

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 081**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (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: **18.02.2009 E 09713029 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 2262833**

54 Título: **Análogo sintético de scFv de las regiones variables del anticuerpo monoclonal 6313/G2 (anti-receptor de tipo 1 de la angiotensina II)**

30 Prioridad:

**18.02.2008 GB 0802931**

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

**23.05.2013**

73 Titular/es:

**QUEEN MARY & WESTFIELD COLLEGE,  
UNIVERSITY OF LONDON (100.0%)  
Mile End Road  
London E1 4NS, GB**

72 Inventor/es:

**VINSON, GAVIN PAUL;  
BARKER, STEWART y  
PUDDEFOOT, JOHN RICHARD**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 404 081 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

Análogo sintético de scFv de las regiones variables del anticuerpo monoclonal 6313/G2 (anti-receptor de tipo 1 de la angiotensina II)

5 La presente invención se refiere a un análogo sintético de scFv (R6313/G2) de los dominios variables del anticuerpo monoclonal 6313/G2 anti-receptor de tipo 1 de la angiotensina II.

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

15 Un anticuerpo monoclonal 6313/G2 para el subtipo de receptor AT1 (Barker et al. *J. Mol. Endocrinol.* 11 241-245 (1993)) se ha utilizado para estudiar la distribución del receptor (Vinson et al. *Mol. Med. Today* 1 35-38 (1995)). Se ha sugerido que el anticuerpo monoclonal se podría utilizar como agente terapéutico para el control vasoconstrictor, por ejemplo, en el tratamiento de la hipertensión o de otra contracción de células del músculo liso (por ejemplo, uterino).

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

25 El anticuerpo monoclonal 6313/G2 es secretado por una línea de células de hibridoma, depositada el 22 de julio de 1993 en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (ECACC), Porton Down, Reino Unido, bajo el Tratado de Budapest, y designada por el número de entrada 93072117. El depósito fue hecho 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 para hacer referencia al material depositado en la solicitud de patente y ha dado su consentimiento sin reservas e irrevocable para que el material depositado esté a disposición del público, de conformidad con la Regla 28(1)(d) del Convenio sobre la Patente Europea.

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

35 EDGIKRIQDD.

O, de forma alternativa, expresada como,

NH<sub>2</sub>-Glu-Asp-Gly-Ile-Lys-Arg-Ile-Gln-Asp-Asp-COOH

40 Se han preparado anticuerpos monoclonales para la secuencia peptídica que comprende la secuencia N-terminal del receptor de tipo 1 de la angiotensina II (Barker et al. *Journal of Molecular Endocrinology* 11 241-245 (1993); documento WO 95/09186). Se ha descrito que tales anticuerpos monoclonales tienen usos terapéuticos adicionales en ciertas afecciones médicas en las que dichos usos no se habían sugerido ni mostrado anteriormente (documento WO2004/018519). Estos efectos terapéuticos se observan en la capacidad de los anticuerpos monoclonales para bloquear las acciones perjudiciales de la angiotensina II en las afecciones médicas en cuestión, sin menoscabo de las acciones beneficiosas de la molécula.

45 Se ha descubierto ahora que análogos sintéticos de scFv de anticuerpos monoclonales específicos del receptor AT1 poseen propiedades ventajosas e inesperadas que contribuyen al uso de tales análogos en la terapia o en el tratamiento de enfermedades. Los inventores han producido tanto análogos de scFv de murino como variantes humanizadas de los análogos de scFv de murino.

50 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una molécula de unión específica que se une específicamente a un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de EDGIKRIQDD procedente del receptor de tipo 1 de la angiotensina II y que no reduce la presión arterial en reposo y que comprende un polipéptido que tiene un dominio V<sub>L</sub> de inmunoglobulina ligado a un dominio V<sub>H</sub> de inmunoglobulina, en donde el dominio V<sub>L</sub> comprende las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR, del inglés, "Complementarity Determining Regions") VLCDR1, VLCDR2 y VLCDR3, y en donde el dominio V<sub>H</sub> comprende las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) VHCDR1, VHCDR2 y VHCDR3, teniendo cada una una de las siguientes secuencias de

aminoácidos respectivas, en donde

VHCDR1 es GYSFTGYNMN o GYSFTGYNMS  
 VHCDR2 es NIDPYYGGTTYNQKFKG  
 VHCDR3 es EVDY

5 VLCDR1 es RASKSVSTSGYSYMH  
 VLCDR2 es LVSNLES o LVSDLED  
 VLCDR3 es QHIRELTRSEG

o CDR con una secuencia de aminoácidos con al menos 85% de identidad con estas.

10 En una realización de la invención, las CDR de la molécula de unión específica tienen las siguientes secuencias de aminoácidos

VHCDR1 es GYSFTGYNMN o GYSFTGYNMS  
 VHCDR2 es NIDPYYGGTTYNQKFKG  
 VHCDR3 es EVDY  
 15 VLCDR1 es RASKSVSTSGYSYMH  
 VLCDR2 es LVSNLES o LVSDLED  
 VLCDR3 es QHIRELTRSEG.

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

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

30 La presente invención también se extiende a variantes de las secuencias peptídicas mencionadas anteriormente. Un ejemplo de una variante de la presente invención es una proteína de fusión que comprende un péptido tal y como se ha definido anteriormente, además de la sustitución de uno o varios aminoácidos por uno o varios aminoácidos distintos. El experto en la técnica es consciente de que diversos aminoácidos tienen propiedades similares. Uno o varios de tales aminoácidos de una sustancia se pueden sustituir frecuentemente por uno o varios aminoácidos distintos, sin perder una actividad deseada de esa sustancia.

35 Así, los aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina se pueden sustituir frecuentemente entre sí (aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas). Entre estas posibles sustituciones, se prefiere que la glicina y la alanina se empleen para sustituirse entre sí (ya que tienen cadenas laterales relativamente cortas) y que valina, leucina e isoleucina se empleen para sustituirse entre sí (ya que tienen cadenas laterales alifáticas más largas que son hidrófobas). Otros aminoácidos que se pueden sustituir frecuentemente entre sí incluyen: fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas); lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas); aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas); asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales de tipo amida); y cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

45 Las sustituciones de esta naturaleza se denominan frecuentemente sustituciones "conservadoras" o "semiconservadoras" de aminoácidos.

50 También se pueden hacer delecciones o inserciones de aminoácidos con relación a la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión mencionada anteriormente. Así, por ejemplo, los aminoácidos que no tienen un efecto sustancial sobre la actividad del polipéptido, o al menos que no eliminan tal actividad, se pueden eliminar. Tales delecciones pueden ser ventajosas puesto que la longitud total y el peso molecular de un polipéptido se pueden reducir, a la vez que se conserva la actividad. Esto puede permitir reducir la cantidad de polipéptido requerida para un propósito en particular, por ejemplo, los niveles de dosificación se pueden reducir.

55 También se pueden realizar inserciones de aminoácidos con relación a la secuencia de la proteína de fusión mencionada anteriormente. Esto puede hacerse para alterar las propiedades de una sustancia de la presente invención (por ejemplo, para facilitar la identificación, purificación o expresión, tal y como se explica más arriba en relación con las proteínas de fusión).

Se pueden hacer cambios de aminoácidos respecto a la secuencia proporcionada anteriormente, usando cualquier técnica adecuada, por ejemplo, mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio o síntesis en estado sólido.

5 Se debe apreciar que las sustituciones o inserciones de aminoácidos dentro del alcance de la presente invención se pueden hacer utilizando aminoácidos presentes en la naturaleza o aminoácidos no presentes en la naturaleza. Sin importar si se emplean aminoácidos naturales o sintéticos, se prefiere que solo estén presentes aminoácidos L.

10 "Identidad", tal y como se conoce en la técnica, es la relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, tal y como se determina comparando las secuencias. En la técnica, la identidad significa también el grado de parentesco en la secuencia, entre secuencias de polipéptidos o polinucleótidos, según sea el caso, tal y como se determina por las coincidencias entre las cadenas de tales secuencias. Aunque existe una serie de métodos para medir la identidad entre las secuencias de dos polinucleótidos o dos polipéptidos, los métodos empleados generalmente para determinar la identidad están codificados en programas informáticos. Los programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, sin carácter limitante, el paquete de programas GCG (Devereux, et al., *Nucleic Acids Research*, 12, 387 (1984), BLASTP, BLASTN y FASTA (Atschul et al., *J. Molec. Biol.* 215, 403 (1990).

15 La secuencia de aminoácidos de las CDR de la invención tiene al menos 85% de identidad, utilizando los parámetros por defecto del programa informático BLAST (Atschul et al., *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990)) proporcionado por HGMP (Human Genome Mapping Project), a nivel de aminoácidos, con las secuencias de aminoácidos de las CDR de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> descritas anteriormente.

20 Más preferiblemente, la secuencia de CDR puede tener al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o al menos 99% de identidad, a nivel de aminoácidos, con las secuencias mostradas anteriormente.

En una realización de la invención, la molécula de unión específica puede tener una de las siguientes disposiciones de CDR

25 (Rb313clon12D y variantes humanizadas HuCY y var3)  
 VHCDR1: GYSFTGYNMN  
 VHCDR2: NIDPYYGGTFYNQKFKG  
 VHCDR3: EVDY  
 VLCDR1: RASKSVSTSGYSYMH  
 VLCDR2: LVSNLES  
 VLCDR3: QHIRELTRSEG

30 o  
 (R6313clon11B)  
 VHCDR1: GYSFTGYNMS  
 VHCDR2: NIDPYYGGTTYNQKFKG  
 VHCDR3: EVDY  
 35 VLCDR1: RASKSVSTSGYSYMH  
 VLCDR2: LVSNLES  
 VLCDR3: QHIRELTRSEG

o  
 40 (Variante humanizada var4)  
 VHCDR1: GYSFTGYNMN  
 VHCDR2: NIDPYYGGTTYNQKFKG  
 VHCDR3: EVDY  
 VLCDR1: RASKSVSTSGYSYMH  
 VLCDR2: LVSDLED  
 45 VLCDR3: QHIRELTRSEG.

50 En una realización de la invención, la molécula de unión específica puede comprender una cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) y una cadena ligera variable (V<sub>L</sub>) conectadas por un conector peptídico. El conector puede comprender de 1 a 20 aminoácidos, como por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 aminoácidos, 5, 10 o 15 aminoácidos, u otros números intermedios en el intervalo de 1 a 20, según sea conveniente. El conector peptídico puede estar formado por cualesquiera residuos aminoacídicos que sean convenientes en general, tales como glicina y/o serina. Un ejemplo de un conector adecuado es Gly<sub>4</sub>Ser. Se pueden utilizar multímeros de tales conectores, como por ejemplo, un dímero, un trímero, un tetrámero o un pentámero, por ejemplo, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>2</sub>, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub> o (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>5</sub>. Sin embargo, en otras realizaciones de la invención el conector peptídico puede no estar presente y el dominio V<sub>L</sub> puede estar ligado al dominio V<sub>H</sub> por un enlace peptídico.

55 La molécula de unión específica puede ser un análogo variable monocatenario (scFv). La molécula de unión

- específica o scFv puede estar ligada a otras moléculas de unión específica (por ejemplo, otros scFv, fragmentos Fab de anticuerpos, anticuerpos IgG quiméricos (por ejemplo, con regiones estructurales humanas)) o ligada a otros scFv de la invención, a fin de formar un multímero, que es una proteína de unión multispecífica, por ejemplo, un dímero, un trímero o un tetrámero. Los scFv biespecíficos se denominan a veces diacuerpos, los trispecíficos triacuerpos y los tetraespecíficos tetracuerpos, cuando cada scFv en el dímero, trímero o tetrámero tiene una especificidad diferente. Los diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos también pueden ser monoespecíficos, cuando cada scFv en el dímero, trímero o tetrámero tiene la misma especificidad.
- En una realización de la invención, la molécula de unión específica puede ser el scFv análogo del anticuerpo monoclonal identificado como R6313/G2. Este scFv también se denomina en esta memoria R6313clon12D o clon 12D y tiene la secuencia mostrada en la Figura 14. En otra realización de la invención, la molécula de unión específica puede ser el scFv análogo del anticuerpo monoclonal identificado como R6313clon11B, también denominado en esta memoria clon 11B, cuya secuencia se muestra también en la Figura 14.
- El scFv se puede preparar mediante cualquier técnica adecuada, utilizando técnicas químicas o de biología molecular convencionales. En una realización de la invención, los análogos del anticuerpo monoclonal se pueden preparar como scFv a partir de una genoteca de presentación de fagos con anticuerpos humanos sin tratamiento previo (McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990); y como se describe en el documento WO 92/01047).
- El análogo del anticuerpo monoclonal se puede humanizar mediante la modificación de la secuencia de aminoácidos del scFv. Los métodos para reducir la inmunogenicidad de las moléculas de unión específica de la invención pueden incluir el injerto de CDR en una estructura adecuada de la región estructural del anticuerpo o la remodelación de residuos variables de la superficie, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio u otras técnicas de biología molecular empleadas generalmente (Roguska et al. Protein Eng. 9 895-904 (1996)).
- Otros métodos aplicables pueden incluir la identificación de los posibles epítomos de linfocitos T dentro de la molécula, y la subsiguiente eliminación de estos, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio (desinmunización). La humanización de la molécula de unión específica puede ser deseable cuando la molécula se va a utilizar como un agente terapéutico. La humanización de las regiones CDR o de la secuencia de la región estructural circundante, se puede llevar a cabo según se desee.
- Los presentes inventores han producido variantes humanizadas del scFv R6313/G2, tal y como se describe en los Ejemplos.
- En una realización de la invención, la molécula de unión específica puede ser uno cualquiera o varios de los scFv humanizados identificados como HuCY, var3 y/o var4. Las secuencias de estos scFv humanizados se muestran en la Figura 14.
- En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión específica tal y como se ha descrito anteriormente.
- La composición empleada de acuerdo con este aspecto de la invención se puede formular para uso por cualquier vía conveniente. El medicamento se suministrará generalmente como parte de una composición farmacéutica estéril que incluirá normalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones de la invención se pueden emplear combinadas con un vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables o un adyuvante y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos pueden incluir, sin carácter limitante, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, liposomas, agua, glicerol, polietilenglicol, etanol y combinaciones de estos. Esta composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del método deseado para administrarla a un paciente).
- Se puede proporcionar como una forma farmacéutica unitaria, generalmente se proporcionará en un envase sellado y puede proporcionarse como parte de un kit. Tal kit incluirá normalmente (aunque no necesariamente) instrucciones de uso. Puede incluir una pluralidad de dichas formas farmacéuticas unitarias.
- La composición farmacéutica puede estar adaptada para una administración a través de cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía oral (que incluye la vía bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (que incluye la vía bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (que incluye la vía subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Tales composiciones se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica farmacéutica, por ejemplo, mezclando el principio activo con el(los) vehículo(s) o excipiente(s) en condiciones estériles.
- Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral pueden presentarse como unidades discretas, tales como cápsulas o comprimidos; como polvos o gránulos; como soluciones, jarabes o suspensiones (en líquidos acuosos o no acuosos; o como espumas o batidos comestibles; o como emulsiones).
- Los excipientes adecuados para comprimidos o cápsulas de gelatina dura incluyen lactosa, almidón de maíz o derivados de este, ácido esteárico o sus sales.
- Los excipientes adecuados para uso con cápsulas de gelatina blanda incluyen, por ejemplo, aceites vegetales,

ceras, grasas, polioles semisólidos o líquidos, etc.

Para la preparación de soluciones y jarabes, los excipientes que pueden usarse incluyen, por ejemplo, agua, polioles y azúcares. Para la preparación de suspensiones, pueden utilizarse aceites (por ejemplo, aceites vegetales) para proporcionar suspensiones de aceite en agua o de agua en aceite.

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

10 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica se pueden formular como ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles o aceites. Para las infecciones oculares u otros tejidos externos, por ejemplo, la boca y la piel, las composiciones se aplican preferiblemente como una pomada o una crema tópica. Cuando se formulan en forma de pomada, el principio activo puede emplearse con una base para pomada parafínica o miscible en agua. Como alternativa, el principio activo se puede formular como una crema con una base para crema de aceite en agua o una base de agua en aceite. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para una administración tópica en el ojo incluyen gotas oculares en donde el principio activo se disuelve o se suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en la boca incluyen grageas, pastillas y colutorios.

15 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración rectal pueden presentarse como supositorios o enemas.

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

25 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración por inhalación incluyen polvos o nebulizaciones de partículas finas que pueden generarse por medio de diversos tipos de aerosoles presurizados, nebulizadores o insufladores de dosis medidas.

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

35 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración parenteral incluyen una solución para inyección estéril acuosa y no acuosa que puede contener agentes antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que vuelven la formulación sustancialmente isotónica con la sangre del receptor al que se va a administrar; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas, las cuales pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Los excipientes que se pueden usar para las soluciones inyectables incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Las composiciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de dosis múltiple, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en estado seco y congelado (liofilizado) que requiere solo la adición del líquido estéril portador, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

40 Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes conservantes, agentes solubilizantes, agentes estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, odorantes, sales (las sustancias de la presente invención se pueden proporcionar ellas mismas en forma de una sal farmacéuticamente aceptable), tampones, agentes de recubrimiento o antioxidantes. También pueden contener agentes terapéuticamente activos además de la sustancia de la presente invención.

En algunas realizaciones, la formulación del concentrado de fármaco activo puede comprender un agente de tonicidad farmacéuticamente aceptable, un agente tamponador y un tensioactivo farmacéuticamente aceptable.

45 Como alternativa, la formulación puede comprender el principio activo más fosfato de sodio monobásico, fosfato sódico dibásico, cloruro sódico, polisorbato 80 o polisorbato 20 (tensioactivo para minimizar el riesgo de agregación inducida por agitación) y agua (USP/Ph.Eur), opcionalmente con un pH ajustado a aproximadamente 6,0-7,0, por ejemplo, aproximadamente 6,5.

El concentrado de fármaco activo puede estar o no liofilizado.

55 Otras formulaciones pueden comprender acetato de sodio trihidratado como agente tamponador, cloruro de sodio como modificador de la tonicidad, ácido acético para ajustar el pH y agua para inyección.

El concentrado de fármaco activo también se puede diluir en cloruro sódico al 0,9% antes de la administración.

Las dosificaciones de la sustancia de la presente invención pueden variar entre márgenes amplios, dependiendo de la enfermedad o del trastorno a tratar, la edad y el estado del individuo a tratar, etc., y un médico determinará finalmente las dosificaciones adecuadas que se van a utilizar.

- 5 Esta dosificación puede repetirse tantas veces como sea apropiado. Si aparecen efectos secundarios, la cantidad y/o la frecuencia de la dosificación se pueden reducir, de acuerdo con la práctica clínica normal.

10 Para la administración a mamíferos, y particularmente a seres humanos, se espera que la dosificación diaria del agente activo sea de 1 µg/kg a 10 mg/kg de peso corporal, típicamente de aproximadamente 10 µg/kg a 1 mg/kg de peso corporal. El médico determinará en cualquier caso la dosificación real que será la más adecuada para un individuo, lo que dependerá de factores que incluyen la edad, el peso, el sexo y la respuesta del individuo. Las dosificaciones anteriores son ejemplos del caso promedio. Puede haber, por supuesto, casos en donde sean adecuadas dosificaciones más altas o más bajas, y tales están dentro del alcance de esta invención.

15 Las moléculas de unión específica tal y como se han descrito anteriormente se pueden utilizar en medicina, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer. Sin pretender vincularse a ninguna teoría, se cree que los cánceres que contienen el receptor de tipo 1 de la angiotensina (AT1R) pueden ser particularmente sensibles a la terapia que utiliza las moléculas de unión específica de la invención. Tales cánceres son numerosos e incluyen el cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de la glándula pituitaria, coriocarcinoma, enfermedad de Hodgkin, cáncer de piel, cáncer de riñón, tumores suprarrenales, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, leucemia y células de neuroblastoma.

20 La invención, por lo tanto, también se extiende al uso de una molécula de unión específica tal y como se ha descrito anteriormente en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento del cáncer. El método de tratamiento puede ser de un sujeto humano o un sujeto animal y la invención se extiende igualmente a los usos en medicina humana y/o veterinaria.

25 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un preparado combinado de una molécula de unión específica, tal y como se ha descrito anteriormente, y angiotensina II, para la administración por separado, simultánea o sucesiva para el tratamiento del cáncer en un sujeto. El cáncer puede ser tal y como se ha descrito anteriormente.

30 La invención también proporciona una composición que comprende una molécula de unión específica de la invención, tal y como se ha definido anteriormente, y angiotensina II. Tales composiciones se pueden formular como una composición farmacéutica que comprende un adyuvante y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

Como alternativa, la invención también proporciona un kit en partes que comprende una molécula de unión específica de la invención y angiotensina II, cada una formulada para la administración farmacéutica, que incluye, sin carácter limitante, comprimidos para administración oral, inhaladores para la administración pulmonar y soluciones inyectables para la administración intravenosa.

35 Las realizaciones de la invención en relación con el uso de la angiotensina II pueden comprender cualquier forma generalmente conveniente de angiotensina, adecuada para el uso en medicina humana o veterinaria. De forma adecuada, la angiotensina II se puede suministrar en forma de un producto liofilizado en el que el residuo se obtiene a partir de una solución que contenía angiotensina II, trehalosa, albúmina de suero humano y ácido acético. Una fuente de angiotensina II de grado farmacéutico es NIBSC, South Mimms, Reino Unido, que suministra angiotensina II en forma de una ampolla que contiene un residuo liofilizado, preparado a partir de 0,5 ml de una solución de una solución que comprende 2,5 µg de angiotensina II (Ileu5), 3 mg de trehalosa, 1 mg de albúmina de suero humano,  $2 \times 10^{-3}$  mol/l de ácido acético.

40

45 Los análogos sintéticos de las regiones variables del anticuerpo monoclonal 6313/G2, tales como el scFv denominado R6313/G2, tienen propiedades únicas y ventajosas, especialmente cuando se comparan con el anticuerpo del hibridoma original. Por ejemplo:

1. En ratones nu/nu intactos, portadores de células cancerosas en fibras huecas, R6313/G2 inhibió significativamente el crecimiento de las células cancerosas. Esto es sorprendente debido a que concentraciones de 13 nmol/kg 2X al día no tenían efecto sobre el peso corporal, las concentraciones circulantes de aldosterona ni la actividad de los animales, es decir, otras funciones relacionadas con la angiotensina no se vieron afectadas (Nota: el anticuerpo del hibridoma original incrementó la secreción de aldosterona in vitro).

50

2. R6313/G2 por sí solo inhibe la invasión de células T-47D a través de proteínas de la matriz de una membrana basal reconstituida (ECM), obtenida a partir del tumor de ratón Engelbreth-Holm-Swam (EHS), con concentraciones de 50 y 250 nmol/L (véase la Figura 9(b)). El anticuerpo monoclonal purificado (100 nmol/L) no tiene ningún efecto inhibitorio significativo. Además, en presencia de 100 nmol/L de angiotensina II (en la Figura 9(b)), el efecto de R6313/G2 se vuelve significativamente más pronunciado con la concentración más alta de R6313/G2 (250 nmol/L) -

55

hasta un 25% de inhibición de la invasión celular durante el período de ensayo de 24 horas.

3. En presencia de hasta 100 nmol de angiotensina II por L, R6313/G2 inhibe significativamente la proliferación celular del cáncer de mama. Esto es sorprendente porque se requiere la presencia de angiotensina II, y R6313/G2 no tiene ningún efecto en ausencia de angiotensina II.

5 4. En ratas intactas in vivo, R6313/G2 inhibe significativamente los incrementos de la presión arterial inducidos por el estrés. Esto es sorprendente porque no reduce e incluso puede aumentar la presión arterial en reposo.

5. En presencia, pero no en ausencia, de hasta 100 nmol de angiotensina II por L, R6313/G2 mejora la apoptosis dirigida por caspasas en células de cáncer de mama. La exclusión de angiotensina bloquea sus efectos. Por lo tanto, la presencia de angiotensina II es sorprendentemente necesaria para la actividad de R6313/G2.

10 6. Sorprendentemente R6313/G2 fue mucho más eficaz in vivo que in vitro. Por ello, una dosis de 25 nmol/kg in vivo proporcionó un efecto celular contra el cáncer equivalente al conseguido con 3,3 micromol/L in vitro.

7. En ratones nu/nu intactos, portadores de tumores de células cancerosas xenoinjertadas, R6313/G2 inhibió significativamente el crecimiento de las células cancerosas, con 13 nmol/kg, de nuevo sin otros efectos.

15 8. Como puede observarse en la Figura 12, hubo un aumento de la unión al antígeno peptídico en el scFv remodelado en superficie (humanizado) frente al scFv de murino. Esto presenta, por lo tanto, una ventaja en términos del coste potencial por tratamiento y también proporciona el beneficio de tener menos potencial para provocar una respuesta inmunológica en humanos. Además, la variante humanizada var4 mostró la unión incrementada de forma más significativa, en comparación con el scFv de murino parental. Esto fue sorprendente, ya que una de las CDR (VLCDR2) de esta variante había sido modificada con respecto al scFv de murino parental.

20 Las características preferidas para el segundo aspecto y los subsiguientes de la invención son, como para el primero aspecto, mutatis mutandis.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión específica que comprende un polipéptido que tiene una secuencia mostrada en la Figura 14.

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

30 La Figura 1 muestra la inmunotransferencia para los subtipos de receptores de la angiotensina II. El contenido en receptor AT1 (A) y en receptor AT2 (B) se analizó en lisados de tres líneas celulares de cáncer de mama (pista B, T47D; pista C, MDA-MB-231; pista D, MCF-7), y en células de músculo liso (pista A). Solo los lisados procedentes de las tres líneas celulares de cáncer de mama (pistas B-D) contenían el receptor AT2, aunque las células MDA-MB-231 contenían relativamente poco: no había receptor AT2 detectable en RASMC (pista A).

35 La Figura 2 muestra (A) la inhibición dependiente de la dosis, de la supervivencia celular con R6313/G2, en presencia de 100 nmol de angiotensina II por L, que se determinó mediante un ensayo XTT después de 48 horas. Los valores umbrales (\*) para las tres líneas celulares ( $P < 0,05$  o mejor) fueron de 0,05  $\mu\text{M}$  para las células MCF-7 y MDA-MB-231, y 1,25  $\mu\text{M}$  para las células T47D; los valores de CI50 fueron: 2,8  $\mu\text{mol/L}$ , 1,53 nmol/L y 30 nmol/L para las células T47D, MDA-MB-231 y MCF-7, respectivamente. (B) Losartán por sí solo produjo una inhibición del 43% de las células T47D con 25  $\mu\text{mol/L}$ , otros tipos de células no se vieron afectadas en todas las concentraciones utilizadas. Los resultados son las medias de ocho muestras  $\pm$  D.E.

40 La Figura 3 muestra (A y B) el efecto de R6313/G2 sobre la actividad caspasa-3/7 en células T47D en presencia y ausencia de 100 nmol/L de angiotensina II, después de 12 horas y 48 horas. Después de 12 horas, la angiotensina II inhibió la actividad caspasa-3/7 en comparación con los valores de testigos no tratados y esta inhibición fue bloqueada por R6313/G2. Esta acción bloqueante de R6313/G2 fue menos marcada con las dosis más altas usadas, pero después de 48 horas, R6313/G2 por sí solo proporcionó un aumento dependiente de la dosis de la actividad caspasa-3/7. (C) En las células MCF7, R6313/G2 por sí solo redujo la actividad caspasa-3/7, pero en presencia de angiotensina II, aumentó de forma dependiente de la dosis la actividad caspasa-3/7. Los datos son las medias de ocho muestras  $\pm$  D.E. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ .

45 La Figura 4 muestra (A) en el ensayo in vitro con fibra hueca, R6313/G2 inhibió de forma dependiente de la dosis la supervivencia de las tres líneas celulares de cáncer de mama (T47D, MCF-7 y MDA-MB-231) en presencia de angiotensina II, después de 48 h. (B) En el ensayo in vivo con fibra hueca en el sitio s.c., R6313/G2 inhibió de forma dependiente de la dosis la supervivencia celular solo en las células MCF-7, aunque las células MDA-MB-231 fueron inhibidas con la dosis más alta. (C) En el ensayo in vivo con fibra hueca en el sitio i.p., R6313/G2 inhibió la supervivencia de las células MCF7 en los animales tratados con 0,07 y 0,7 mg/kg (2,5 y 25 nmol/kg) dos veces al día, y en las células T47D y MDA-MB-231 con 0,7 mg/kg (25 nmol/kg) dos veces al día. Los valores se expresan como medias  $\pm$  D.E. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,001$ . (D) Los pesos corporales de los animales de experimentación no mostraron cambios durante el período de tratamiento.

55

- La Figura 5 muestra que el tratamiento in vivo con R6313/G2 en los animales con implantes de xenoinjertos de células MCF7 no proporcionó ninguna pérdida de peso con dosis de 0,4 mg/kg (13 nmol/kg; ■-) y 0,8 mg/kg (27 nmol/kg; ▲-); dos veces por día, y no hubo mortalidad durante el período de tratamiento, pero en el grupo de 0,8 mg/kg, murieron cuatro antes del día 8. El peso corporal se redujo significativamente en los animales que recibieron 1,36 mg/kg (45,3 nmol/kg; ●- \*P<0,05) y todos murieron antes del día 8. Los datos son medias ± E.E.M., n=8, salvo que se indique lo contrario (n números entre paréntesis). Testigo (-◆-).
- La Figura 6 muestra las acciones in vivo de R6313/G2 sobre los xenoinjertos de células MCF-7. (A) Volúmenes tumorales de MCF-7, medias ± E.E.M. (B) Los mismos datos que para A, valores tratados expresados como porcentajes de los valores medios del testigo. \*P <0,05, \*\*P <0,001.
- La Figura 7 muestra xenoinjertos de células MCF7 en el testigo (superior) y después del tratamiento (inferior) durante 7 días con 0,4 mg/kg de R6313/G2, dos veces al día, durante 7 días, como en la Fig. 6.
- La Figura 8 muestra presiones arteriales de ratas tratadas con R6313/G2 (scFv, 0,4 mg/kg al día, durante 3 días) en comparación con los testigos (Tes) que recibieron PBS solo. \*P <0,05, comparación de las presiones diastólicas de Tes y de scFv.
- La Figura 9 muestra una comparación entre el anticuerpo monoclonal purificado a partir de material sobrenadante del hibridoma (Mab; Figura 9a) y el scFv, R6313/G2 clon 12D (scFv; Figura 9b), en un ensayo de invasión celular utilizando células T-47D de cáncer de mama. En este ensayo, las células invasoras se habrán destruido a través de un modelo establecido de matriz extracelular. La Figura 9b muestra que scFv por sí solo inhibe significativamente la invasión de células T47D a través de proteínas de la matriz de la membrana basal reconstituida (ECM), obtenidas a partir del tumor de ratón Engelbreth-Holm-Swam (EHS) con concentraciones de 50 y 250 nmol/L (b). El anticuerpo monoclonal purificado (100 nM) no tiene ningún efecto inhibidor significativo. Además, en presencia de 100 nmol/L de angiotensina II (Ang II) (en b), el efecto de scFv se hace significativamente más pronunciado con la mayor concentración de scFv (250 nM).
- La Figura 10 muestra la alineación de las secuencias completas de los clones 12D y 11B. La secuencia de aminoácidos eficaz para las variantes de scFv comienza en el aminoácido 9 y termina a 9 residuos del extremo de la secuencia presentada en esta figura. Los aminoácidos adicionales en cada extremo incluyen parte de la secuencia líder del vector pCANTAB 5E (N-terminal de la secuencia de scFv), y la secuencia peptídica que incluye parte del péptido de expresión del marcador E (C-terminal de la secuencia de scFv) que se expresó utilizando pCANTAB 5E y se empleó en la purificación por afinidad del scFv. En particular, la secuencia de aminoácidos eficaz comienza después de un sitio de escisión de la peptidasa señal de MA que es parte de la secuencia líder que se dirige al periplasma y termina antes de una secuencia puente de triple alanina y la secuencia GAPVPY del marcador E.
- La Figura 11 muestra la alineación de las secuencias completas de los clones 12D, 11B, 10D, 10E, 4F, 6C, 6E, 7F, 8B, 8C, 8D y 8E.
- Los paneles a-b de la Figura 12 representan cuatro comparaciones separadas de ELISA, llevadas a cabo por triplicado. Se muestra la cantidad de unión de las cinco variantes diferentes de scFv con el antígeno peptídico (procedente de la región N-terminal del receptor AT1). Los datos se muestran como media ± E.E.M. de los valores de la absorbancia a 450 nm por µg de proteína/pocillo, después de la sustracción del ruido de fondo.
- La Figura 13 muestra una comparación indirecta del scFv de murino (12D) y variantes de scFv modificados genéticamente, con IgM purificada procedente del hibridoma original. Se realizó un ELISA usando un conjugado de anticuerpo secundario anti-marcador His y peroxidasa (1:1000) para los scFv, y un conjugado de anticuerpo secundario anti-IgM y peroxidasa (1:2500) para la IgM obtenida a partir del hibridoma.
- La Figura 14 muestra la alineación de las secuencias de los clones 12D, 11B y las variantes humanizadas HuCY, variante 3 y 4 variante.
- El Panel a) de la Figura 15 muestra una comparación del cambio en la frecuencia de la resonancia para la tasa de asociación aparente en Hz/segundo, entre la IgM y las variantes de scFv. Estos datos se obtuvieron usando un Biosensor de QCM de Attana 100 y se expresan como media ± E.E.M. de la frecuencia de la resonancia de un chip de QCM revestido con estreptavidina, con antígeno peptídico biotinilado como diana de la unión. Los scFv 12D, var3 y var4 mostraron cambios significativamente mayores en la frecuencia de la resonancia durante el período de inyección de 100 segundos. El panel b) compara las tasas de disociación aparente de las diversas proteínas de anticuerpos determinadas de manera similar. No se observaron diferencias significativas en estas tasas de disociación terminales, con estas condiciones experimentales.
- Ejemplo 1: Preparación de scFv
- El hibridoma de anticuerpo monoclonal de ratón 6313/G2 se dejó crecer tal y como se ha descrito previamente (Barker et al. J. Mol. Endocrinol.11 241-245 (1993)). Una mezcla de ADNc obtenido a partir de ARNm se utilizó para obtener cadenas pesadas y ligeras mediante PCR. Un fragmento conector que codificaba (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> se utilizó para

ensamblar la colección de scFv de insertos y se creó una colección de presentación de fagos por clonación direccional de estos insertos en el vector fagémido pCANTAB 5 E (Amersham Pharmacia, High Wycombe, Reino Unido). Se incluyó un marcador E para la secuencia expresada GAPVPYPDPLEPR en este vector y se utilizó en las etapas subsiguientes de cribado y purificación. La colección de fagémidos se usó a continuación para transformar E. coli TG1, y el rescate de fagémidos se llevó a cabo usando el fago auxiliar M13KO7, seguido de varias rondas de cribado. Los clones que se expresaban como positivos fueron identificados mediante ELISA, usando placas de 96 pocillos recubiertas con el péptido antigénico original (EDGIKRIQDD) y un anticuerpo anti-marcador E (Amersham Pharmacia), detectado utilizando un anticuerpo secundario unido a HRP. Un clon particular se tomó para la expresión, la purificación y la evaluación funcional, basándose en la emisión de la señal más alta en el ELISA del antígeno.

El scFv 6313/G2 (R6313/G2, clon 12D) se purificó utilizando columnas HiTrap para marcadores E (Amersham Pharmacia), seguido de purificación usando una columna para Proteína L (BD Clontech, Cowley, Oxford, Reino Unido) que se une a las inmunoglobulinas, incluidos los scFv. Para los experimentos in vitro e in vivo fue necesario llevar a cabo una purificación a mediana escala, seguida por diálisis durante una noche frente a PBS, y concentración utilizando concentradores con punto de corte de 30 kDa (Millipore, Watford, Reino Unido). El depósito final de anticuerpo se reconstituyó rutinariamente en PBS, con una concentración de 10 mg/ml.

El anticuerpo monoclonal utilizado para la comparación en el ensayo de invasión se purificó empleando una columna de proteína inmovilizada de unión a mananos (Perbio Science UK Ltd) seguido de concentración utilizando filtros de corte de peso molecular de 100 kDa.

Parece que los estudios preliminares muestran que la mayor actividad se asocia con los clones R6313clon12D (también descrito como R6313/G2) y R6313clon11B, en los que las CDR son las siguientes:

R6313clon12D  
 VHCDR1: GYSFTGYNMN  
 VHCDR2: NIDPYOOTIYNQKFKG  
 VHCDR3: EVDY  
 VLCDR1: RASKSVSTSTSGYSYMH  
 VLCDR2: LVSNLES  
 VLCDR3: QHIRELTRSEG

R6313clon11B  
 VHCDR1: GYSFTGYNMS  
 VHCDR2: NIDPYGGTTYNQKFKG  
 VHCDR3: EVDY  
 VLCDR1: RASKSVSTSTSGYSYMH  
 VLCDR2: LVSNLES  
 VLCDR3: QHIRELTRSEG

Estos presentaron una unión significativamente más fuerte con el antígeno en un ensayo en placa de ELISA durante el cribado de la colección de ADNc, obtenida a partir de ARN de la población de células de hibridoma originales. El único cambio en las CDR está en VHCDRH1. Sin embargo, también existe otra diferencia entre las dos secuencias en el extremo N-terminal, KLQQ y QLQE, respectivamente. Diez clones adicionales muestran otros cambios en las CDR y en otras partes de la estructura (véase la Figura 11), sin embargo en el ensayo de ELISA estos presentaron una unión menos fuerte a la placa de antígeno del ELISA.

Las secuencias completas de los clones 12D y 11B están alineadas tal y como se muestra en la Figura 10. Los 6 primeros aminoácidos y los 8 últimos aminoácidos son las secuencias líder procedentes del vector pCANTAB 5E, comprendiendo los 5 últimos parte del marcador E presente en el producto proteico expresado utilizado en estos experimentos.

Las secuencias de aminoácidos eficaces de los clones 12D y 11B se muestran en la Figura 14.

#### Ejemplo 2: Ensayos de la actividad

La actividad del scFv R6313/G2 se estudió en los siguientes ensayos:

Procedimientos de cultivo celular:

Las células de cáncer de mama MCF-7, T47D y MDA-MB-231 se obtuvieron a partir de la "American Tissue Culture Collection" (LGC Promochem, Teddington, Reino Unido). Las células de músculo liso aórtico de rata (RASMC) se desarrollaron a partir de un cultivo primario (Barker et al., 1996). Las células MCF-7 se mantuvieron en Medio Esencial Mínimo (MEM), las células T47D y MDA-MB-231 en medio RPMI 1640, y las RASMC se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM). Todos los medios se suplementaron con L-glutamina 2 mM, 10% de suero fetal bovino (FBS), 50 U/ml de penicilina y 0,05 mg/ml de estreptomina. Las células se mantuvieron a 37 °C

en un ambiente humidificado (95% de oxígeno, 5% de CO<sub>2</sub>).

Ensayo de la viabilidad celular:

5 Se separaron monocapas de células confluentes de los matraces de cultivo de tejidos usando tripsina/EDTA. Las células (15x10<sup>3</sup> por pocillo) fueron sembradas en placas de 96 pocillos para cultivo de tejidos que contenían el medio apropiado para cada línea celular. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con angiotensina II (100 nM) y R6313/G2 en un intervalo de concentraciones de 0,005 a 25 µM, o con losartán en un intervalo de concentraciones similares, y se incubaron durante otras 48 horas. La viabilidad celular se determinó según la capacidad de las células metabólicamente activas para reducir la sal zwitteriónica 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolio-5-carboxianilida (XTT) al producto coloreado formazán. La absorbancia se midió utilizando un lector de microplacas Multiskan Ascent (Thermo Labsystem, Helsinki, Finlandia) con una longitud de onda de 450 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm. Cada medición se realizó por triplicado. Las CI50 se calcularon usando una fórmula de regresión no lineal, utilizando el programa GraphPad Prism v4.0 (GraphPad Software Inc, San Diego CA, EE.UU.).

Extracción de proteínas y transferencia Western:

15 Las células se cultivaron en presencia o ausencia de angiotensina II (100 nmol/L) durante 24 horas y después se lavaron tres veces en PBS estéril (pH 7,4), se incubaron durante 5 minutos en tampón de lisis (PBS pH 7,4, 1% de NP-40/Triton X-100, 0,1% de SDS y 0,5% de desoxicolato de sodio, con los inhibidores de proteasas leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 30 µg/ml y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 mmol/L) y se recogieron. Los lisados celulares se homogeneizaron usando un aparato de ultrasonidos (2x5 ciclos por segundo; Bandelin Sonoplus, SLS, Hesse Reino Unido). Después de la homogeneización, las muestras se centrifugaron a 20.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El material sobrenadante se retiró y se almacenó a -80 °C. Las concentraciones de proteína se estimaron usando el ensayo de proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead Reino Unido). Para la transferencia Western, las muestras que contenían 50 µg de lisado celular total se añadieron sobre un gel de SDS-poliacrilamida al 10% y se sometieron a electroforesis. Las proteínas se transfirieron a membranas Hybond-C (Amersham Biosciences Ltd, Chalfont St Giles Reino Unido) en tampón de transferencia (glicina 39 mmol/L, Tris-Base 48 mmol/L, 20% de metanol y 0,037% de SDS), usando un aparato de transferencia transBlot (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead Reino Unido) a 120 mA durante 1,5 horas a 4 °C. Las membranas se lavaron y continuación se incubaron en tampón de bloqueo (1X solución salina tamponada con Tris (TBS), 0,1% de Tween 20 y 5% de leche en polvo) durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron tres veces durante 10 minutos en tampón de lavado (1X TBS y 0,1% de Tween 20). Las membranas se incubaron con anticuerpos policlonales de conejo anti-receptor AT1 o anti-receptor AT2, con una dilución de 1:500 en tampón de bloqueo. Después de incubar durante una noche a 4 °C, las membranas se lavaron tal y como se ha descrito anteriormente y se incubaron con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Amersham Biosciences) (1:2000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron lavados adicionales y la detección inmunológica se realizó incubando las membranas durante 1 minuto en reactivo de detección de la transferencia Western ECL (Amersham Biosciences), y se expusieron a una película Biomax para la detección de la quimioluminiscencia (Kodak, Rochester NY, EE. UU.).

Apoptosis – Actividad caspasa-3/7:

40 La activación de las caspasas durante la apoptosis se determinó utilizando el ensayo homogéneo de la caspasa 3/7 Apo-ONE (Promega Corp, Southampton Reino Unido), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se cultivaron hasta 90% de confluencia y se lavaron tres veces con PBS estéril. Se recogieron las células utilizando tripsina/EDTA y se contaron. Las células (10<sup>4</sup> por pocillo) se sembraron en una placa de 96 pocillos y se incubaron con R6313/G2, con concentraciones desde 0,1 hasta 3 µM en presencia o ausencia de angiotensina II, 100 nmol/L, volumen total de 150 µl, durante 24 y 48 horas. Después de la incubación, se añadió a cada pocillo el sustrato Z-DEVD-R110 de la caspasa-3/7 (100 µl). Los pocillos del blanco solo contenían reactivo, y los testigos no tenían anticuerpo y/o angiotensina II. La fluorescencia se midió cada 2 horas durante un período de 8 horas, usando un espectrofluorímetro Fluostar Optima (BMG Laboratories, Offenburg, Alemania), con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm.

Ensayo de fibra hueca

50 Los procedimientos de fibra hueca realizaron siguiendo el método de Hollingshead (Hollingshead et al. Life Sci. 57 131-41 (1995)).

Preparación de las fibras huecas:

55 Las fibras huecas de polidifluoruro de vinilideno (PVDF) (punto de corte de 500 kDa, diámetro interior de 1 mm; Spectrum Europe BV, Breda, Países Bajos) se enjuagaron con etanol al 70% utilizando una aguja de punta roma de calibre 21 y una jeringa de 10 ml. Las fibras se sumergieron a continuación en etanol al 70% durante 72 horas, se enjuagaron de nuevo con etanol al 70%, después con agua destilada, y luego se introdujeron en un autoclave a 131 °C. Finalmente, antes de añadir las suspensiones de células, las fibras se enjuagaron con medio de cultivo RPMI 1640. Las células (MCF-7, T47D y MDA-MB-231) se introdujeron en las fibras con densidades de 2,5 a 3,0 x 10<sup>6</sup>

células/ml. A continuación, las fibras se termosellaron a intervalos de 2 cm y se colocaron en placas de Petri que contenían 3 ml de medio celular apropiado.

Para estudiar la eficacia del método antes de su uso in vivo, las fibras cargadas con células se incubaron in vitro durante 48 horas en presencia o ausencia de anticuerpo con un intervalo de concentraciones de 0,33  $\mu\text{M}$  a 33  $\mu\text{mol/L}$  y angiotensina II (100 nmol/L).

#### Ensayo con fibra hueca in vivo:

Los segmentos de fibra hueca cargados con células se incubaron a 37 °C en medio de cultivo durante una noche, antes de la implantación en ratones hembra de la cepa pura Balb/c nu/nu de 5-6 semanas de edad. Las fibras se implantaron en los animales anestesiados (2% de isofluorano). Se implantaron tres fibras de 2 cm, conteniendo cada una las líneas celulares MCF-7, T47D o MDA-MB-231, en sitios subcutáneos (s.c.) e intraperitoneales (i.p.) en cada animal. Para los implantes i.p., se hizo una pequeña incisión a través de la piel y la musculatura de la pared abdominal ventral. Las fibras se colocaron en la cavidad peritoneal y ambas incisiones se cerraron con clips de sutura metálicos (Harvard Instruments, Edenbridge Reino Unido). Para los implantes s.c., se hizo una pequeña incisión dorsalmente. Las fibras se implantaron a la izquierda de la línea media dorsal en dirección craneal. La pequeña incisión se cerró con clips de sutura metálicos.

#### Tratamiento con anticuerpo:

Los ratones (n = 5/grupo) con implantes de fibra hueca se trataron con R6313/G2 (0,07 mg/kg (2,5 nmol/kg) y 0,7 mg/kg (25 nmol/kg) en 0,1 ml de PBS, por vía subcutánea) dos veces al día, durante seis días. Los animales testigos (n = 5) recibieron solo vehículo. Veinticuatro horas después de la última inyección, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y las fibras se recuperaron y se transfirieron a medio RPMI 1640 precalentado que contenía FBS al 20% durante 30 minutos.

#### Determinación del crecimiento de células tumorales dentro de las fibras huecas:

La viabilidad celular se midió usando un ensayo con MTT modificado. Las fibras se incubaron en RPMI 1640 con FBS al 20% que contenía 1 mg/ml de MTT, y se incubaron a 37 °C, con 95% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas. El reactivo se aspiró y se añadieron 2 ml de sulfato de protamina al 2,5% filtrado de forma estéril (0,9 g de NaCl, 2,5 g de sulfato de protamina en 100 ml de agua). Las muestras se almacenaron a 4 °C durante un mínimo de 24 horas en la oscuridad, para fijar el producto formazán. Se añadió sulfato de protamina recién preparado (2,5%) y las fibras se almacenaron durante de 2 a 4 horas más a 4 °C. Cada fibra se transfirió a un pocillo en una placa de 24 pocillos, se cortó por la mitad y se secó al aire durante una noche, protegida de la luz. Se añadió sulfóxido de dimetilo (DMSO) (300  $\mu\text{l}$ ) a cada pocillo y se extrajo el producto de formazán. Una alícuota (190  $\mu\text{l}$ ) de cada pocillo se transfirió a una placa de 96 pocillos y se registró la absorbancia a 540 nm, utilizando un lector de microplacas fotométrico Multiskan Ascent (Thermo Labsystem). Los valores tratados se calcularon como un porcentaje de los testigos.

#### Ensayo de xenoinjerto in vivo:

En los ratones se inyectaron, por vía s.c. en el flanco derecho, 150  $\mu\text{l}$  de PBS estéril que contenía  $7,5 \times 10^6$  células MCF-7. Las células tumorales se dejaron crecer durante 4 semanas sin soporte hormonal, a partir de entonces los ratones recibieron inyecciones s.c. semanales de valerato de 17 $\beta$ -estradiol (0,1 mg/kg de peso corporal), en aceite de sésamo (Kasukabe et al., Breast Cancer Res. 7(6) R1097-110 (2005)) durante un período adicional de 8 semanas. Los animales fueron controlados diariamente para estudiar la salud general, y los pesos corporales se midieron dos veces por semana. El tamaño del tumor se midió 3 veces por semana con un calibrador de portaobjetos, y los volúmenes se calcularon como  $(L \times W^2)/2$ , en donde L y W son los diámetros mayor y menor, respectivamente. Una vez que los volúmenes tumorales alcanzaron de 150 a 200 mm<sup>3</sup>, los ratones se dividieron al azar en grupos de tratamiento y testigo con de 8 a 10 ratones por grupo. Los ratones fueron tratados con inyecciones subcutáneas de R6313/G2 en PBS estéril (0,1 ml), con dosis de 0,4 mg/kg (13 nmol/kg), 0,8 mg/kg (27 nmol/kg) y 1,36 mg/kg (45,3 nmol/kg) de peso corporal, dos veces al día, durante siete días. Los ratones testigos recibieron PBS estéril. Al término del estudio, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Los pesos corporales relativos (%) se calcularon como  $(Wt/Wi) \times 100$ , en donde Wt es el peso corporal en un momento dado y Wi es el peso corporal al inicio del tratamiento. El volumen neto del tumor se calculó como  $Vt - Vi$ , en donde Vt es el volumen del tumor en un momento dado y Vi es el volumen del tumor al inicio del tratamiento, y se expresó como un porcentaje de Vi.

#### Presión arterial de las ratas

Las ratas se escogieron para esta parte del estudio por su mejor capacidad de manejo en los ensayos de la presión arterial. Las ratas Wistar hembra fueron aclimatadas en primer lugar al manejo y al equipamiento para la presión arterial, durante 4-5 días antes de la experimentación. La presión arterial en los animales conscientes se determinó utilizando un sistema de manguito en la cola Coda 6+ de Kent Scientific Corporation (Torrington CT, EE. UU.), en el que los animales se sujetaron en unos inmovilizadores calentados, mientras se determinaban las presiones arteriales. Primero se estabilizaron los animales y luego se tomó su presión arterial basal, antes del tratamiento.

Luego se retiraron brevemente de los inmovilizadores para la inyección s.c. de R6313/G2, 0,4 mg/kg en PBS estéril (0,1 ml). Los testigos recibieron solo PBS. Las presiones arteriales se tomaron a continuación, a intervalos durante un período de 1 hora, antes de devolver los animales a las jaulas. Los procedimientos se repitieron diariamente durante 3 días.

#### 5 Análisis estadístico:

Todos los datos se presentaron como media  $\pm$  D.E. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA unidireccional. En el caso de un resultado significativo en el ANOVA, se empleó la prueba de la t de Student para las curvas de dosis-respuesta. Un valor de P menor de 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

#### Ensayo fluorimétrico de la invasión

10 El método utilizado es el ensayo de invasión celular QCM<sup>®</sup> (Chemicon n.º de Cat. ECM555). Este emplea la detección fluorimétrica de células que han atravesado proteínas de la matriz de una membrana basal reconstituida (ECM) obtenida a partir de un tumor de ratón Engelbreth-Holm-Swam (EHS) (Reפש LA (1989) Invasion Metastasis 9:192-208).

15 Los insertos recubiertos con ECM se colocaron en placas de 96 pocillos y se añadieron 100  $\mu$ l de medio exento de suero precalentado al interior de los insertos, con el fin de hidratar la capa de ECM durante 1-2 h a temperatura ambiente. Se retiró el medio y se añadieron 150  $\mu$ l de medio exento de suero a los pocillos de la placa de 96 pocillos que alojaba los insertos. A continuación, se introdujeron 100  $\mu$ l de medio que contenía  $10^5$  células/por inserto. Se cubrió la placa y se incubó a 37 °C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>/95% aire humidificado, durante 24 horas. Después de retirar las células del interior del inserto y lavar con PBS, el inserto se volvió a colocar en una placa de 20 96 pocillos que contenía solución de separación de células y se incubó a 37 °C durante 30 min. Las células que habían invadido, a través de la ECM, la parte inferior del inserto se desprendieron, de este modo, del inserto para una lisis posterior y para medir la fluorescencia utilizando un conjunto de filtros 480/520 en un fluorímetro Fluostar Optima (BMG Labtech), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### Ejemplo 3: Diseño de variantes humanizadas

25 Las variantes humanizadas se basaron en la secuencia 12D de múrido descrita anteriormente. Las sustituciones de aminoácidos se eligieron mediante el uso de una combinación de enfoques publicados anteriormente, junto con cierto grado de libertad intelectual. En primer lugar, la secuencia de scFv de múrido se utilizó para encontrar las cadenas ligeras variables y pesadas variables más homólogas en la base de datos del NCBI, utilizando una búsqueda con BLAST. En segundo lugar, el enfoque descrito por Padlan (Molecular Immunology 28(4/5) 489-498 (1991)) se utilizó para indicar qué residuos aminoacídicos eran más propensos a estar expuestos (es decir, 30 hidrófilos) o escondidos (hidrófobos) en toda la molécula de scFv. La referencia al artículo de Padlan también proporcionó opciones en las que se podrían utilizar aminoácidos de la línea germinal humana para sustituir apropiadamente residuos de múridos y de esta manera generar un scFv remodelado en superficie, en donde, en general, la sustitución de estos residuos expuestos de múrido daría como resultado una proteína scFv completa 35 menos inmunogénica.

Se incluyeron otras dos sustituciones a ambos lados de una de las CDR (por lo tanto, CY) que estaban considerados como sensibles a cambios, debido a que los residuos humanos de la línea germinal en estas dos posiciones se habían conservado completamente a través de cuatro subgrupos de regiones variables, de acuerdo con la descripción de Padlan (supra).

40 Las tres variantes humanizadas identificadas con este enfoque, HuCY, var3 y var4, se unen más fuertemente al antígeno peptídico (desde la región N-terminal del receptor AT1) en ELISA que los dos scFv de múrido, 12D y 11B.

La secuencia proteica de scFv de múrido se modificó solo en las regiones estructurales contenidas dentro de las cadenas variables ligeras y variables pesadas, con el fin de producir las variantes humanizadas HuCY y var3. Sin embargo, la variante humanizada var4 también tiene otros dos cambios en la CDR2 de la cadena ligera.

45 Las CDR de las variantes humanizadas son como se indica a continuación:

HuCY y var3  
 VHCDR1: GYSFTGYNMN  
 VHCDR2: NIDPYYGGTIYNQKFKG  
 VHCDR3: EVDY  
 50 VLCDR1: RASKSVSTSGYSYMH  
 VLCDR2: LVSNLES  
 VLCDR3: QHIRELTRSEG

var4  
 VHCDR1: GYSFTGYNMN  
 55 VHCDR2: NIDPYYGGTTYNQKFKG

VHCDR3: EVDY  
 VLCDR1: RASKSVSTSGYSYMH  
 VLCDR2: LVSDLED  
 VLCDR3: QHIRELTRSEG

- 5 Las secuencias de los clones 12D, 11B y de las variantes humanizadas HuCY, variante 3 y variante 4 se muestran en la Figura 14.

Ejemplo 4: Ensayos de la actividad de las variantes humanizadas

La actividad de las variantes humanizadas se estudió en los siguientes ensayos:

Producción y purificación de scFv para estudios comparativos de la unión

- 10 Todas las secuencias génicas se sintetizaron mediante Blue Heron Biotechnology (Bothell, WA, EE. UU.) y se integraron en un vector bacteriano de expresión de proteínas, antes de una secuencia que codifica el marcador His, bajo el control de un promotor T7lac. El vector utilizado incluía una secuencia líder dirigida al periplasma que es escindida por la peptidasa señal después de alcanzar el espacio periplásmico en el hospedador bacteriano. El experto en la técnica entenderá que también se pueden utilizar otros vectores adecuados para producir los scFv de la invención.

- 15 Estos constructos se transformaron en células competentes Rosetta 2(DE3) (Merck-Novagen), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las cepas se cultivaron de forma rutinaria en caldo LB o agar LB a 37 °C, con 30 mg/litro de kanamicina y 34 mg/litro de cloranfenicol. La expresión proteica se realizó utilizando cultivos bacterianos de 1 L, cultivados durante 24 horas en matraces con deflectores de 2 L a 37 °C. La producción de proteínas fue inducida a continuación por la adición de IPTG, hasta una concentración final de 0,4 mM, durante 5 horas a 25 °C. Los sedimentos de células bacterianas se recogieron en una centrifuga Avanti J-30I de Beckman Coulter a 5000 g (f.c.r.) durante 20 minutos a 4 °C, el sedimento celular se resuspendió a continuación en 10 ml (por cada litro de cultivo) en el siguiente tampón: Tris-HCl 0,4 M pH 8, EDTA 1 mM. Los sedimentos celulares resultantes se almacenaron a -20 °C hasta la purificación.

- 20 Para preparar la fracción periplásmica, los sedimentos de 1 L se descongelaron y se añadieron los siguientes tampones: 10 ml de sacarosa 1 M y 30 ml de 1/5 de tampón TES (Tris-HCl 40 mM pH 8, EDTA 0,1 mM, sacarosa 0,1 M y MgSO<sub>4</sub> 5 mM). Esta suspensión celular se agitó a continuación sobre hielo durante 40 minutos, antes de centrifugar a 17418 g (f.c.r.) durante 20 minutos a 4 °C para separar el material sobrenadante periplásmico soluble. Este protocolo de choque osmótico es una versión modificada de un método proporcionado en el manual de Novagen, tomado de Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York (1989).

- 25 A continuación las fracciones periplásmicas se filtraron a través de filtros de 0,45 µm y se aplicaron a columnas de unión a His, preparadas previamente con 1 ml, cargadas con NiSO<sub>4</sub> (Merck-Novagen). La purificación se realizó de acuerdo con las instrucciones del manual del sistema pET, empleando tampones suministrados en el kit del tampón de unión a His (Merck-Novagen). El eluato resultante se sometió a un intercambio de tampón mediante el paso a través de una columna PD-10 (Pharmacia), que se había equilibrado previamente en solución salina tamponada con fosfato de pH 7,4 (PBS; Sigma P4417). La fracción de scFv resultante se concentró a continuación, utilizando un concentrador rotatorio con un corte de peso molecular de 10 kDa (Amicon). La concentración de la fracción de scFv en PBS fue verificada mediante el análisis de geles de poliacrilamida-SDS al 10-15%, la realización de los ensayos proteicos de Bio-Rad y el registro de la absorbancia UV a 280 nm, convirtiendo la última en una concentración mediante la división por el coeficiente de extinción (coeficiente de extinción molar dividido por el peso molecular de la proteína - ~ 25,7 kDa) de 1,7.

La IgM para los estudios comparativos de la unión se purificó tal y como se ha descrito anteriormente para los estudios de la invasión celular. El coeficiente de extinción utilizado para IgM fue de 1,18 (Johnstone A, Thorpe R. Immunochemistry in practice, 2.<sup>a</sup> ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications (1987)).

- 45 Ensayo de la unión al antígeno mediante ELISA

- Los ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima (ELISA) se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de Maxisorp, recubiertas con el antígeno peptídico EDGIKRIQDDC-biotina (2-8 µg/ml en tampón carbonato de pH 9,6) durante una noche a 4 o 37 °C. Los pocillos recubiertos se bloquearon empleando 1% de caseína soluble en medio alcalino (tampón de bloqueo) durante 1 h a TA, después se lavaron tres veces con PBS que contenía 0,1% v/v de Tween 20. Se añadieron muestras de scFv diluidas entre 1:1 y 1:100 en PBS-T, y se incubaron durante 1 h a TA antes de lavar como antes. A continuación, se añadió un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-marcador His (diluido 1:1000 en tampón de bloqueo) durante 1 h a TA. Los pocillos se lavaron después tres veces en PBS-T y luego dos veces con PBS (sin Tween 20). Se añadieron 100 µl de solución de sustrato TMB y se permitió que apareciera el color durante 30 min, momento en el cual se añadieron 100 µl de ácido sulfúrico 2 M para detener la reacción. Se registró la absorbancia a 450 nm con un espectrofotómetro de lectura de placas. Las concentraciones de proteína se determinaron utilizando un lector Biophotometer Eppendorf a 280 nm y utilizando un coeficiente de extinción para el

scFv de 1,7, como anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 12.

Como puede observarse en la Figura 12, hubo un aumento de la unión con el antígeno peptídico en el scFv remodelado en superficie (HuCY, var3 y var4) frente al scFv de múdo (12D y 11B). Se observó inesperadamente que los cambios realizados en las regiones estructurales del scFv de múdo dieron como resultado una proteína, HuCY, que se unía al péptido antigénico EDGIKRIQDDC-biotina con una fuerza cinco veces mayor, en comparación con la misma cantidad y pureza del scFv de múdo. Además, la variante humanizada var4 mostró una unión al antígeno 5-10 veces mayor en comparación con el scFv de múdo parental. Esto es sorprendente, ya que una de las CDR (VLCADR2) de var4 fue modificada con respecto al scFv de múdo parental.

La Figura 13 muestra una comparación indirecta del scFv de múdo (12D) y variantes modificadas genéticamente de scFv (HuCY y var4) frente a IgM purificada procedente del hibridoma original. Como puede verse en la Figura 13, los scFv variantes presentaron mayor actividad que el scFv de múdo.

Comparación de las características de la unión usando una microbalanza de cristal de cuarzo

Los datos se obtuvieron comparando las características de la unión de las variantes de scFv e IgM al antígeno peptídico inmovilizado, usando una microbalanza de cristal de cuarzo de Attana 100. Esto implicó el uso de un "chip" de biotina revestido con estreptavidina (0,1 mg/ml) (cristal de cuarzo chapado en oro en un biosensor de Attana 100 (microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)) (Attana AB, Estocolmo, Suecia). El antígeno peptídico que se corresponde a la secuencia utilizada para obtener el hibridoma de múdo original, biotinilado en el extremo C-terminal, se hizo pasar a continuación a través del chip con una concentración de 4 µg/ml, para crear una diana de unión para los scFv e IgM que posteriormente se hicieron pasar a través de la superficie del chip de QCM. El programa Attester (Attana, Suecia) se utilizó para monitorizar los cambios en la frecuencia de la resonancia del chip de QCM, como respuesta a la unión de un anticuerpo del ensayo con el antígeno. La magnitud de la deflexión en Hz durante el período de inyección de la muestra de 100 s, en Hz/segundo, se determinó para cada anticuerpo a una concentración de 9 µg/ml. La velocidad a la que fue liberado después el anticuerpo desde el chip de QCM se midió también en Hz/segundo a partir de la porción de línea recta de la gráfica del biosensor, a medida que el anticuerpo se liberaba gradualmente del chip y a medida que la frecuencia de la resonancia del chip disminuía. El tampón del análisis fue PBS que contenía 0,005% de Tween 20 (PBST) y este se usó también para hacer diluciones del anticuerpo para proporcionar una concentración final de proteína de 9 µg/ml en cada caso. El Attana 100 se programó con 50 µl de bucle de inyección y se operó con una velocidad de bombeo constante de 20 µl/min. Las muestras y los testigos de tampón PBST se inyectaron durante 100 segundos para obtener un volumen de muestra a través del chip de 33 µl. Una solución de ácido fosfórico 100 mM (6,6 µl de volumen) se utilizó para regenerar la superficie de estreptavidina-antígeno entre los análisis de las muestras experimentales individuales.

Los resultados se muestran en la Figura 15. Los scFv 12D, var3 y var4 mostraron incrementos significativamente mayores en la frecuencia de la resonancia durante el período de inyección, en comparación con la de la IgM, mientras que no se observaron diferencias significativas en la tasa con la que fue liberado el anticuerpo desde el chip de QCM, con estas condiciones experimentales.

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión específica que se une específicamente a un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de EDGIKRIQDD procedente del receptor de tipo 1 de la angiotensina II y que no reduce la presión arterial en reposo y que comprende un polipéptido que tiene un dominio V<sub>L</sub> de inmunoglobulina ligado a un dominio V<sub>H</sub> de inmunoglobulina en donde el dominio V<sub>L</sub> comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) VLCDR1, VLCDR2 y VLCDR3, y en donde el dominio V<sub>H</sub> comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) VHCDR1, VHCDR2 y VHCDR3, teniendo cada una una de las siguientes secuencias de aminoácidos respectivas, en donde
- 10           VHCDR1 es GYSFTGYNMN o GYSFTGYNMS  
               VHCDR2 es NIDPYYGGTTYNQKFKG  
               VHCDR3 es EVDY  
               VLCDR1 es RASKSVSTSGYSYMH  
               VLCDR2 es LVSNLES o LVSDLED  
               VLCDR3 es QHIRELTRSEG
- 15           o CDR con una secuencia de aminoácidos con al menos 85% de identidad con estas.
2. Una molécula de unión específica según la reivindicación 1, en donde las CDR tienen las siguientes secuencias de aminoácidos
- 20           VHCDR1 es GYSFTGYNMN  
               VHCDR2 es NIDPYYGGTTYNQKFKG  
               VHCDR3 es EVDY  
               VLCDR1 es RASKSVSTSGYSYMH  
               VLCDR2 es LVSNLES  
               VLCDR3 es QHIRELTRSEG
- o
- 25           VHCDR1 es GYSFTGYNMS  
               VHCDR2 es NIDPYYGGTTYNQKFKG  
               VHCDR3 es EVDY  
               VLCDR1 es RASKSVSTSGYSYMH  
               VLCDR2 es LVSNLES
- 30           VLCDR3 es QHIRELTRSEG
- o
- 35           VHCDR1 es GYSFTGYNM  
               VHCDR2 es NIDPYYGGTTYNQKFKG  
               VHCDR3 es EVDY  
               VLCDR1 es RASKSVSTSGYSYMH  
               VLCDR2 es LVSDLED  
               VLCDR3 es QHIRELTRSEG.
3. Una molécula de unión específica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en la Figura 14.
- 40           4. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión específica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Una molécula de unión específica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en medicina.
- 45           6. Una molécula de unión específica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en el tratamiento del cáncer.
7. El uso de una molécula de unión específica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento del cáncer.
8. Un preparado combinado de una molécula de unión específica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y angiotensina II para la administración separada, simultánea o sucesiva para el tratamiento del cáncer en un sujeto.
- 50           9. Una composición que comprende una molécula de unión específica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y angiotensina II.

10. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión específica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y angiotensina II

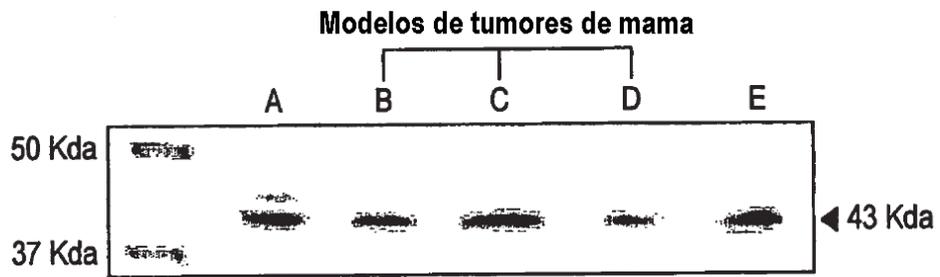


FIG. 1A

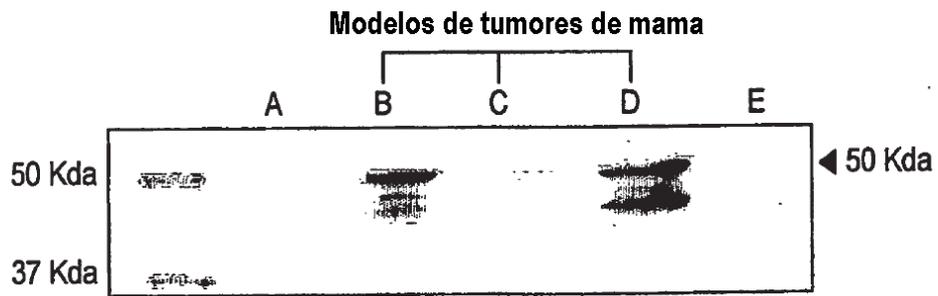


FIG. 1B

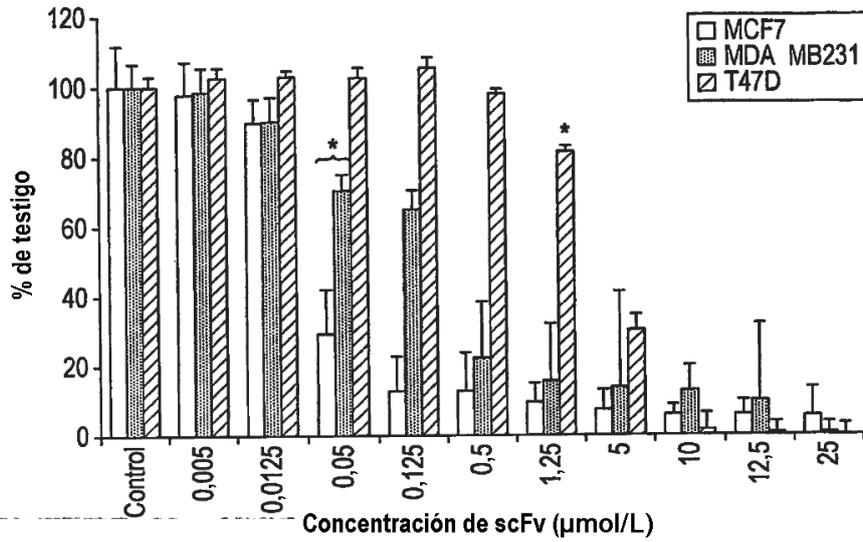


FIG. 2A

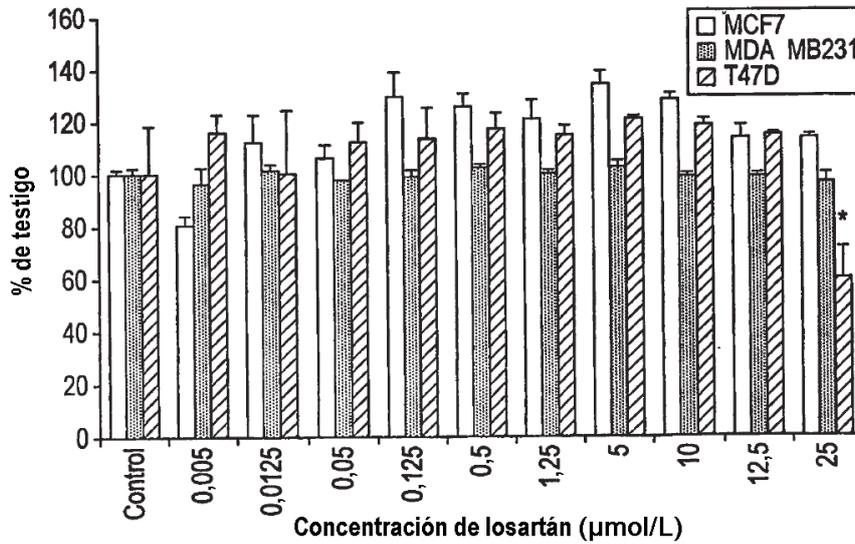
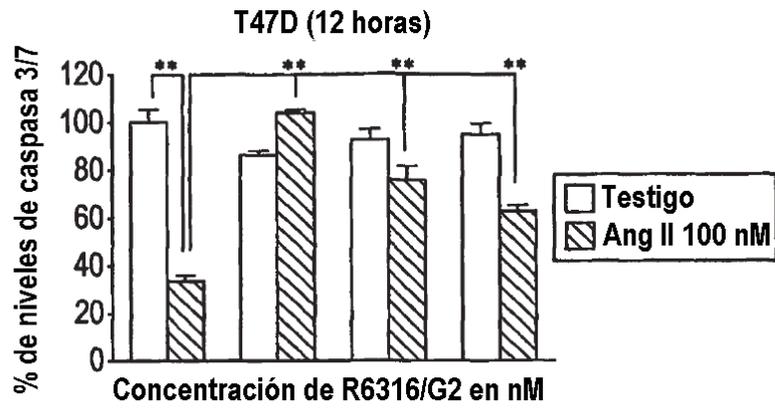
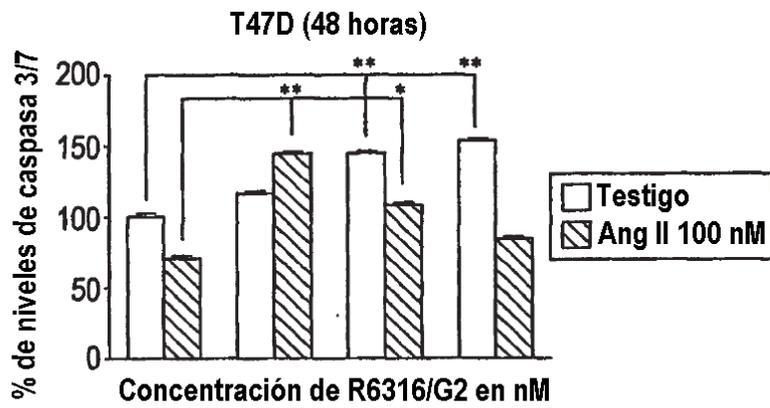


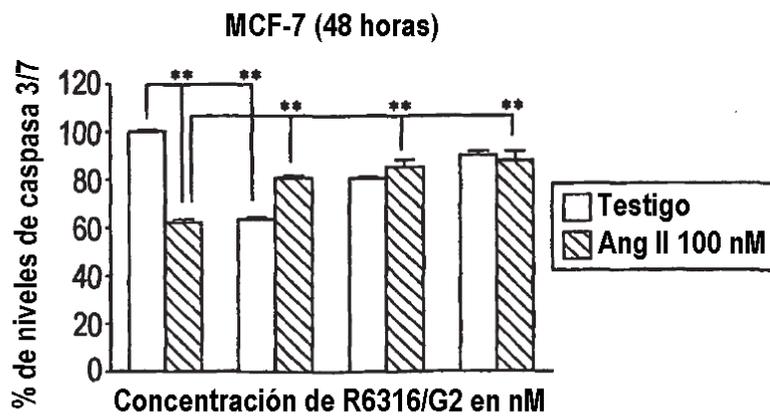
FIG. 2B



**FIG. 3A**



**FIG. 3B**



**FIG. 3C**

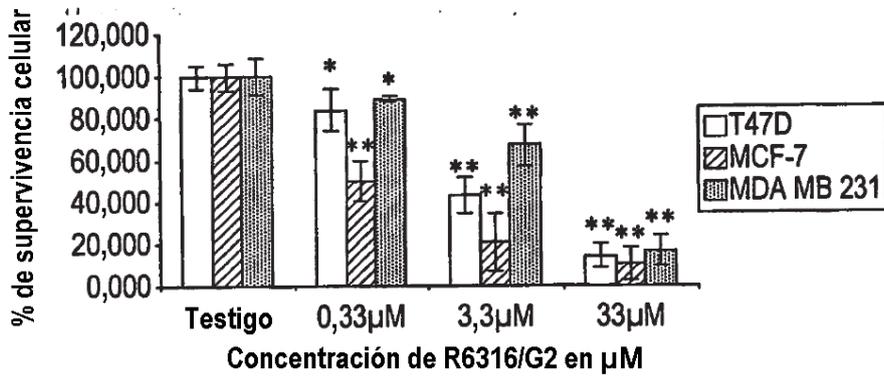


FIG. 4A

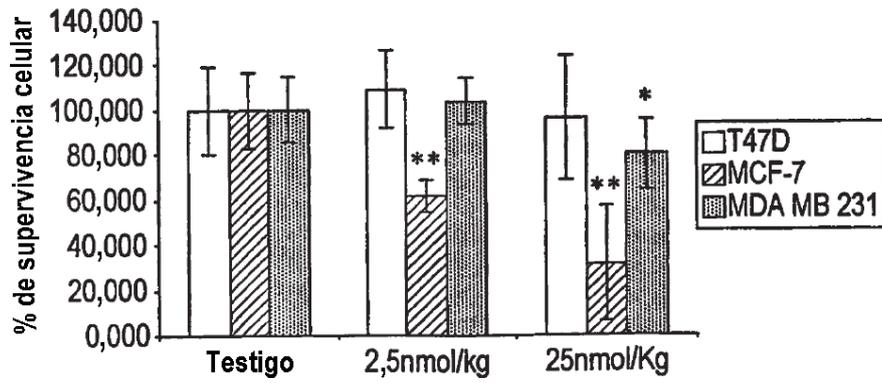


FIG. 4B

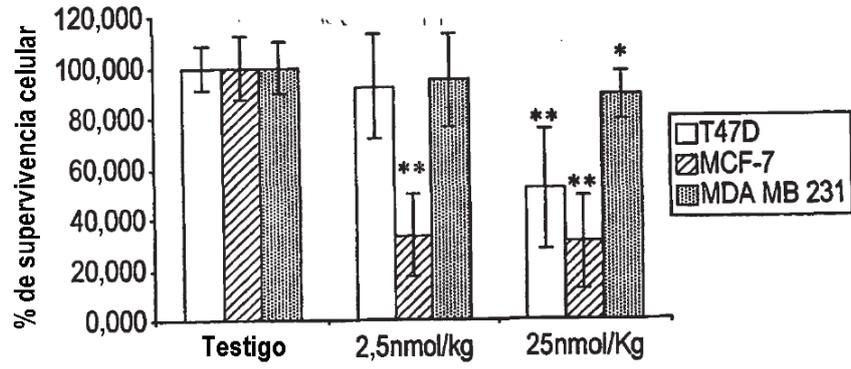


FIG. 4C

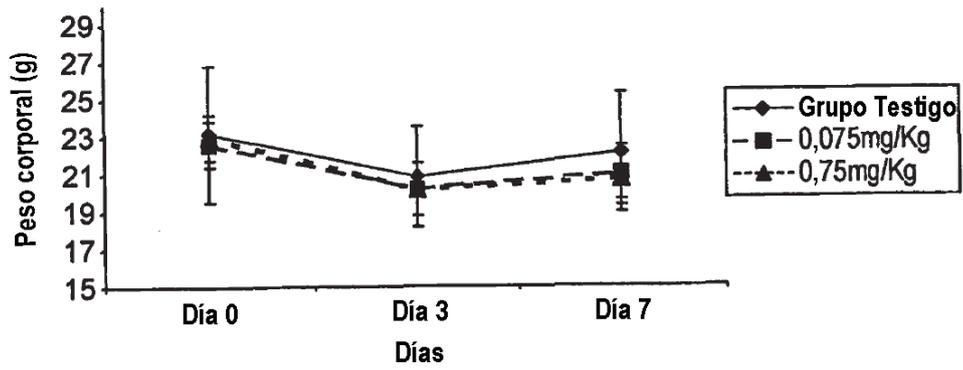


FIG. 4D

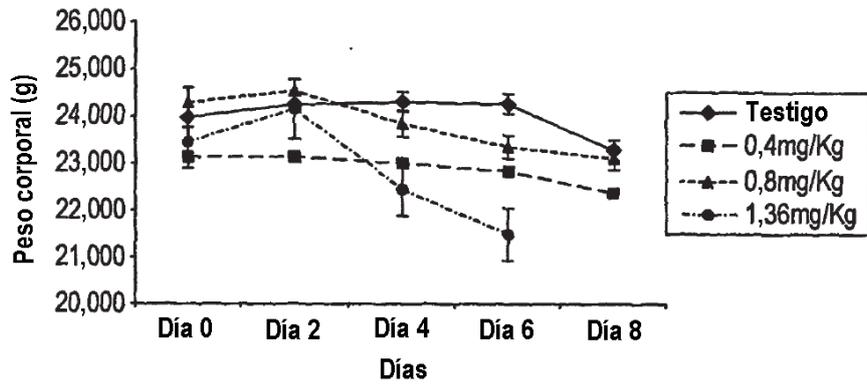


FIG. 5

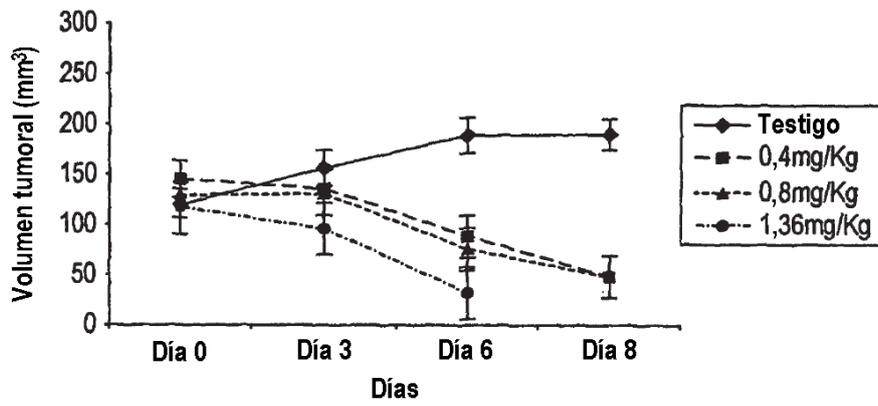


FIG. 6A

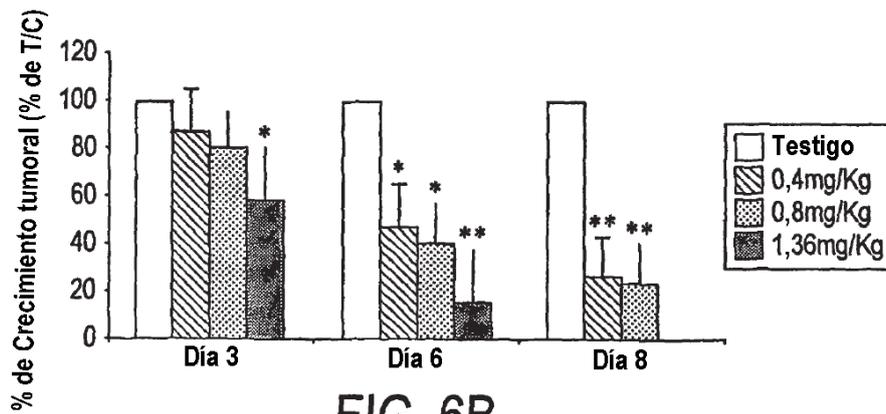


FIG. 6B

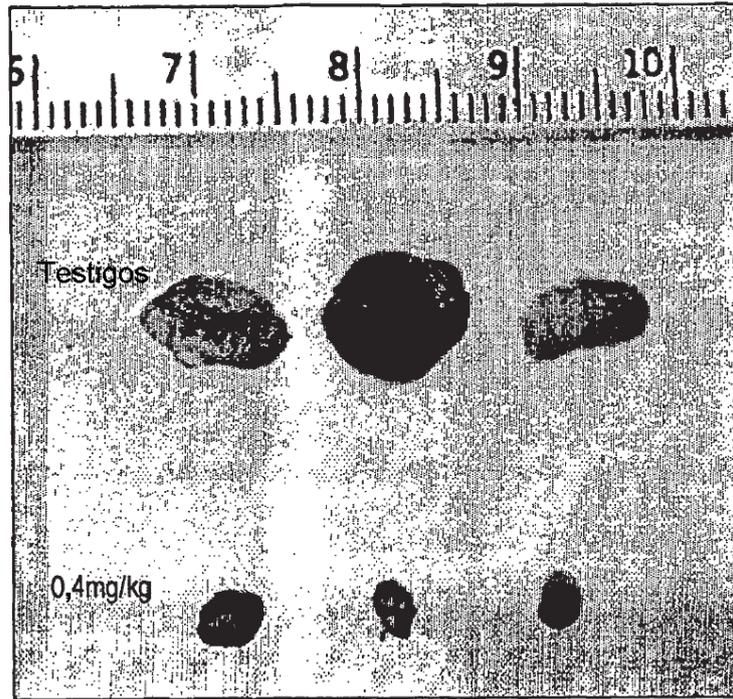


FIG. 7

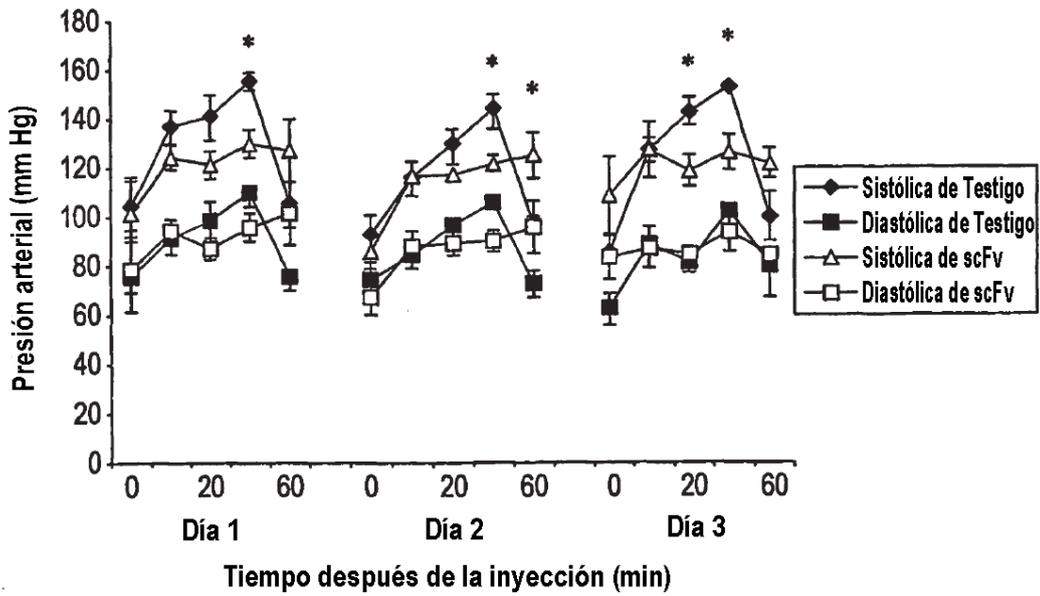


FIG. 8

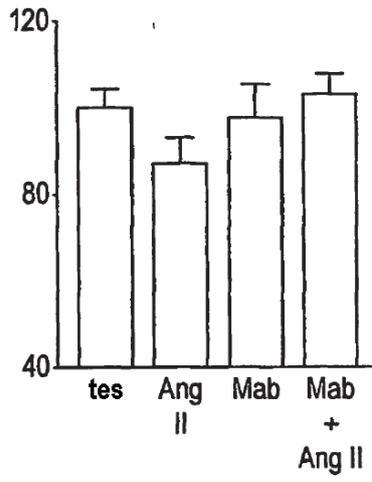


FIG. 9A

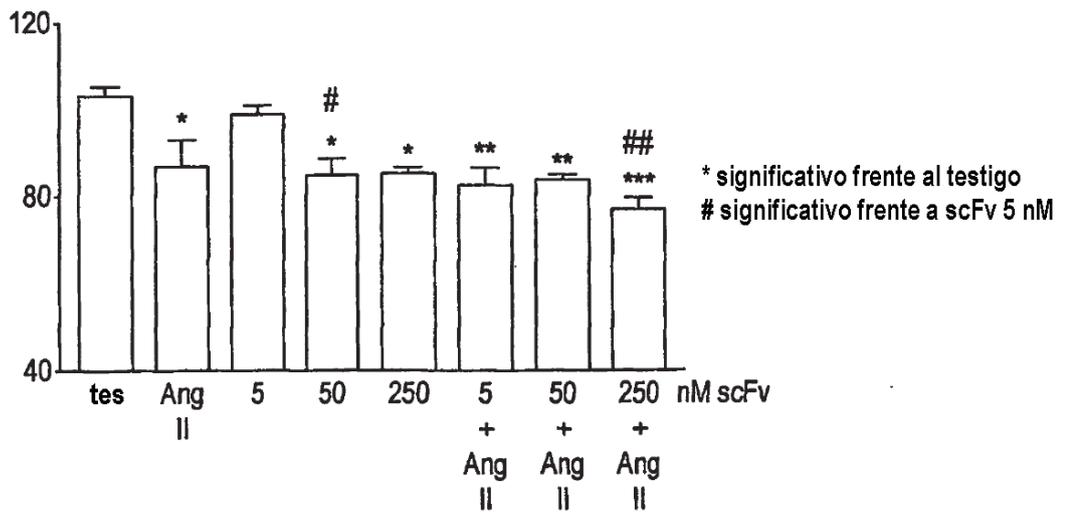


FIG. 9B

```

CLUSTAL W (1.82) Alineación de secuencias múltiples

R6313clon12D   YAAQPAMAQVKLQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNVVKQSNKGSLEWIGNID
R6313clon11B   YAAQPAMAQVQLQESGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMSWVKQSNKGSLEWIGNID
                *****:*.:*****.*****.*****
R6313clon12D   PYYGGTTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCAREVDYWGQGTIVTVS
R6313clon11B   PYYGGTTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCAREVDYWGQGTIVTVS
                *****
R6313clon12D   SGGGSGGGSGGGSDIELTQSPASLAVSLGORATISYRASKSVSTSGYSYMEHWNQKP
R6313clon11B   SGGGSGGGSGGGSDIELTQSPASLAVSLGORATISYRASKSVSTSGYSYMEHWNQKP
                *****
R6313clon12D   GOPPRLLIYLVSNLESGVPAFSGSGGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGT
R6313clon11B   GOPPRLLIYLVSNLESGVPAFSGSGGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGT
                *****
R6313clon12D   KLEIKRAAAGAPVPY
R6313clon11B   KLEIKRAAAGAPVPY
                *****

```

FIG. 10

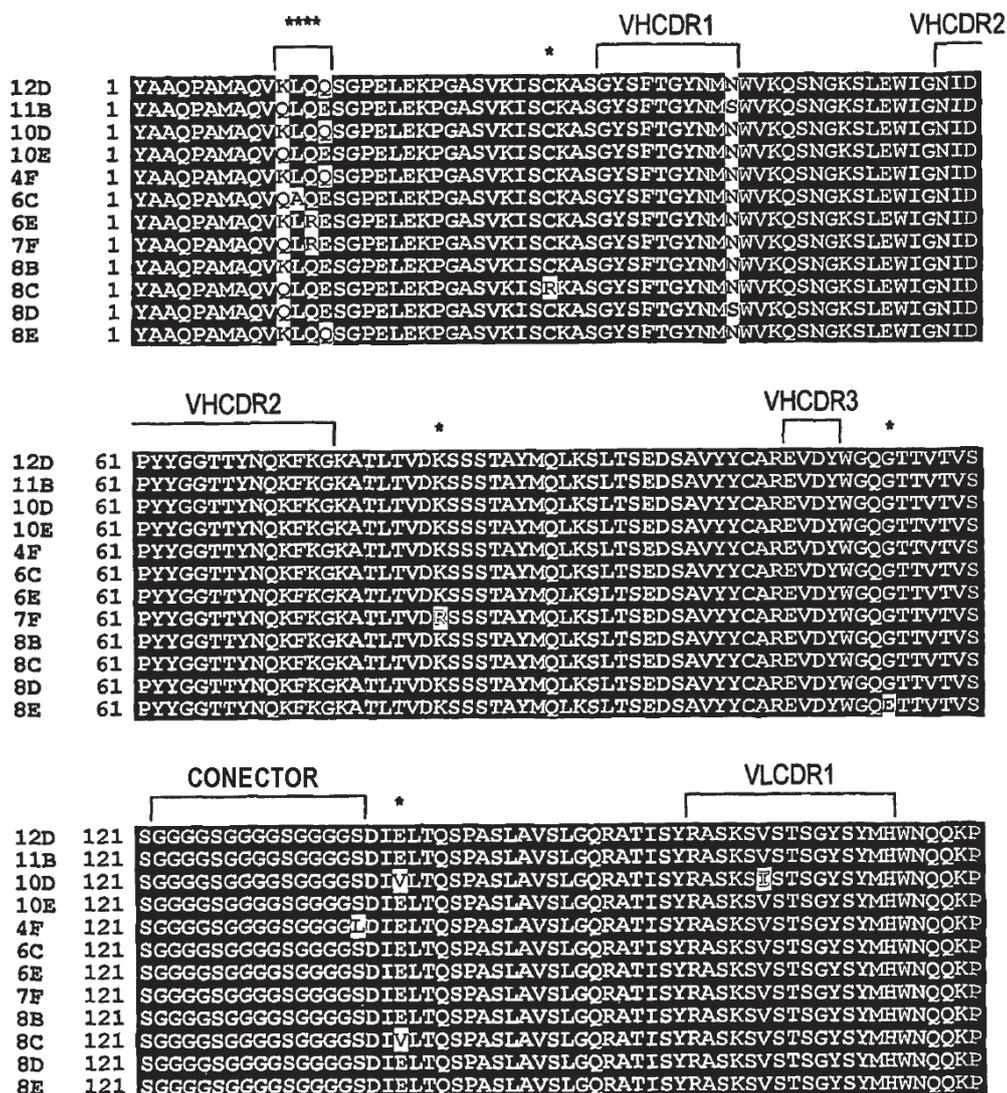


FIG. 11A

			VLCDR2		VLCDR3
12D	181	GQPPRLLTYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGT			
11B	181	GQPPRLLTYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGT			
10D	181	GQPPRLLTYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGT			
10E	181	GQPPRLLTYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGT			
4F	181	GQPPRLLTYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGT			
6C	181	GQPPRLLTYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGT			
6E	181	GQPPRLLTYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGT			
7F	181	GQPPRLLTYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGT			
8B	181	GQPPRLLTYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGT			
8C	181	GQPPRLLTYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGT			
8D	181	GQPPRLLTYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGT			
8E	181	GQPPRLLTYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGT			

		*
12D	241	KLEIKRAAAGAPVPY
11B	241	KLEIKRAAAGAPVPY
10D	241	KLEIKRAAAGAPVPY
10E	241	KLEIKRAAAGAPVPY
4F	241	KLEIKRAAAGAPVPY
6C	241	KLEIKRAAAGAPVPY
6E	241	KLEIKRAAAGAPVPY
7F	241	KLEIKRAAAGAPVPY
8B	241	KLEIKRAAAGAPVPY
8C	241	KLEIKRAAAGAPVPY
8D	238	KLEIKRAAAGAPVPY
8E	241	KLEIKRAAAGAPVPY

FIG. 11B

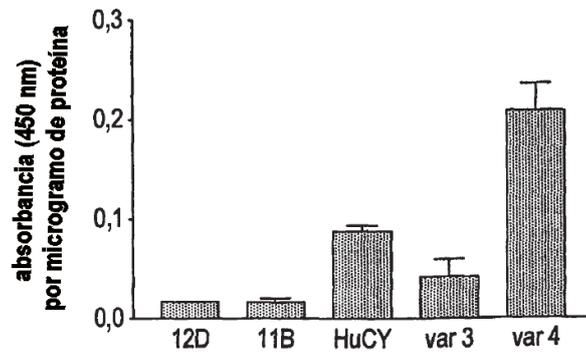


FIG. 12A

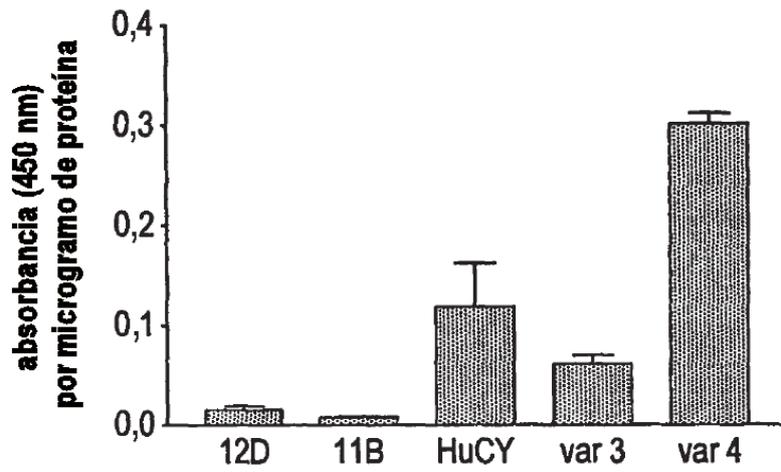


FIG. 12B

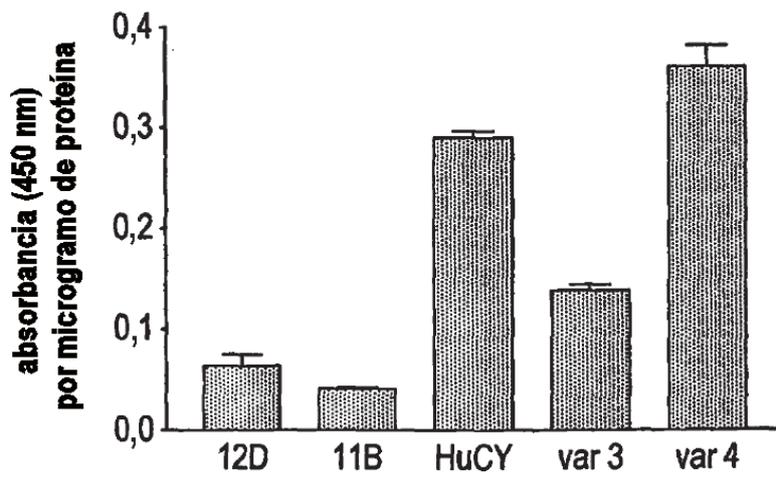


FIG. 12C

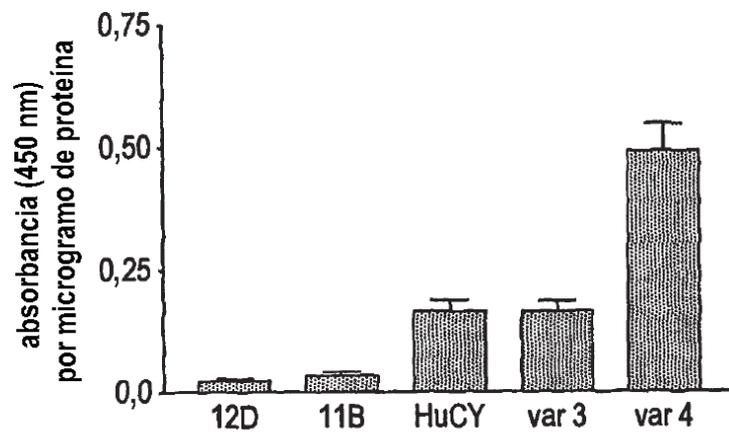


FIG. 12D

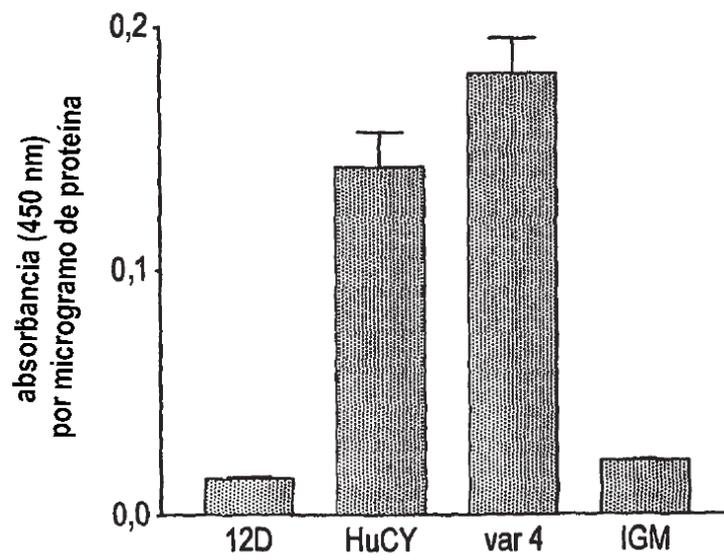


FIG. 13

12D	1	QVKIQOSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNVKQSNKGSLEWIGNIDPPYGGTTY
11B	1	QVQLQESGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNVKQSNKGSLEWIGNIDPPYGGTTY
HuCY	1	QVQLVQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNVKQAPKGSLEWIGNIDPPYGGTTY
var3	1	QVQLVQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNVKQAPKGSLEWIGNIDPPYGGTTY
var4	1	QVQLVQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNVKQAPKGSLEWIGNIDPPYGGTTY
12D	61	NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTISEDGAVYYCAREVDYWGQGTITVTVSSGGGGSGG
11B	61	NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTISEDGAVYYCAREVDYWGQGTITVTVSSGGGGSGG
HuCY	61	NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLRSEDYAVYYCAREVDYWGQGTITVTVSSGGGGSGG
var3	61	NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLRSEDYAVYYCAREVDYWGQGTITVTVSSGGGGSGG
var4	61	NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLRSEDYAVYYCAREVDYWGQGTITVTVSSGGGGSGG
12D	121	GGSGGGSDIELTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHMNVQOKPGQPPRLLI
11B	121	GGSGGGSDIELTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHMNVQOKPGQPPRLLI
HuCY	121	GGSGGGSDIVLTQSPASLAVSLGERATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQOKPGQPPRLLI
var3	121	GGSGGGSDIVLTQSPASLAVSLGERATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQOKPGQPPRLLI
var4	121	GGSGGGSDIVLTQSPASLAVSLGERATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQOKPGQPPRLLI
12D	181	YLVSNLESGVPA <del>R</del> FGSGGSDFTLN <del>I</del> HEVEEDAAIYCOHIRELTRSEGTKLEIKR
11B	181	YLVSNLESGVPA <del>R</del> FGSGGSDFTLN <del>I</del> HEVEEDAAIYCOHIRELTRSEGTKLEIKR
HuCY	181	YLVSNLESGVPPDRFSGSGGDFTLTISSVEAEDVAIYCOHIRELTRSEGTKLEIKR
var3	181	YLVSNLESGVPPDRFSGSGGDFTLTISSVEAEDVAIYCOHIRELTRSEGTKLEIKR
var4	181	YLVSDLED <del>C</del> VPPDRFSGSGGDFTLTISSVEAEDVAIYCOHIRELTRSEGTKLEIKR

FIG. 14

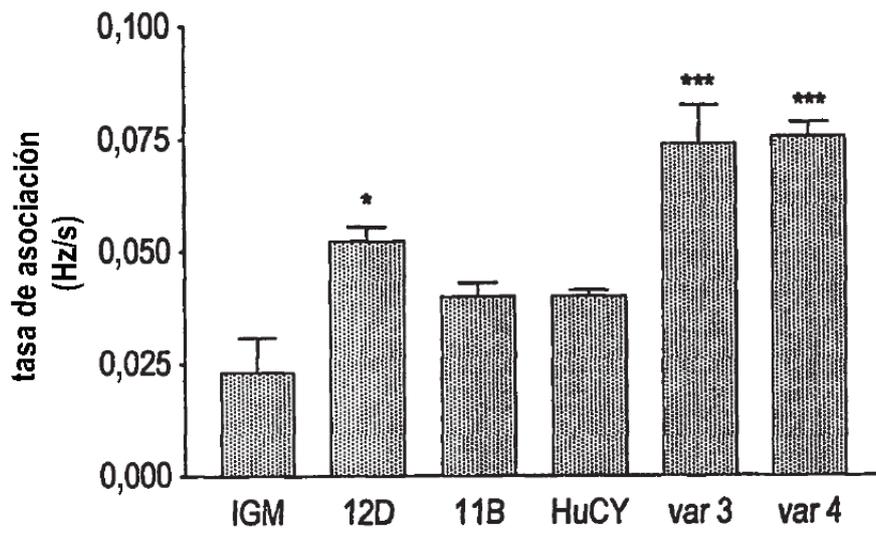


FIG. 15A

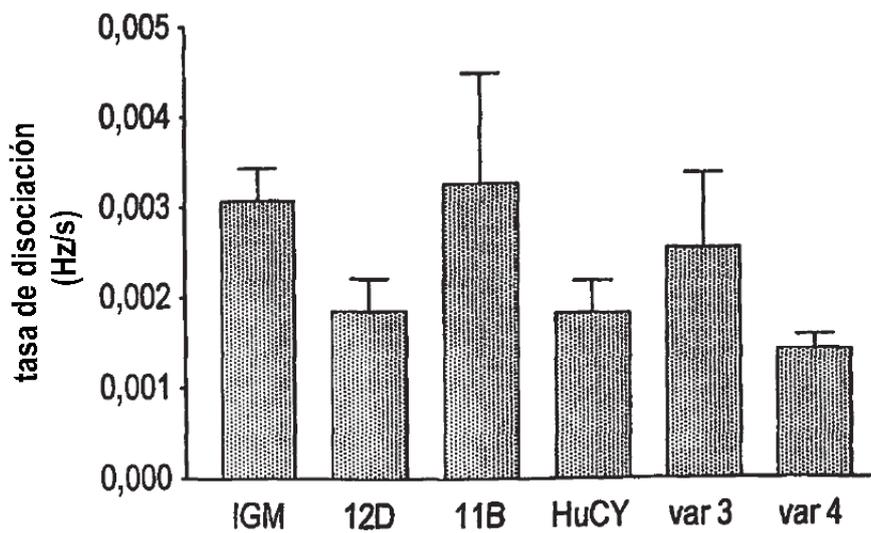


FIG. 15B