. Algunos ejemplos de tumores cancerosos que pueden ser susceptibles de dicho tratamiento incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama y cáncer de próstata.

Los anticuerpos usados según la presente invención pueden formularse para su inyección intravenosa usando los coadyuvantes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables apropiados. La inyección puede ser intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, incluyendo la inyección subcutánea. No se excluyen otras formas de administración, tales como, por ejemplo, liposomas por vía oral, cápsulas con recubrimiento entérico, y similares.

5 Adecuadamente, los anticuerpos usados según la presente invención pueden ser anticuerpos humanizados según se describe en el documento US 4.816.567 y en el documento WO 94/10332; o microcuerpos según se describe en el documento WO 94/09817; o anticuerpos transgénicos según se describe en el documento GB-A-2272440. Dichos constructos sintéticos incluyen moléculas quiméricas. Así, por ejemplo, los usos de los anticuerpos humanizados (o primatizados), o de derivados de los mismos, están en el ámbito de la presente invención. Un ejemplo de un anticuerpo humanizado es un anticuerpo con unas regiones variables humanas pero con regiones hipervariables de roedor.

10 Además de anticuerpos completos, en este documento se describen usos de derivados de los anticuerpos monoclonales definidos anteriormente que son capaces de unirse al epítipo seleccionado de la región N-terminal del receptor de tipo 1 de la angiotensina II descrito anteriormente. Así, la presente desvelación también incluye usos de fragmentos de anticuerpos. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpos se proporcionan en Dougall y col., Tibtech 12 372-379 (1994).

15 Los fragmentos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')₂ y Fv (Roitt y col., "Immunology", segunda edición (1989), Churchill Livingstone, Londres). Los fragmentos Fv pueden modificarse para producir un constructo sintético conocido como molécula Fv de cadena única (scFv). Esta incluye un péptido conector unido covalentemente a V_h y V_l, regiones que contribuyen a la estabilidad de la molécula.

20 Otros constructos sintéticos incluyen péptidos CDR. Estos son péptidos sintéticos que comprenden determinantes de unión al antígeno. También pueden usarse miméticos de péptidos. Estas moléculas son habitualmente anillos orgánicos restringidos conformacionalmente que mimetizan la estructura de un bucle CDR y que incluyen cadenas laterales de interacción con el antígeno. Los usos de dichas moléculas permiten unirse al epítipo deseado, y también están, por lo tanto, en el ámbito de la presente desvelación.

En un segundo aspecto de la invención se prevé un péptido según se define en relación con el primer aspecto de la invención, para su uso en el tratamiento del cáncer.

25 Este aspecto de la invención también se extiende al uso de un péptido según se define en relación con el primer aspecto de la invención, en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En un tercer aspecto de la invención se prevé una composición de vacuna que comprende un péptido según se define en relación con el primer aspecto de la invención, para su uso en el tratamiento del cáncer.

30 Este aspecto de la invención también se extiende a una composición de vacuna que comprende un péptido según se define en relación con el primer aspecto de la invención, en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

35 La composición de vacuna comprende un polipéptido con la secuencia anterior, opcionalmente conjugado con una proteína portadora. Los medios para transformar dichas proteínas o péptidos en antigénicos se definen anteriormente en relación con los aspectos tempranos de la invención. Por ejemplo, una proteína albúmina, tal como albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina y ovoalbúmina. Alternativamente puede usarse proteína de lapa californiana (también denominada a menudo hemocianina de lapa californiana). En la composición de vacuna también puede haber presentes otros coadyuvantes, por ejemplo, un coadyuvante de saponina, por ejemplo, una saponina de *Quillaja* o un derivado de la misma.

En este documento se describe un método para la inhibición del crecimiento celular, la adhesión o la invasión del cáncer que comprende:

- 40 (1) formular un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo con un péptido que comprende la porción N-terminal del receptor de tipo 1 de la angiotensina II según se definió anteriormente, opcionalmente conjugado con un péptido o proteína portadora, en un coadyuvante y/o diluyente farmacéuticamente aceptable apropiado, tal como para inyección intravenosa
- 45 (2) opcionalmente, formular adicionalmente la preparación del anticuerpo monoclonal de (1) como una formación liposómica o una cápsula con recubrimiento entérico
- (3) administración de la formulación de (2) ó (3) a una población de células cancerosas *in vitro* o a un sujeto que padece cáncer.

Alternativamente, esta forma de realización puede también comprender únicamente las etapas (1) y (2).

50 Dichas formas de realización extienden el uso de dichas formulaciones en la preparación de medicamentos para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de mama (incluyendo la adhesión o la invasión de células de cáncer de mama).

Las características preferidas del segundo y los subsiguientes aspectos de la invención son como para el primer aspecto, *mutatis mutandis*.

Le invención se describirá ahora adicionalmente a modo de referencia con los siguientes Ejemplos y Figuras, que se proporcionan únicamente con propósitos ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de la invención. Se hace referencia a un número de Figuras, en las que:

La FIGURA 1 muestra los efectos del anticuerpo sobre la proliferación de células PNT1a.

5 La FIGURA 2 muestra los efectos del anticuerpo sobre la proliferación de células del músculo liso aórtico analizando la captación de timidina tritiada.

La FIGURA 3 muestra los resultados del ensayo de adhesión celular de células MCF-7 sobre la proteína de la matriz extracelular.

10 La FIGURA 4 muestra los resultados del ensayo de quimioinvasión de células MCF-7 sobre la proteína de la matriz extracelular.

La FIGURA 5 muestra los resultados de las inmunotransferencias Western en el ensayo de expresión de las integrinas alfa-3 y beta-1 en células de cáncer de mama.

La FIGURA 6 muestra la estimulación del anticuerpo 6313/G2 en las respuestas al calcio de células MCF-7.

La FIGURA 7 muestra la estimulación del anticuerpo 6313/G2 en las respuestas al calcio de RASMC.

15 La FIGURA 8 muestra un diagrama esquemático de las acciones de la angiotensina II, el sitio de activación del anticuerpo monoclonal y el sitio de bloqueo del anticuerpo monoclonal.

La FIGURA 9 muestra las homologías de secuencia de las secuencias N-terminales del receptor de tipo 1 de la angiotensina II de diferentes especies, donde "X" denota un residuo ausente, y "-" denota un residuo idéntico.

20 **Ejemplo 1: el anticuerpo 6313/G2 inhibe la proliferación celular en células PNT1A prostáticas**

La sal de tetrazolio, bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), se usa ampliamente como indicador de la actividad metabólica oxidativa celular. En la reducción, el MTT forma un producto de formazán intensamente coloreado, que puede medirse colorimétricamente, y por lo tanto se usa a menudo para la valoración cuantitativa de la viabilidad y la proliferación celulares.

25 Se sembró PNT1a, una línea celular epitelial prostática, en una placa de cultivo de 96 pocillos a una concentración de 1.000 células por pocillo. Las células se hicieron crecer en presencia de RPMI 1640 complementado con L-glutamina 2 mM, un 1% de aminoácidos no esenciales, un 2% de penicilina y de estreptomina, y piruvato sódico 1 mM, un 10% de suero bovino fetal, durante dos días, y subsiguientemente se hicieron quiescentes mediante incubación en medio RPMI 1640 exento de suero (200 µl/pocillo) durante 24 h. Entonces se añadieron estimulantes a una concentración apropiada, y se incuban durante 24 h y 96 h. Cuatro horas antes del fin de la incubación se añadieron 20 µl de una disolución de 5 mg/ml (en medio RPMI) de MTT filtrada (0,2 µm de tamaño de poro) a cada pocillo, y la incubación continuó a 37°C. En el punto temporal apropiado se añadieron a cada pocillo 200 µl de DMSO> seguido por 25 µl de tampón de glicina de Sorensen (glicina 0,1 M, NaCl 0,1M, ajustado a pH 10,5 con NaOH 1 M), y se mezcló concienzudamente, después de 5 minutos se leyó la absorbancia a 545 nm.

35 Los resultados se muestran en la Figura 1, en la que se ha añadido anticuerpo purificado (ab) a las células PNT1a del cultivo. Las concentraciones de anticuerpo fueron (1:1.600) 100 nmol/l, (1:160) 1 µmol/l, (1:16) 10 µmol/l. La inhibición de la proliferación fue significativa (P<0,05 o mejor) a todas las concentraciones de anticuerpo usadas.

Ejemplo 2: el anticuerpo 6313/G2 inhibe la proliferación celular en células del músculo liso vascular

40 Se aislaron ASMCs a partir de la arteria torácica y abdominal de rata (RASMC) y de aorta bovina (BASMC) mediante el método de explante de medio, y se cultivaron durante varios pasos. Los segmentos de ambas aortas abdominal y torácica se obtuvieron a partir de ratas mediante una cuidadosa disección de las ratas muertas. Los segmentos de aorta se obtuvieron a partir de terneros anestesiados. Los segmentos de aorta se colocaron en un portaobjetos excavado que contiene medio de cultivo tisular, tras lo cual se retiraron cuidadosamente la porción adventicia y exterior de cada segmento bajo un microscopio de disección. La porción interna remanente del tejido y la capa interna se eliminaron en una placa de disección por separado y se lavaron varias veces con medio de cultivo nuevo. En este punto, cada segmento se cortó en cuadrados de aproximadamente 1 mm y se colocaron en un matraz de cultivo tisular de 25 cm². Los matraces se taparon débilmente y se colocaron en una estufa de incubación de CO₂ humidificada. Después de dos horas se añadieron cuidadosamente 4 ml de medio de cultivo RPMI-1640 complementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 4 µmol/L de L-glutamina y FBS al 20% a los matraces sin desplazar el tejido. Las muestras se alimentaron con medio nuevo después de una semana. Las células de los explantes eran relativamente confluyentes en un periodo de aproximadamente 2 semanas. Entonces se lavaron con PBS, y subsiguientemente se tripsinizaron con una disolución de tripsina al 0,125% y EDTA al 0,02% en PBS durante 1-2 minutos a 37°C. La suspensión de células resultante se pipeteó en matraces de cultivo tisular de 75 cm² que contenían 10 ml de medio de cultivo, y se incubaron como anteriormente. Los experimentos se

realizaron con las células de los pasos 3-5.

Se preparó una suspensión de RASMC (10^5 células/ml) el primer día del experimento usando RPMI-1640 complementado con un 20% de FBS. Se distribuyó un ml de esta suspensión celular en cada pocillo de una placa de 24 pocillos. El medio se sustituyó 24 h después del subcultivo por medio RPMI-1640. Las células quiescentes (derivadas del suero) o las células con reservas de suero se incubaron con el medio experimental apropiado durante 48 horas, 4 pocillos por grupo. Se añadieron a cada pocillo 10 μ l de 3 H-metiltimidina (0,1 mCi/ml) (1 ml de medio/pocillo). 24 horas después de la adición de la timidina radioactiva, los medios se aspiraron y las células cultivadas se lavaron 3 veces con PBS frío. Entonces las células se disolvieron en 0,5 ml de NaOH 0,1 N, y se mezcló una alícuota de 0,3 ml con 3,5 ml de fluido de centelleo, y después de reposar hasta el día siguiente a temperatura ambiente, se ensayó el contenido en tritio en un contador de líquido de centelleo.

Los resultados se muestran en la Figura 2, en la que se estimuló la proliferación con 10 nmol/l de angiotensina II y se inhibió con 6313/G2 (10 μ mol/L, **P<0,01).

Ejemplo 3: el anticuerpo 6313/G2 inhibe la proliferación celular en células de cáncer de mama

Se colocaron en placas células MCF-7 (obtenidas en la American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA 20108, EE.UU.) en placas de 24 pocillos a una densidad de 5.000 células por pocillo y se hicieron crecer durante 24 horas en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) que contenía un 5% de suero bovino fetal (FBS). Las células se incubaron entonces durante 24 horas adicionales en medio sin suero. Después de esto, las células se hicieron crecer bien sólo en medio sin suero (pocillos de control) o bien en medio sin suero con la adición de pocillos experimentales de angiotensina II sola (1-10 nM), o con el anticuerpo 6313/G2. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado. Las células se cultivaron entonces durante 24 horas. Después de 20 horas se añadió timidina tritiada a cada pocillo (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, Reino Unido, 50 μ Ci/ml, actividad sp. 5 Ci/ mmol) y las células se cultivaron durante 4 horas adicionales. Al final de este periodo el medio se aspiró y las células cultivadas se lavaron tres veces con una disolución tampón enfriada en hielo (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4). Entonces las células se disolvieron en 1 ml de NaOH 0,1 N y se mezclaron 0,5 ml de esta disolución con 3,5 ml de cóctel de centelleo (líquido de centelleo de tolueno, Packard Bioscience B.V. Groningen, Holanda) y se ensayó el contenido en tritio.

Ejemplo 4: el anticuerpo 6313 inhibe la adhesión de células de cáncer de mama

Se lleva a cabo un ensayo de adhesión celular de células MCF-7 en proteína de matriz extracelular para investigar. Se recubrieron placas de cultivo celular de 96 pocillos (de fondo redondo) con cantidades graduales de proteína de matriz humana purificada, colágeno de tipo IV (50 μ g/pocillo). Se dejaron hasta el día siguiente en una cámara de flujo laminar para evaporar, a temperatura ambiente.

Se trataron células MCF-7 (obtenidas en la American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA 20108, EE.UU.) con anticuerpo 6163/G2 durante 48 horas. Los controles no se trataron. Antes de su uso, cada pocillo se trató con BSA (200 μ g/ml) para eliminar la unión no específica.

Se añadieron 500 células MCF-7 en medio de cultivo celular (DMEM) a cada pocillo y se incubaron a 37°C en un entorno con un 5% de CO₂ durante 1 hora. Entonces los pocillos se lavaron 3 veces con DMEM sin suero y se tiñeron con Diff-quick fix (7 segundos), Diff quick I (7 segundos) y Diff quick II (10 segundos) y se lavaron una vez con agua.

Entonces los pocillos se observaron con un microscopio, y se contaron las cifras de células adherentes. El anticuerpo 6313/G2 redujo significativamente la adhesión celular (P<0,05). Los resultados se muestran en la Figura 3, en la que el número de células MCF-7 adheridas a colágeno (50 μ g/pocillo) frente a los tratamientos con y sin anticuerpo 6313.

Ejemplo 5: el anticuerpo 6313 inhibe la invasión de células de cáncer de mama

Se llevó a cabo un ensayo de quimioinvasión de células MCF-7 en proteína de matriz extracelular para investigar. Se recubrieron insertos de filtro de 8 μ m co proteína de matriz de colágeno humana de tipo IV y se dejaron hasta el día siguiente en una cámara de flujo laminar para secarse a temperatura ambiente. Las células MCF-7 se trataron con anticuerpo 6163/G2 (sobrenadante de hibridoma) durante 48 horas. Las células de control no se trataron.

Antes de su uso, se añadió BSA (100 μ g/ml) a cada pocillo durante 1 hora. Se usó DMEM preacondicionado mediante incubación con células de fibroblastos 3T3 como quimioattractor. Los insertos recubiertos se colocaron en cada pocillo para formar una cámara superior y una inferior. Se añadieron 10.000 células MCF-7 a la cámara superior con la adición de DMEM sin suero. El medio celular condicionado de 3T3 se colocó en el compartimento inferior. Las placas se recubrieron y se incubaron a 37°C en un entorno de un 5% de CO₂ uno edificado durante 24 horas.

Tras la incubación, las células remanentes en la superficie superior del filtro se retiraron completamente y las células que habían atravesado el colágeno y se habían unido a la superficie inferior del filtro se tiñeron con Diff-Quik y se contaron. Los resultados se muestran en la Figura 4, en la que el número de células MCF-7 que invadieron a través

del colágeno (50 µg/pocillo) frente a los tratamientos con y sin anticuerpo 6313. El anticuerpo 6313 inhibió significativamente la invasión celular ($P > 0,01$).

Ejemplo 6: efecto del anticuerpo 6313 sobre la expresión de integrinas en células de cáncer de mama

5 Se investigó el efecto del anticuerpo 6313/G2 sobre la expresión de integrinas. Los resultados muestran que el anticuerpo 6313 reduce significativamente la expresión de las integrinas alfa 3 y beta 1 en células de cáncer de mama.

Se trataron las líneas celulares MCF-7 durante 48 horas con anticuerpo 6313/G2, los controles no se trataron. Se prepararon fracciones de membrana celular y se fraccionaron en gel SDS-PAGE al 8% no reducido.

Entonces las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa hasta el día siguiente, 30 V a 4°C.

10 Se usaron anticuerpos primarios y secundarios para las integrinas $\alpha 3$ y $\beta 1$ para detectar estos componentes en las membranas de nitrocelulosa usando los métodos establecidos para inmunotransferencia Western. Las bandas luminiscentes se desarrollaron incubando la membrana con reactivos de detección de inmunotransferencia western de quimioluminiscencia mejorada (ECL) durante 1 min mediante exposición a hiperfilm ECL. Los resultados se muestran en la Figura 5, en la que, C = control, A = anticuerpo ensayado, otros carriles (M) son marcadores de peso molecular.

Ejemplo 7: efecto del anticuerpo 6313 sobre las respuestas al calcio en células MCF-7 y en RASMC

Se investigó el efecto del anticuerpo 6313 sobre las respuestas al calcio en células MCF-7 y en RASMC. Se encontró que el anticuerpo 6313 estimula en ambas la respuesta al calcio.

20 Para la medición del ión calcio ($[Ca^{2+}]$), las células se cargaron con fura-2 1 µM durante 30 minutos en una disolución de bicarbonato modificada con medio de Krebs-Ringer (K^+ 3,6 mM, Ca^{2+} 1,2 mM, Mg^{2+} 0,5 mM, Hepes 5 mM y HCO^- 20 mM) a 37°C. Para mediciones simultáneas de la medición de la fluorescencia de fura-2, las células se colocaron en placas con cubreobjetos en el soporte de un microscopio invertido (Zeiss) en una disolución de bicarbonato de Krebs-Ringer modificada. Las longitudes de onda de excitación fueron de 340 nm y de 380 nm, y se detectó emisión a 510 nm. La concentración de ión calcio ($[Ca^{2+}]$) se calculó partir de la proporción entre las intensidades de fluorescencia a las longitudes de onda de excitación de 340 nm y de 380 nm.

25 Los resultados se muestran en la Figura 6, en células MCF-7 y en RASMC. La fecha vertical indica el punto de aplicación del anticuerpo 6313/G2. La proporción creciente de intensidades de fluorescencia es proporcional a la concentración intracelular de ión calcio.

30

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une a un péptido consistente en la secuencia
EDGTKRIQDD
para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 5 2. Un anticuerpo monoclonal para su uso según se reivindica en la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal se crea contra el péptido
EDGIKRIQDD.
3. Un anticuerpo monoclonal para su uso según se reivindica en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado.
- 10 4. Un anticuerpo monoclonal para su uso según se reivindica en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, en el que el anticuerpo monoclonal es 6313/G2 producido mediante la línea celular de hibridoma designada por el número de acceso 93072117 de la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales (ECACC).
5. Un péptido según se define en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 15 6. Una composición de vacuna que comprende un péptido según se define en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento del cáncer.
7. Una composición de vacuna para su uso según se reivindica en la reivindicación 6, en la que el péptido está conjugado con una proteína portadora.
8. El uso de un anticuerpo monoclonal que se une a un péptido consistente en la secuencia
EDGIKRIQDD
en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 20 9. Un uso según se reivindica en la reivindicación 8, en el que el anticuerpo monoclonal se crea contra el péptido
EDGIKRIQDD.
10. Un uso según se reivindica en la reivindicación 8 o en la reivindicación 9, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado.
- 25 11. Un uso según se reivindica en la reivindicación 8 o en la reivindicación 9, en el que el anticuerpo monoclonal es 6313/G2 producido mediante la línea celular de hibridoma designada por el número de acceso 93072117 de la ECACC.
12. El uso de un péptido según se define en la reivindicación 1 o de una composición de vacuna que comprende un péptido según se define en la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 30 13. Un uso según se reivindica en la reivindicación 12, en el que el péptido está conjugado con una proteína portadora.

Efectos del anticuerpo sobre la proliferación de células PNT1a

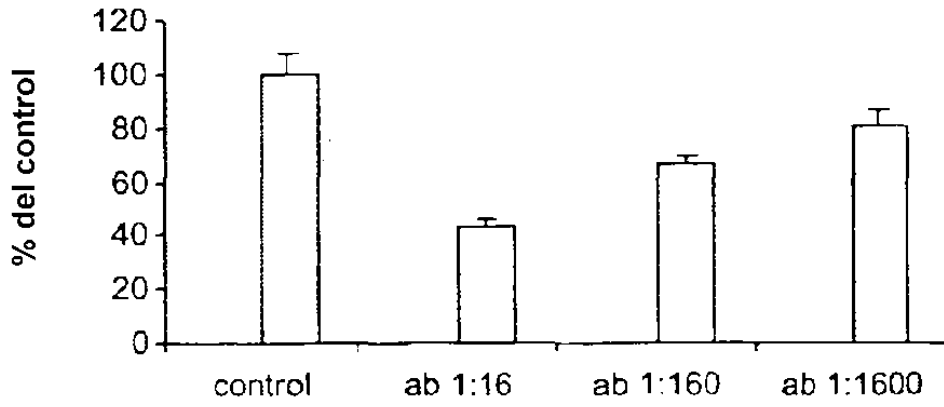


FIG. 1

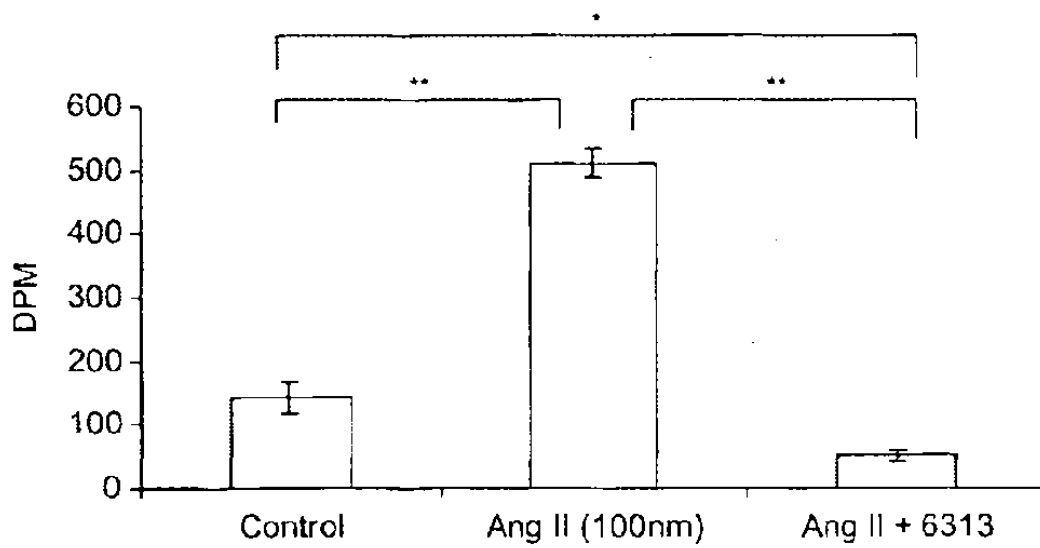


FIG. 2

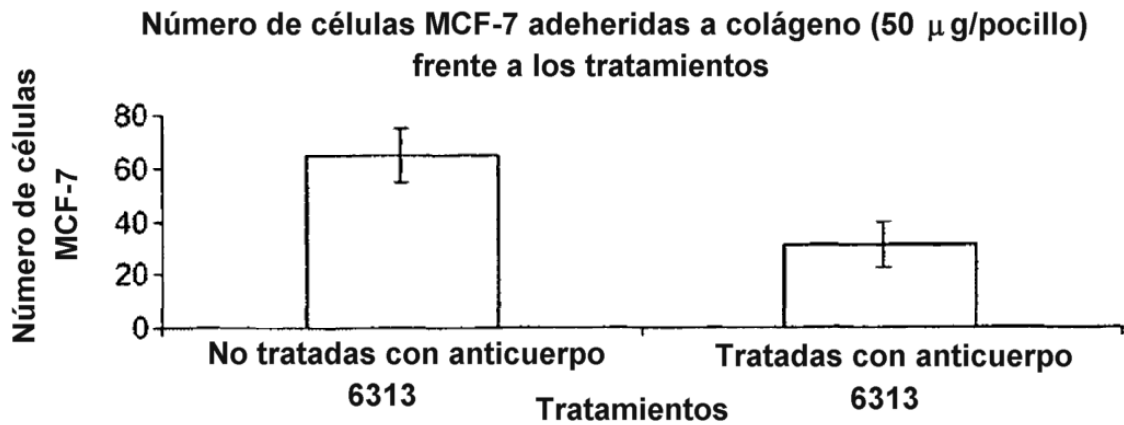


FIG. 3

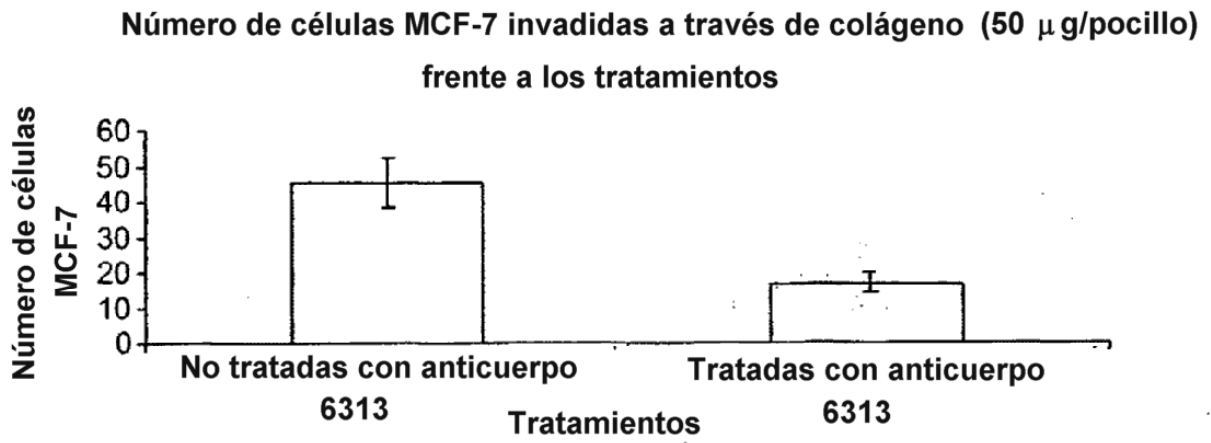


FIG. 4

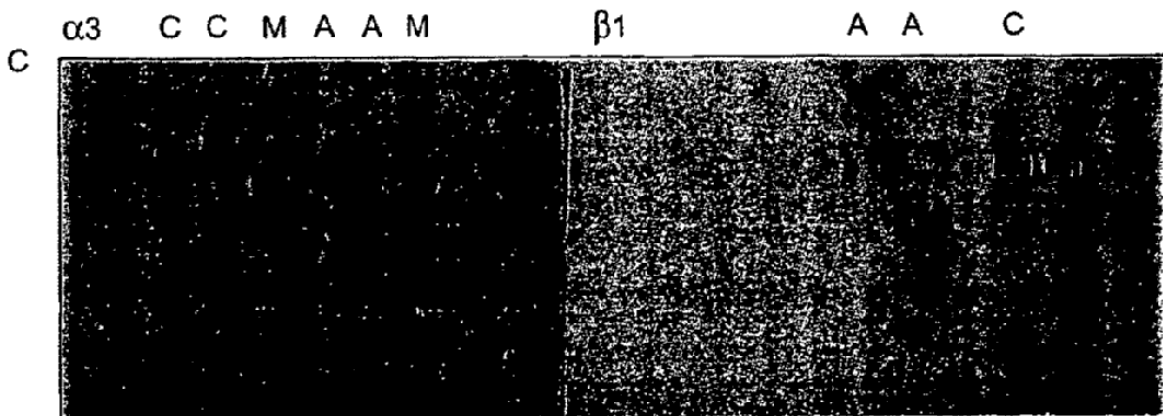


FIG. 5

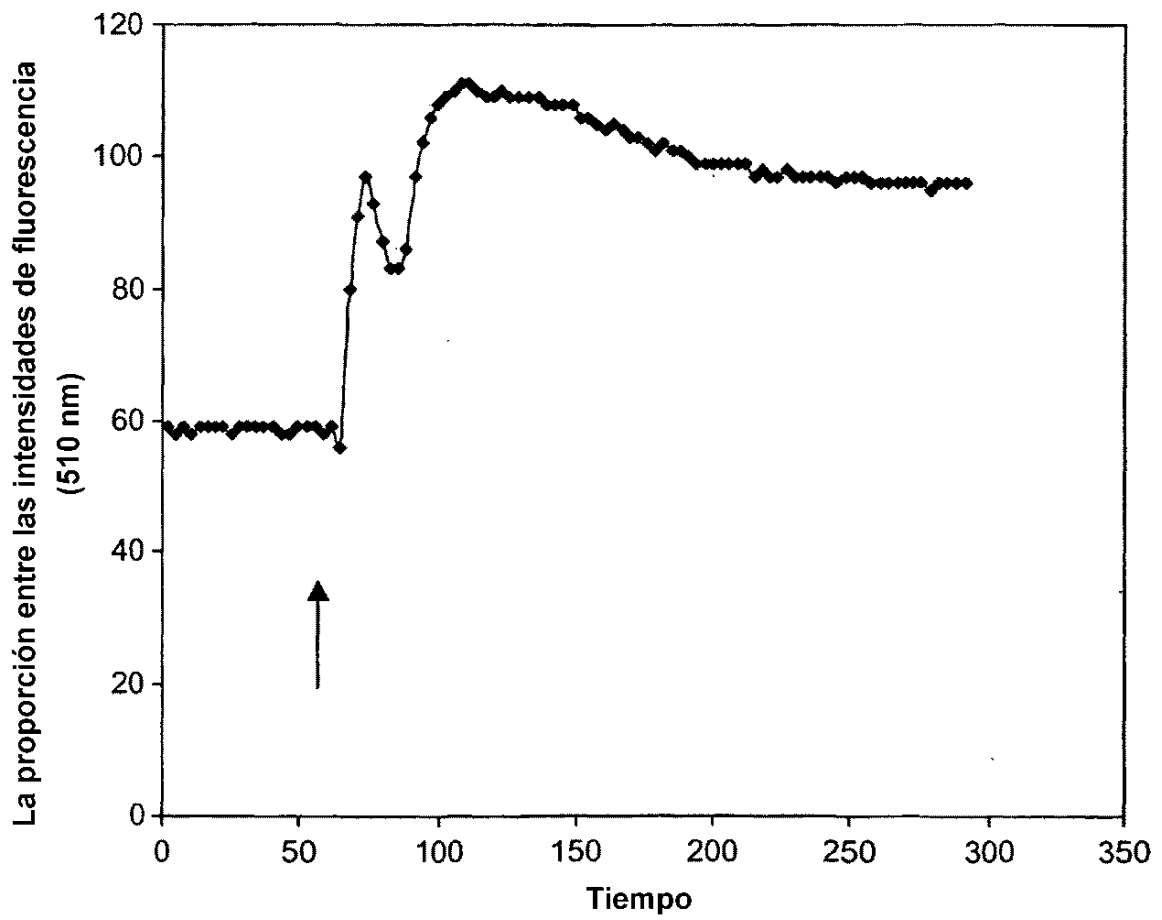


FIG. 6

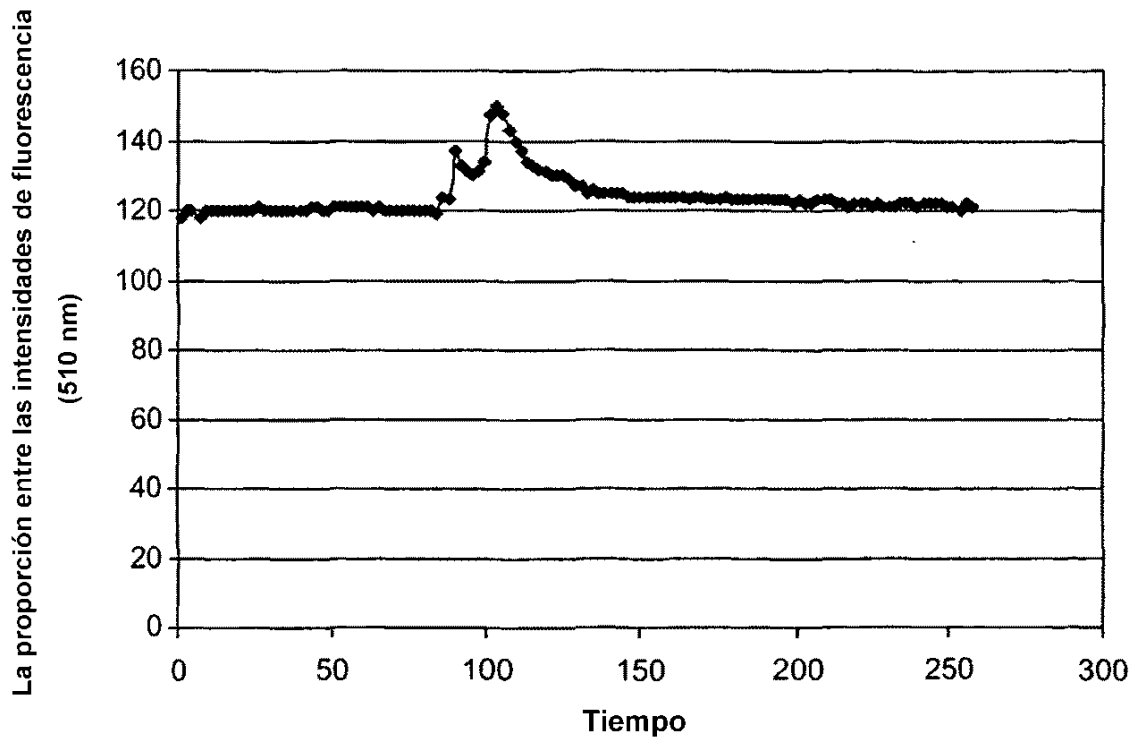


FIG. 7

Acciones de la angiotensina II

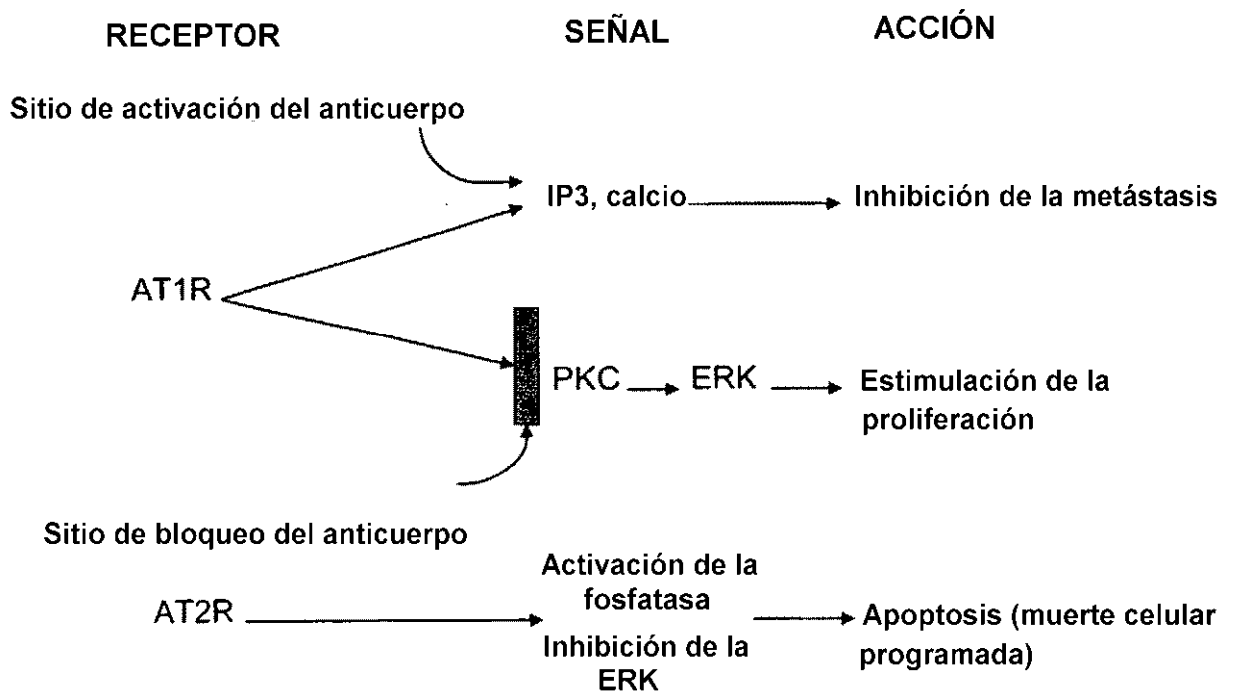


FIG. 8

AT1 humano	MILNSST	<u>EDGIKRIQDD</u>	CPKAGRHNYIFVMIPTLYSIIFVVGIFG
AT1 de chimpancé	-----	-----	-----
AT1b murino	-----	-----	-----
AT1 bovino	-----	-----	-----I-----
AT1 canino	-----	-----	-----
AT1 ovino	-----	-----	-----I-----L--
AT1 de conejo	-M-----	-----	-----
AT1b de rata	-----	-----	-----M-----
AT1 de cobaya	-----	Q-----	---X---S-----
AT1a de rata	-X----X	D-----	-----S-----
AT1a de ratón	-X----X	-----	--XS--S-----M-----
AT1 de jerbo	-X----X	D-----	-----S-----

- Denota in residuo idéntico

X denota residuos ausente

FIG. 9