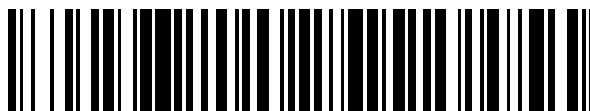


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 270**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2009 E 09784326 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 2318440**

54 Título: **Anticuerpos que se fijan a los receptores de la adrenomedulina y sus usos como medicamento**

30 Prioridad:

31.07.2008 FR 0804382

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

14.01.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (50.0%)
Jardin du Pharo, 58 boulevard Charles Livon
13284 Marseille Cedex 07, FR y
ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE
MARSEILLE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**OUAFIK, L'HOUCINE;
MABROUK, KAMEL;
KAAFARANY, ITIDAL y
MARTIN, PIERRE-MARIE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

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

ES 2 556 270 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que se fijan a los receptores de la adrenomedulina y sus usos como medicamento

La presente invención se refiere al dominio de los anticuerpos utilizados como medicamento destinado en especial al tratamiento de los tumores. Más en particular, la invención se refiere a los anticuerpos que se fijan a las proteínas que forman los receptores de la adrenomedulina y a sus utilizaciones como medicamento.

La angiogénesis es el proceso fundamental mediante el cual se forman los nuevos vasos sanguíneos. El proceso incluye la migración de las células endoteliales vasculares a un tejido seguido de la organización de dichas células endoteliales en vasos.

La angiogénesis desempeña una función determinante en el crecimiento tumoral y en el desarrollo de las metástasis. En los tejidos sanos existe un equilibrio entre los factores proangiogénicos y los factores antiangiogénicos; estos últimos se expresan o están desregulados en los procesos tumorales (HANAHAN y FOLKMAN, *Cell*, 1996, 86:353-364). Más allá de un determinado volumen tumoral, el crecimiento del tumor necesita el desarrollo de una neovascularización que le aportará oxígeno y los nutrientes necesarios. Las células tumorales secretan por sí solas factores angiogénicos y estimulan su microentorno para que aumente la biodisponibilidad de los factores necesarios para el desarrollo de la angiogénesis tumoral.

Desde hace muchos años se conoce la existencia de una red vascular muy desarrollada en el interior de los tumores. A partir de 1971 se cuenta con la hipótesis de FOLKMAN (*N. Engl. J. Med.*, 1971, 285: 1182-6) de que el crecimiento tumoral dependía de la neovascularización (angiogénesis) y de que el paso de la fase latente a la fase agresiva estaba controlado directamente por la neovascularización gracias a unas sustancias con capacidad de difusión que proceden del tumor.

En el control de la angiogénesis intervienen muchos factores. Está desencadenada por una descompensación del equilibrio entre los factores proangiogénicos [por ejemplo, el factor de crecimiento del endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*: VEGF), el factor de crecimiento de los fibroblastos (*fibroblast growth factor*: FGF), el factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*: EGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (*platelet derived growth factor*: PDGF), las angiopoyetinas o incluso la angiogenina] y los factores antiangiogénicos (por ejemplo, endostatina y angiostatina, trombospondinas, vasostatina, prolactina o incluso interferones).

Las células tumorales, al igual que las células inflamatorias, macrófagos, linfocitos y miofibroblastos presentes en el microentorno tumoral, secretan factores angiogénicos.

Desde hace mucho se distinguen dos fases en el transcurso de la angiogénesis. La primera fase es una fase de inducción que implica la desestabilización de la vascularización tisular ya existente y la destrucción de la membrana basal que rodea los vasos ya existentes, y que necesita la proliferación y la migración de las células endoteliales, así como su diferenciación en estructuras capilares. La segunda fase es una fase de estabilización/maduración durante la cual se reclutan las células perivasculares (pericitos), de resultados de lo cual se estabilizan los nuevos capilares, y en el transcurso de la cual se recompone una membrana basal (HANAHAN y FOLKMAN, 1996, citado más arriba).

En la actualidad ha quedado bien establecido que el crecimiento de un tumor y la formación de las metástasis son directamente dependientes de la angiogénesis, lo que sugiere que la inhibición de la angiogénesis puede representar una estrategia eficaz para impedir la progresión tumoral y controlar la difusión metastásica.

La adrenomedulina (AM), aislada a partir del feocromocitoma humano (cáncer de la médula suprarrenal), es un péptido vasoactivo que actúa de forma local como una hormona autocrina/paracrina y ejerce muchas acciones biológicas (HINSON et al., *Endocr. Rev.* 2000, 21: 138-67; CARON y SMITHIES, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98: 615-619; SHINDO et al., *Circulation*, 2001,104: 1964-1971).

Muchos estudios han demostrado que los sitios de fijación de la adrenomedulina están presentes en las células de la mayoría de los tejidos, tales como el corazón, el riñón, el cerebro, el pulmón y la corteza suprarrenal. Los sitios de fijación están igualmente presentes en las células del estroma de los tumores. También se ha puesto de manifiesto la importancia de la adrenomedulina en el crecimiento tumoral (OUAFIK et al., *Am. J. Pathol.*, 2002, 160: 1279-92; MARTINEZ et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 2002, 94: 1226-37; OEHLER et al., *Oncogene*, 2001, 20: 2937-45; ISHIKAWA et al., *Oncogene*, 2003, 22: 1238-1242).

Este péptido puede también desempeñar una función positiva en la regulación de la angiogénesis durante la remodelación vascular en respuesta a la isquemia, en el aparato reproductor de la mujer, durante el desarrollo vascular embrionario, y durante el desarrollo y la vascularización de la placenta.

Recientemente, varios equipos han puesto de manifiesto la importancia de la adrenomedulina en la proliferación, la migración y la invasión de las células endoteliales (OUAFIK et al., 2002, citado más arriba; KIM et al., *FASEB J.*, 2003, 17: 1937-9; FERNANDEZ-SAUZE et al., *Int. J. Cancer*, 2004, 108: 797-804).

Mediante los análisis de la angiogénesis *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que la adrenomedulina actúa sobre una

de las últimas etapas de la neovascularización, que consiste en la reorganización de las células endoteliales en túbulos y es algo que ocurre con independencia del VEGF (FERNANDEZ-SAUZE et al., 2004, citado más arriba).

Muchos estudios demuestran que la adrenomedulina posee propiedades angiogénicas en la mayoría de los tumores (mama, próstata, colon, pulmón, riñón, vías respiratorias, vejiga) (OUAFIK et al., 2002, citado más arriba);
 5 FERNANDEZ-SAUZE et al. 2004, citado más arriba; NIKITENKO et al., *Br. J. Cancer*, 2006, 94: 1-7). En los ratones heterocigotos +/- para la adrenomedulina, el volumen tumoral disminuye con respecto a los ratones silvestres (IIMURO et al., *Circ. Res.*, 2004, 95: 415-423). Este efecto está asociado a una reducción de la neovascularización. El bloqueo de la acción de la adrenomedulina mediante un antagonista (adrenomedulina₂₂₋₅₂) inhibe el crecimiento de los tumores pancreáticos xenotrasplantados al desestabilizar la vascularización de los tumores (ISHIKAWA et al.,
 10 *Oncogene*, 2003, 22: 1238-1242). Se han observado efectos similares en los xenotrasplantes desarrollados a partir de neurogliocitos tumorales (OUAFIK et al., 2002, citado más arriba).

El descubrimiento de la proteína sérica AMBP-1 (proteína 1 de fijación a la adrenomedulina, *adrenomedullin binding protein-1*) que se fija a la adrenomedulina permite suponer que está regulada la biodisponibilidad de esta última. La AMBP-1 se ha descrito y caracterizado que es el factor H del complemento humano. De manera general, las
 15 proteínas de fijación limitan el transporte del péptido al espacio intersticial y el acceso a sus receptores específicos. Modulan también la actividad biológica del péptido y lo protegen de la eliminación metabólica por las proteasas, lo que prolonga así su semivida en la circulación.

Los receptores de la adrenomedulina (AMR, por su nombre en inglés) son complejos multiproteicos compuestos por la asociación de al menos dos proteínas, el CRLR (receptor similar al receptor de la calcitonina; *calcitonin receptor like receptor*) y una proteína RAMP (proteína modificadora de la actividad del receptor; *receptor activity-modifying protein*) (McLATCHIE et al., *Nature*, 1998, 6683: 333-9).

El receptor CRLR se ha aisló en 1993 (NJUKI et al., *Clin Sci.*, 1993, 4: 385-8; CHANG et al., *Neuron*, 1993, 6: 1187-95). Comprende siete dominios transmembranarios acoplados a una proteína G. La secuencia del CRLR se estableció en los humanos en 1996 (AIYAR et al., *J. Biol. Chem.*, 1996, 19: 11325-9) y en el cerdo en 1998
 25 (ELSHOURBAGY et al., *Endocrinology*, 1998, 4: 1678-83). El CRLR pertenece a la clase II de los RCPG (receptores acoplados a proteínas G, *G-protein-coupled receptors*), clase que agrupa a los receptores de péptidos como el glucagón y los péptidos relacionados con el glucagón (GLP, por su nombre en inglés), la secretina, la hormona paratiroidea o la calcitonina. Los RCPG son de naturaleza polipeptídica y comprenden una parte extracelular que lleva el sitio de fijación del ligando, una parte transmembranaria con siete hélices y una parte intracelular en contacto con
 30 las proteínas G que garantizan la transferencia y la amplificación de la señal recibida por el receptor. Se pueden observar tres bucles extracelulares (denominados E1, E2 y E3) y tres bucles intracelulares (I1, I2 e I3) (BOCKAERT y PIN, *EMBO J.*, 1999, 18: 1723-1729). Estas proteínas pueden estar sujetas a modificaciones postraduccionales, del tipo N-glucosilación, acetilación por los compuestos lipídicos que forman, a veces, un pseudocuarto bucle intracelular (I4) (ASSIE et al., *EMC-Endocrinologie*, 2004, 1: 169-199).

35 Durante algunos años ha reinado una cierta confusión en cuanto a la naturaleza exacta del receptor de la adrenomedulina debido a que la adrenomedulina presenta homología con el CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina, *calcitonin gene related peptide*) y a que pertenece a la familia de los péptidos calcitonina/CGRP/amilina. En 1998, McLATCHIE y sus colaboradores (referencia citada más arriba) demostraron que el receptor CRLR puede generar dos receptores farmacológicamente distintos por asociación a una familia de
 40 proteínas, de 160 aminoácidos (14-21 kDa), con un único dominio transmembranario, denominadas RAMP. El CRLR sólo funciona correctamente en el estado de dímero con una proteína RAMP.

Existen tres isoformas proteicas de RAMP: RAMP1, RAMP2 y RAMP3. Estas proteínas tienen menos un 30% de identidad de secuencia entre ellas, pero presentan similitudes de organización estructural. En los humanos, los genes que codifican RAMP1, RAMP2 y RAMP3 se localizan en los cromosomas 2, 17 y 7, respectivamente. Las
 45 proteínas RAMP constan de un solo dominio transmembranario; el extremo amino extracelular es relativamente largo y desempeña una función importante en la especialización y la funcionalidad del receptor (CGRP o adrenomedulina) (KUWASAKO et al., *J. Biol. Chem.* 2001, 275: 29602-9).

Se les atribuyen dos funciones esenciales a las proteínas RAMP: la determinación del receptor y el transporte intracelular.

50 – Determinación del receptor: la función fundamental de las proteínas RAMP es definir la especificidad del ligando que interacciona directamente en la superficie celular. RAMP1 presenta el CRLR como una glucoproteína madura para formar el receptor del CGRP. De igual forma, RAMP2 y RAMP3 presentan el CRLR como una glucoproteína madura para formar los receptores de la adrenomedulina. Así pues, la naturaleza de las proteínas RAMP presentes en un tipo celular, las interacciones proteicas que se establecen entre las diferentes compañeras (CRLR, RAMP1, RAMP2, RAMP3) y la proporción de cada una de las proteínas permiten a las células responder específicamente a los diferentes neuropéptidos (BÜHLMANN et al., *FEBS Lett.*, 2000, 486: 320-4; CHAKRAVARTY et al., *Br J Pharmacol*, 2000, 130: 189-95).

- Transporte intracelular: el CRLR necesita la coexpresión de las proteínas RAMP para su transporte hacia la membrana citoplasmática (SEXTON et al., *Cell Signal*, 2001, 13: 73-83). Y viceversa: las proteínas RAMP necesitan el CRLR para su translocación en la superficie celular (FLAHAUT et al., *J Biol Chem.*, 2002, 277: 14731-7).

5 El crecimiento de los tumores sólidos está controlado por mecanismos intratumorales y por interacciones entre el tumor y el tejido circundante. En la fase de inactividad se detectan pocos vasos. En cambio, durante la fase de crecimiento y durante la fase invasiva, la angiogénesis es masiva. Existe una estrecha correlación entre el crecimiento tumoral y el número de capilares intratumorales. Así pues, los tumores sólidos dependientes de la angiogénesis presentan una fase preangiogénica latente y una fase angiogénica agresiva.

10 El tratamiento de los tumores, en particular de los tumores sólidos, descansa principalmente en la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Sin embargo, a pesar del progreso obtenido en estos ámbitos y de los resultados alentadores, se revela crucial disponer de nuevos antineoplásicos con un mecanismo de acción diferente al de los antineoplásicos disponibles, entre otros, en el ámbito de los tratamientos dirigidos, para aumentar la eficacia del tratamiento, en especial en el caso de la aparición de resistencia a un tratamiento y/o de efectos indeseables
15 demasiado importantes.

Junto a los tratamientos que buscan la destrucción de las células proliferativas (quimioterapia) y de la hormonoterapia en el ámbito de los cánceres hormonodependientes (mama, próstata), los tratamientos dirigidos apuntan al conjunto de vías que contribuyen al desarrollo tumoral, como las señales de proliferación, el ciclo celular, la apoptosis, la invasión o incluso la angiogénesis (FOLKMAN, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2007, 6: 273-286; NERI y
20 BICKNELL, *Nat. Rev. Cancer*, 2005, 5: 436-446).

La presencia de una neoangiogénesis tumoral asociada a la sobreexpresión de los ARNm de los factores angiogénicos tales como el VEGF y el FGF-2 han tenido como resultado que varias empresas farmacéuticas desarrollen inhibidores (anticuerpos específicos, oligonucleótidos antisentido, inhibidores farmacológicos). Un determinado número de moléculas, en la actualidad en ensayo clínico, intervienen en los protocolos terapéuticos
25 junto con los tratamientos clásicos.

Sin embargo, se sabe que la utilización de anticuerpos anti-VEGF para el tratamiento de los tumores, aunque dé buenos resultados (detienen rápidamente el crecimiento del tumor), tiene efectos tóxicos importantes. Además, una recidiva (reanudación del crecimiento del tumor) puede intervenir a más o menos corto plazo después de detener el tratamiento. Además, estos tratamientos apuntan a las células endoteliales, pero no al conjunto de células del
30 estroma tumoral implicadas en el establecimiento de una neoangiogénesis funcional.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de tratamientos eficaces dirigidos específicamente a bloquear, o bien inhibir, el crecimiento tumoral y/o a hacer retroceder el tamaño de los tumores.

En este contexto, la acción selectiva sobre la adrenomedulina a través de sus receptores con fines terapéuticos, constituye una estrategia pertinente debido a que su mecanismo de acción actúa al mismo tiempo sobre las células
35 endoteliales y también, a diferencia del VEGF, sobre la célula tumoral y sobre el conjunto de células del estroma, en particular de los pericitos.

Así pues, FERNANDEZ-SAUZE et al. (2004, citado más arriba) han demostrado que, *in vitro*, las mezclas de anticuerpos policlonales anti-CRLR/anti-RAMP2, por una parte, y anti-CRLR/anti-RAMP3, por otra parte, inhiben la fijación específica de la adrenomedulina a su receptor en varios tipos celulares y bloquean la formación de los
40 canales vasculares. Más recientemente, se ha descrito en la solicitud de patente internacional WO 2007/045927 que las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos que se fijan específicamente a las proteínas humanas RAMP2 o RAMP3 pueden ser útiles para tratar o prevenir el cáncer mediante, por ejemplo, la inhibición de la angiogénesis o de la proliferación de las células cancerosas.

Los inventores han preparado anticuerpos que se fijan a las proteínas que forman los receptores de la adrenomedulina y han demostrado, de manera sorprendente, que una mezcla de al menos tres anticuerpos que se fijan a tres proteínas diferentes que forman los receptores de la adrenomedulina, más en concreto las proteínas hCRLR, hRAMP2 y hRAMP3, presentaba una eficacia antitumoral *in vitro* y/o *in vivo* significativamente más importante con respecto a la utilización de un único anticuerpo anti-CRLR, anti-RAMP2 o anti-RAMP3, o incluso con respecto a la utilización de una mezcla de dos anticuerpos anti-CRLR/anti-RAMP2 o anti-CRLR/anti-RAMP3.

50 Así pues, la presente invención tiene por objeto una mezcla de al menos tres anticuerpos y/o fragmentos de dichos anticuerpos que se fijan a tres proteínas que forman los receptores de la adrenomedulina, en donde cada anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo se fija a una proteína diferente, y cada anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo es un antagonista de uno de dichos receptores de la adrenomedulina, para su utilización como medicamento.

Con «proteínas que forman los receptores de la adrenomedulina» se hace referencia a las proteínas cuya asociación forma los receptores de la adrenomedulina (HINSON et al., 2000, citado más arriba; McLATCHIE et al., 1998, citado más arriba). Preferiblemente, dichas proteínas son proteínas de mamífero, e incluso más preferiblemente, proteínas de origen humano. A modo de ejemplos no limitativos de proteínas que forman los receptores de la adrenomedulina,

se pueden citar las proteínas siguientes: la proteína CRLR (receptor similar al receptor de la calcitonina; *calcitonin receptor like receptor*), las proteínas asociadas RAMP (proteína modificadora de la actividad del receptor; *receptor activity-modifying protein*), como las proteínas RAMP2 y RAMP3. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas CRLR, RAMP2 y RAMP3 de origen humano están disponibles con los números de acceso gi|5031621, gi|118572585 y gi|5032023, respectivamente, en la base de datos GENBANK.

Según un modo de puesta en práctica preferido de la presente invención, las tres proteínas que forman los receptores de la adrenomedulina son la proteína CRLR y las proteínas RAMP2 y RAMP3.

Según otro modo ventajoso de puesta en práctica de la presente invención, dichos anticuerpos y fragmentos de anticuerpo se fijan a un dominio extracelular de las proteínas que forman los receptores de la adrenomedulina implicados, y más en particular a los péptidos de las secuencias SEQ ID n.º 1 o 2 para los anticuerpos anti-CRLR, a los péptidos de las secuencias SEQ ID n.º 3 o 4 para los anticuerpos anti-RAMP2 y a los péptidos de las secuencias SEQ ID n.º 5 o 6 para los anticuerpos anti-RAMP3.

La invención abarca los anticuerpos policlonales o monoclonales, naturales, recombinantes o sintéticos, los anticuerpos quiméricos tales como los anticuerpos humanizados, así como sus fragmentos (por ejemplo: Fab, Fv, scFv) que hayan conservado su capacidad de fijación a dichas proteínas, o más en particular a los péptidos de las secuencias SEQ ID n.º 1 o 2 para los anticuerpos anti-CRLR, a los péptidos de las secuencias SEQ ID n.º 3 o 4 para los anticuerpos anti-RAMP2, y a los péptidos de las secuencias SEQ ID n.º 5 o 6 para los anticuerpos anti-RAMP3.

Dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo son antagonistas de los receptores de la adrenomedulina, es decir, que bloquean (o inhiben) de una forma dependiente de la dosis la fijación de la adrenomedulina a sus receptores.

Por «anticuerpo recombinante» se entiende un anticuerpo producido por ingeniería genética (p. ej., clonación, amplificación).

Por «anticuerpo sintético» se entiende un anticuerpo producido por síntesis enzimática y/o química.

Los anticuerpos según la presente invención se pueden obtener por inmunización de un animal con una proteína que forma los receptores de la adrenomedulina, un péptido que comprende o consta de un fragmento de al menos 20, preferiblemente 22, aminoácidos de dicha proteína, o un péptido que comprende o consta de un péptido derivado de dicho fragmento.

Con «péptido procedente de un fragmento de una proteína que forma los receptores de la adrenomedulina» se hace referencia a un fragmento de dicha proteína en el cual han sido eliminados uno o varios restos de aminoácidos, y/o han sido sustituidos uno o varios restos de aminoácidos por un resto de aminoácido natural o no natural o de configuración del tipo D o β , y/o han sido insertados uno o varios restos de aminoácidos naturales o no naturales, y/o han sido modificados uno o varios enlaces amida, siempre y cuando dicho péptido procedente de un fragmento de una proteína que forma los receptores de la adrenomedulina conserve su capacidad para inducir la producción, por dicho animal, de anticuerpos que se fijan a dicha proteína.

De manera ventajosa, cada uno de los péptidos que vienen a continuación se puede utilizar para inmunizar un animal con el objeto de obtener un anticuerpo según la presente invención:

- péptidos procedentes, respectivamente, de los fragmentos S27-K51 y P89-R119 de la proteína hCRLR:

SPEDSIQLGVTRNKIMTAQYEAYQK (SEQ ID n.º 1),

PDYFQDFDPSEKVTKIADQDGNWFRHPASNR (SEQ ID n.º 2),

- péptidos procedentes, respectivamente, de los fragmentos K59-K81 y R91-R118 de la proteína hRAMP2:

KNYETAVQFAWNHYKDQMDPIEK (SEQ ID n.º 3),

RPYSTLRDALEHFAELFDLGFPNPLAER (SEQ ID n.º 4),

- péptidos procedentes, respectivamente, de los fragmentos L34-K55 y G91-E112 de la proteína hRAMP3:

LERLPLAGKAFADMMGKVDVWK (SEQ ID n.º 5),

GFIGIHRQFFSNATVDRVHLE (SEQ ID n.º 6).

El resto de aminoácido escrito como «A» corresponde a un resto alanina obtenido por sustitución de un resto cisteína presente en la secuencia peptídica de las proteínas hCRLR, hRAMP2 o hRAMP3 naturales. La sustitución del resto cisteína por una alanina permite obtener una secuencia peptídica lineal bien caracterizada e impide obtener mezclas de péptidos que comprenden dímeros (por formación de puentes disulfuro entre las cadenas).

Preferiblemente, el animal inmunizado es un mamífero, tal como, por ejemplo, el caballo, la cabra, el conejo, el ratón y la rata, y aún más preferiblemente el conejo o el ratón.

Según otro modo de puesta en práctica concreto de la presente invención, dichos anticuerpos son anticuerpos policlonales, preferiblemente anticuerpos policlonales de conejo.

- 5 Es posible que la mezcla de anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos según la presente invención comprenda al mismo tiempo anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, tales como los definidos más arriba.

En dicha mezcla, dichos anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo pueden estar presentes en cualquier proporción de los unos por los otros, como por ejemplo una relación comprendida entre 0,1 y 10. Una relación preferencial es una proporción de 1.

- 10 Ventajosamente, dicho medicamento está destinado al tratamiento preventivo o curativo de los tumores, preferiblemente los que necesitan su vascularización para crecer, más en particular en los tumores sólidos.

Por «tumores sólidos» se entiende, por ejemplo, los tumores del sistema nervioso central, tales como los gliomas (por ejemplo, los glioblastomas), los tumores de próstata, de hígado, de hueso, de pulmón, de colon, de piel o incluso de riñón.

- 15 La invención abarca igualmente los tumores de crecimiento rápido, así como los tumores en fase de escape terapéutico.

La utilización de los anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo a modo de medicamento según la presente invención se puede simultanear, separar o escalonar en el tiempo, en especial durante un tratamiento de un sujeto que padece un cáncer.

- 20 La presente invención tiene también por objeto una mezcla de al menos tres anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo, tales como los definidos más arriba, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los tumores, preferiblemente de los tumores sólidos.

La presente invención tiene igualmente por objeto una composición farmacéutica que comprende al menos tres anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo, tales como los definidos más arriba, y al menos un vehículo

- 25 farmacéuticamente aceptable.

A modo de ejemplos no limitativos de vehículo farmacéuticamente aceptable, se pueden citar los dispersantes, solubilizantes, estabilizantes, conservantes, etc. Los vehículos farmacéuticamente aceptables utilizables en las formulaciones (líquidas y/o inyectables y/o sólidas) son en especial la metilcelulosa, la hidroximetilcelulosa, la carboximetilcelulosa, las ciclodextrinas, el polisorbato 80, el manitol, la gelatina, la lactosa, los aceites vegetales o

- 30 animales, la goma arábiga, etc.

Dicho medicamento o dicha composición farmacéutica se puede presentar en forma de una solución salina, fisiológica, isotónica y tamponada, compatible con un uso farmacéutico y conocido por el experto en la técnica.

Dicho medicamento o dicha composición farmacéutica se puede formular en cualquier forma farmacéuticamente aceptable, como por ejemplo en forma de suspensión inyectable, de geles, aceites, comprimidos, supositorios,

- 35 píldoras, cápsulas, etc., finalmente utilizado por medio de formas galénicas o de dispositivos que garantizan una liberación prolongada y/o retrasada. Para este tipo de formulación se utiliza ventajosamente un agente tal como la celulosa, los carbonatos o los almidones.

La cantidad de anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo utilizados a modo de medicamento según la invención o presentes en la composición farmacéutica según la invención se puede modular para obtener una tasa circulante del principio activo (en un líquido fisiológico tal como la sangre) necesaria para la obtención del efecto terapéutico deseado para un sujeto concreto. La cantidad elegida dependerá de muchos factores, en particular de la vía de administración, de la duración de administración, del momento de la administración, de la rapidez de eliminación del compuesto, del o de los diferentes productos utilizados en combinación con dicho medicamento o dicha composición farmacéutica, de la edad, del peso y de la condición física del paciente, así como de su historia clínica, y de

- 45 cualquier otra información conocida en medicina.

La prescripción del médico que realiza el tratamiento podrá comenzar con dosis inferiores a las generalmente utilizadas para los anticuerpos, y luego aumentará esas dosis progresivamente para controlar mejor la aparición de posibles efectos secundarios.

- 50 En general, la dosis diaria del compuesto será la dosis mínima para obtener el efecto terapéutico. Esta dosis dependerá de los diferentes factores citados anteriormente. Las dosis para un humano estarán comprendidas en general entre 0,1 y 100 mg/kg al día, y preferiblemente entre 4 y 25 mg/kg al día, y aún más ventajosamente entre 7 y 14 mg/kg al día.

Si fuera necesario, la dosis diaria se puede administrar en dos, tres, cuatro, cinco, seis o más tomas al día o

mediante varias subdosis administradas en los intervalos adecuados durante el día.

De manera ventajosa, la composición según la presente invención se administra preferiblemente por vía parenteral o directamente, si esto es posible en el tumor (administración intratumoral).

5 El medicamento o la composición farmacéutica según la presente invención se puede utilizar en monoterapia o en politerapia con al menos otro compuesto terapéuticamente activo, tal como por ejemplo otro compuesto antineoplásico. La utilización de dicho medicamento o de dicha composición farmacéutica, y de dicho compuesto terapéuticamente activo, se puede simultanear, separar o escalonar en el tiempo, en especial durante un tratamiento de un sujeto que padece un cáncer.

10 La presente invención tiene también por objeto un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo policlonal, que se fija al dominio extracelular de la proteína CRLR, que se puede obtener por inmunización de un animal no humano, preferiblemente un conejo, con un péptido elegido entre los péptidos de secuencia SEQ ID n.º 1 y SEQ ID n.º 2, y su utilización para detectar la proteína CRLR *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, en un animal, preferiblemente un mamífero, aún más preferiblemente en los humanos.

15 La presente invención también tiene por objeto un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo policlonal, que se fija a un dominio extracelular de la proteína RAMP2, que se puede obtener por inmunización de un animal no humano, preferiblemente un conejo, con un péptido elegido entre los péptidos de secuencia SEQ ID n.º 3 y SEQ ID n.º 4, y su utilización para detectar la proteína RAMP2 *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, en un animal, preferiblemente un mamífero, aún más preferiblemente en los humanos.

20 La presente invención también tiene por objeto un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo policlonal, que se fija al dominio extracelular de la proteína RAMP3, que se puede obtener por inmunización de un animal no humano, preferiblemente un conejo, con un péptido elegido entre los péptidos de secuencia SEQ ID n.º 5 y SEQ ID n.º 6, y su utilización para detectar la proteína RAMP3 *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, en un animal, preferiblemente un mamífero, aún más preferiblemente en los humanos.

25 La presente invención también tiene por objeto un procedimiento de obtención de un anticuerpo que se fija a un dominio extracelular de la proteína CRLR, caracterizado por comprender una etapa de inmunización de un animal no humano con el péptido de secuencia SEQ ID n.º 2.

Los inventores describen igualmente un procedimiento de obtención de un anticuerpo que se fija a un dominio extracelular de la CRLR, caracterizado por comprender una etapa de inmunización de un animal con un péptido elegido entre los péptidos de secuencia SEQ ID n.º 1 y SEQ ID n.º 2.

30 La presente invención también tiene por objeto un procedimiento de obtención de un anticuerpo que se fija al dominio extracelular de RAMP2, caracterizado por comprender una etapa de inmunización de un animal no humano con el péptido de secuencia SEQ ID n.º 4.

35 Los inventores describen igualmente un procedimiento de obtención de un anticuerpo que se fija al dominio extracelular de RAMP2, caracterizado por comprender una etapa de inmunización de un animal con un péptido elegido entre los péptidos de secuencia SEQ ID n.º 3 y SEQ ID n.º 4.

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de obtención de un anticuerpo que se fija al dominio extracelular de RAMP3, caracterizado por comprender una etapa de inmunización de un animal no humano con el péptido de secuencia SEQ ID n.º 6.

40 Los inventores describen igualmente un procedimiento de obtención de un anticuerpo que se fija al dominio extracelular de RAMP3, caracterizado por comprender una etapa de inmunización de un animal con un péptido elegido entre los péptidos de secuencia SEQ ID n.º 5 y SEQ ID n.º 6.

La presente invención también tiene por objeto un procedimiento de obtención de una mezcla de tres anticuerpos que se fijan a los péptidos de secuencia SEQ ID n.º 2, 3 y 5, tales como los definidos más arriba, que comprende:

- una etapa de inmunización de un animal no humano con el péptido de secuencia SEQ ID n.º 2,
- 45 – una etapa de inmunización de un animal no humano con el péptido de secuencia SEQ ID n.º 3, y
- una etapa de inmunización de un animal no humano con el péptido de secuencia SEQ ID n.º 5.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención aparecerán con la lectura de los ejemplos que vienen a continuación, que se deben considerar como ilustrativos y no limitativos, así como de las figuras adjuntas:

50 Figura 1: Estudio de la proliferación celular *in vitro*. A. Efecto de los anticuerpos contra los receptores de la adrenomedulina (mezcla de anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3) y contra la adrenomedulina en función de la fijación de la adrenomedulina marcada con yodo 125 radiactivo sobre las membranas de los neuroglíocitos U87. Con 60 µg de anticuerpos contra los receptores de la adrenomedulina, la inhibición de la fijación

de la I¹²⁵-AM es más importante que con 10 µg de anticuerpo. B. En la estirpe procedente de glioblastoma (U87), el tratamiento durante 6 días con el anticuerpo anti-AM o la mezcla de anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3 inhibe la proliferación celular del 30% al 60% de una forma dependiente de la dosis, con respecto a las células de control que se incuban en presencia del suero preinmunitario de conejo. *Prueba ANOVA*: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

5

Figura 2: La administración intratumoral de los anticuerpos anti-AMR inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*. A. La administración intratumoral de la mezcla de los anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3 (250 µg/animal) induce una inhibición del crecimiento tumoral de los xenotrasplantes del 60% al 70% después de 21 días de tratamiento con respecto a los ratones de control tratados con el suero preinmunitario de conejo ($n = 10$). *Prueba ANOVA*: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. B. Fotos de los tumores de control y tratados al cabo de 16 días de tratamiento.

10

Figura 3: La administración intraperitoneal de los anticuerpos anti-AMR inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*. A. Con el objetivo de establecer un tratamiento por vía intraperitoneal, se han analizado diferentes dosis (100, 200 y 300 µg) de la mezcla de anticuerpos anti-AMR en los ratones xenotrasplantados con la estirpe U87 ($n = 8$). B. La inyección por vía intraperitoneal de 330 µg/ratón de una mezcla de anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3 inhibe el crecimiento tumoral y aumenta la supervivencia de los ratones hasta 175 días con respecto a los ratones tratados con las IgG de control que murieron entre 20 y 25 días después del tratamiento ($n = 10$). C. Ratones atímicos (nu/nu) xenotrasplantados con la estirpe U87 se han tratado con los anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2, anti-RAMP3, la mezcla de anticuerpos anti-CRLR/anti-RAMP2/anti-RAMP3 o las IgG de control de conejo. A continuación se ha medido el volumen tumoral. *Prueba ANOVA*: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

15

Figura 4: Los anticuerpos anti-AMR desestabilizan la vascularización tumoral *in vivo*. A. Los análisis histológicos realizados con cortes de tumores de ratones que han recibido por inyección lectina biotinilada (marcador que tiene una alta afinidad por las células endoteliales) y después de revelar con estreptavidina muestran una desestabilización de la arquitectura vascular que se traduce en una disminución del tamaño de los vasos con respecto a los tumores de control. El estudio inmunohistoquímico con los marcadores de los pericitos (desmina o α -SMA) muestra una disminución muy significativa, o incluso una desaparición, de los pericitos a nivel de los vasos de los tumores tratados con respecto a los tumores de control. B. La cuantificación de la vascularización y de la densidad celular (células endoteliales frente a pericitos) entre los 2 grupos de animales muestra una disminución importante del número de células endoteliales y de los pericitos marcados por unidad de superficie en los tumores tratados con los anticuerpos anti-AMR. *Prueba ANOVA*: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. C. La marcación inmunohistoquímica de las células endoteliales (FvIII)/pericitos (α -SMA) muestra que la arquitectura vascular «normal» a nivel del riñón de ratón no se ve afectada por efectos del tratamiento con los anticuerpos anti-AMR por vía general.

25

30

Figura 5: Los anticuerpos anti-AMR inducen la apoptosis de las células endoteliales y de los pericitos. A. La marcación con ayuda del anticuerpo monoclonal F7-26 muestra que las células endoteliales desprendidas del endotelio, por el efecto de la ausencia de los pericitos, debido al tratamiento con los anticuerpos anti-AMR, acaban sufriendo la apoptosis. B. La marcación de las células endoteliales (FvIII) y de los pericitos (α -SMA) en paralelo con la marcación con ayuda del anticuerpo monoclonal F7-26 muestra que los pericitos, como las células endoteliales, están en estado de apoptosis en los tumores tratados con los anticuerpos anti-AMR con respecto a los tumores de control. C. La cuantificación de la densidad de las células endoteliales en apoptosis muestra un aumento significativo en los tumores tratados con los anticuerpos anti-AMR con respecto a los tumores de control. La marcación de la proliferación celular general al 16.º día de tratamiento solo muestra una disminución del 25% al 35% en los tumores tratados con respecto a los tumores de control. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

35

40

Figura 6: La adrenomedulina activa la migración celular de una forma autocrina/paracrina durante el proceso angiogénico *in vivo*. A. La marcación inmunohistoquímica con hematoxilina/eosina de los cortes de implantes del Matrigel incluido en parafina muestra una invasión celular importante dentro del Matrigel que contiene la adrenomedulina con respecto al que no contiene ningún factor. El tratamiento con la mezcla de anticuerpos anti-AMR induce una disminución del reclutamiento de las células circulantes en los implantes de Matrigel, y es de forma dependiente de la dosis ($n = 10$ por grupo). (I): Matrigel solo, (II): Matrigel + AM (500 ng), (III): Matrigel + VEGF (500 ng), (IV): Matrigel + AM (500 ng) + Ac anti-AM (500 µg), (V): tratamiento con las IgG de control (500 µg), (VI), (VII) y (VIII): tratamiento con los anticuerpos anti-AMR (25 µg, 100 µg y 500 µg). B. Cuantificación del número de células por unidad de superficie en los cortes del Matrigel. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ ($N = 10$).

45

50

Figura 7: Efecto de la adrenomedulina sobre el proceso de la angiogénesis *in vivo*. A. La dosis de dextrano-FITC inyectada en el ratón que tiene los implantes de Matrigel de modo subcutáneo muestra una cantidad importante de dextrano en el Matrigel que contiene la adrenomedulina con respecto al control. La cantidad de FITC-dextrano disminuye de una forma dependiente de la dosis en los ratones tratados con los anticuerpos anti-AMR con respecto a los ratones tratados con las IgG de control. *Prueba ANOVA*: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. B. La marcación con ayuda de los anticuerpos anti-CD31, anti-FvIII, anti-CD34 (células endoteliales y sus precursores), anti- α -SMA (pericitos), anti-CD45 y MOMA-2 (leucocitos, monocitos/macrófagos) muestra la presencia de estos diferentes tipos celulares en los implantes de Matrigel. La marcación con los anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3 muestra una coexpresión de los receptores de la adrenomedulina con las diferentes marcaciones utilizadas más arriba.

55

Figura 8: Adrenomedulina como diana terapéutica. El análisis mediante transferencia Western de los extractos

60

proteicos de las estirpes tumorales A549 (1), MDA231 (2), IGR37 (3) y BiZ (4) muestra las diferentes formas proteicas de los receptores de la adrenomedulina (A). Los complejos CRLR/RAMP2 y CRLR/RAMP3 (aproximadamente 75 kDa), CRLR (48 kDa), RAMP2 (35 kDa = forma glucosilada, 15 kDa = forma nativa) y RAMP3 (19 kDa = forma nativa). También se han detectado las formas homodiméricas RAMP2/RAMP2 y RAMP3/RAMP3 (aproximadamente 50 kDa). La prueba de proliferación *in vitro* muestra que el tratamiento con los anticuerpos anti-AMR (mezcla de los tres anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3) inhibe la proliferación celular hasta el 75% en la estirpe celular del riñón (BIZ) (B). En las otras estirpes, A549, IGR-37 y MDA-MB 231, la inhibición de la proliferación es del 5% al 30% (B). *Prueba ANOVA*: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. El tratamiento por vía intraperitoneal con los anticuerpos anti-AMR (330 µg/animal) en los ratones xenotrasplantados con las células HT29 (C) y A549 (D) muestra una inhibición importante del crecimiento tumoral con respecto a los ratones tratados con el suero preinmunitario (N = 10). *Prueba ANOVA*: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Figura 9: Los anticuerpos anti-AM o anti-AMR inhiben el crecimiento tumoral de los neuroglíocitos xenotrasplantados desarrollados en ortotopia. A. Las ratonas que han recibido mediante inyección las células U87 por vía intracerebral muestran un aumento importante del peso al cabo de 5 a 10 días de tratamiento por vía intraperitoneal con los anticuerpos anti-AM o anti-AMR (330 µg/animal). Estas ratonas muestran también una prolongación de la supervivencia de aproximadamente 12 veces más que las ratonas tratadas con el suero preinmunitario (N = 10). B. El peso de las ratonas expresado en porcentaje muestra la importancia de las variaciones de peso después de la inyección de las células tumorales U87 en ortotopia, así como durante el tratamiento. *Prueba ANOVA*: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

20 Ejemplos

I: Material y métodos

I.1. Obtención de los anticuerpos contra los receptores de la adrenomedulina

Inmunizaciones

Los anticuerpos policlonales anti-CRLR se han desarrollado al inyectar en los conejos las secuencias peptídicas SEQ ID n.º 1 o SEQ ID n.º 2. Los anticuerpos policlonales anti-RAMP2 se han desarrollado por inyección en los conejos de las secuencias peptídicas SEQ ID n.º 3 o SEQ ID n.º 4. Los anticuerpos policlonales anti-RAMP3 se han desarrollado por la inyección en los conejos de las secuencias peptídicas SEQ ID n.º 5 o SEQ ID n.º 6.

SEQ ID n.º 1: SPEDSIQLGVTRNKIMTAQYEAYQK,

SEQ ID n.º 2: PDYFQDFDPSEKVTKIADQDGNWFRHPASNR,

30 SEQ ID n.º 3: KNYETAVQFAWNHYKDQMDPIEK,

SEQ ID n.º 4: RPYSTLRDALEHFAELFDLGFNPLAER,

SEQ ID n.º 5: LERLPLAGKAFADMMGKVDVWK,

SEQ ID n.º 6: GFITGIHRQFFSNATVDRVHLE.

Los animales han sido inmunizados con los diferentes péptidos completados con el adyuvante de Freund. Después se dieron las dosis de refuerzo de la inmunización cada 3 semanas.

Los sueros no inmunitarios que sirven de control (preinmunitario) se tomaron en los mismos animales antes de empezar con las inyecciones.

Purificación de las inmunoglobulinas (IgG) y dosificación de la endotoxina

Los anticuerpos policlonales se han purificado mediante pases sobre gel de perlas de sefaroza conjugadas a la proteína A (GE Healthcare) y eluidas con ayuda de glicina a 100 mM, pH 3. La presencia de endotoxina en los anticuerpos se ha comprobado con la ayuda de la prueba LAL (lisado de amebocitos del límulo (*Limulus polyphemus*), Chambrex). Los resultados muestran un nivel tolerable de la endotoxina (<1,25 U) en las diferentes preparaciones de anticuerpos, así como en el suero preinmunitario. El cálculo de la concentración de inmunoglobulinas se ha efectuado mediante el método de Pierce (ensayos de proteínas con ácido bicinonínico (BCA); SMITH et al., *Anal Biochem*, 1985, 150: 76-85).

I.2. Cultivo celular

Las estirpes A498 y BIZ proceden, respectivamente, de DSMZ (Alemania) y del laboratorio del Dr. Gogusev (Hospital Necker, París). La estirpe BIZ procede de un cáncer de riñón; presenta una delección de la región 3p13 pter así como otras alteraciones genéticas, tales como der(1) dup(1)(q21 qter) x 2, der(1) t(1;15) x 2; der(13) t(1;13) x 2.

ES 2 556 270 T3

Las demás estirpes celulares proceden de la American Type Culture Collection (Rockville MD, EE. UU.). Las células que proceden de los tumores o biopsias se mantienen en un medio adecuado según el tipo celular (consulte la tabla 1 que viene a continuación) en atmósfera húmeda que contiene CO₂ al 5% y aire al 95% a 37 °C.

Tabla 1: Células utilizadas que proceden de tumores o biopsias

Nombre	Procedencia	Localización	Ensayo en ratones	Medio de cultivo
A498 (tumor)	N.º ATCC: HTB 44 DSMZ (Alemania) Hombre (52 años)	Riñón	+	MEM Glutamina a 2 mM Bicarbonato de sodio a 1,5 g/l Piruvato de sodio a 1 mM SBF al 10%
A549 (tumor)	N.º ATCC: CCL-185 Hombre (58 años)	Pulmón	+	DMEM Glutamina a 2 mM SBF al 10%
BIZ (metástasis)	Dr. Gogusev INSERM U507- Hospital Necker, París	Riñón	Sin comprobar	RPMI Glutamina a 2 mM Bicarbonato de sodio a 2,2 g/l SBF al 10%
Caki1 (metástasis)	N.º ATCC: HTB-46 Hombre (49 años)	Riñón	+	5a de McCoy's Glutamina a 2 mM Bicarbonato de sodio a 2,2 g/l SBF al 10%
Caki2 (tumor)	N.º ATCC: HTB-47 Hombre (69 años)	Riñón	+	5a de McCoy Glutamina a 2 mM Bicarbonato de sodio a 2,2 g/l SBF al 10%
IGR-37 (tumor)	N.º DSMZ: ACC 237 Hombre (59 años)	Piel	+	MEM Glutamina a 2 mM SBF al 10%
HT29 (tumor)	N.º ATCC: HTB-38 Mujer (44 años)	Colon	+	DMEM Glutamina a 2 mM SBF al 10%
MCF-7 (metástasis) Hormonosensible	N.º ATCC: HTB-22 Mujer (69 años)	Mama	+	DMEM/F-12 Glutamina a 2 mM

				16 ng/ml de insulina SBF al 10%
MDA-MB231 (metástasis) Hormonoindependiente	N.º ATCC: HTB-26 Mujer (51 años)	Mama	+	L-15 5 µg/ml de insulina Glutamina a 2 mM SBF al 10%
U87 (tumor)	N.º ATCC: HTB-14 Hombre (68 años)	Glioblastoma	+	MEM Glutamina a 2 mM Piruvato de sodio a 1 mM SBF al 10%

Los medios se renuevan cada dos días; cuando las células alcanzan el 90% de confluencia, se desprenden con una solución de tripsina (0,25%) en un tampón de Tris (Gibco) durante algunos minutos a 37 °C. La acción de la enzima se detiene al añadirle medio que contiene suero. Las células se siembran en tubos de 75 cm², o bien en placas multipocillo en sus medios adecuados.

I.3. Especificidad de la fijación de la adrenomedulina a sus propios receptores mediante experimentos de fijación

Los neurogliocitos tumorales U87 se siembran en placas de 24 pocillos (40.000 células/pocillo) y se mantienen en MEM en presencia del 10% de suero bovino fetal (SBF) durante 48 horas. Se lavan en PBS a 1x y se incuban previamente 30 min con MEM con SAB (seroalbúmina bovina) al 0,1% que contiene adrenomedulina radioyodada (Amersham, Biosciences GE) a razón de 100.000 cpm en presencia de una mezcla de anticuerpos compuesta por anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3. Los anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3 se han desarrollado en el conejo por inyección, respectivamente, de las secuencias peptídicas de SEQ ID n.º 2, 3 y 5. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, las células se colocan sobre hielo y se enjuagan dos veces con una solución de PBS a 1x-SAB al 0,1% mantenida a 4 °C. Las células se solubilizan con sosa a 0,2 N. La ¹²⁵I-AM fijada se cuenta en un contador y Riastar (Packard Instrument Company).

I.4. Estudios *in vivo*

Modelos animales

Se han utilizado ratonas hembra Balb/C atímicas (nu/nu) y ratonas C57BL/6 (Harlan, Francia) de 4-5 semanas de edad. Se han mantenido en condiciones estériles, temperatura estable y alimentación adaptada. Los experimentos *in vivo* comenzaron una vez acabado el periodo de adaptación de los animales a su nuevo ambiente (10-15 días después de la recepción).

Desarrollo de los xenotrasplantes y tratamientos de los animales

Las diferentes estirpes tumorales U87, A549, HT29 se han inyectado por vía subcutánea en el costado de las ratonas atímicas (nu/nu) a razón de $2,5 \times 10^6$ células por animal. Los animales se pesan con regularidad y el volumen tumoral se mide 3 veces a la semana y se calcula según la fórmula de la elipsoide $V = longitud \times anchura \times grosor \times 0,5236 \text{ mm}^3$.

Cuando los tumores alcanzan un volumen tumoral de 500 a 1000 mm³ (de 12 a 15 días después de la inyección de las células), los animales se tratan por vía intratumoral o intraperitoneal con los anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2, anti-RAMP3 o una mezcla compuesta de los anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3 cuya concentración final es de 330 µg/animal, y esto a razón de 3 inyecciones/semana. Los anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3 se han desarrollado en el conejo por inyección de las secuencias peptídicas de SEQ ID n.ºs 2, 3 y 5, respectivamente. Los grupos de animales que sirven de control se tratan de la misma manera con un anticuerpo irrelevante o un suero preinmunitario.

Los animales se sacrifican en tiempos variables en el transcurso del tratamiento (j2, j7, j11, j16 y j21), los tumores se extraen inmediatamente y se fijan en formol. A continuación se incluyen en parafina para los estudios inmunohistoquímicos.

Un grupo de animales tratados durante 21 días recibe una inyección de lectina biotinilada (lectina de *Lycopersicon*

esculentum (tomate) biotinilada, CliniSciences) con anestesia. Los animales se perfunden con una solución de paraformaldehído al 4% que permite la fijación de los tejidos *in vivo*. Los tumores y varios órganos (cerebro, pulmón, corazón y riñón) se extraen y congelan en nitrógeno líquido para los estudios de histología e inmunohistoquímica.

Angiogénesis *in vivo*

- 5 A tres grupos de ratonas C57BL/6 se les implanta en localización subcutánea una solución de Matrigel desprovista de los factores de crecimiento (BD Biosciences).
- Grupo (1) Solo Matrigel.
 - Grupo (2) Matrigel que contiene 500 ng de VEGF₁₆₅ (R&D Systems, Francia).
 - Grupo (3) Matrigel que contiene 500 ng de adrenomedulina (Bachem).
- 10 Al cabo de 48 horas, los animales del grupo (3) se separan en 3 subgrupos que se tratan 3 veces a la semana por vía intraperitoneal con una mezcla de los anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3. Se distinguen el subgrupo (1): los animales tratados (25 µg/animal), el subgrupo (2): los animales tratados (100 µg/animal) y el subgrupo (3): animales tratados (500 µg/animal).

En paralelo, un 4.º subgrupo de animales se trata con el suero preinmunitario (IgG) con la dosis de 500 µg/animal.

- 15 Al cabo de 21 días de tratamiento, los animales se distribuyen al azar y se separan en 2 subgrupos. En el primer subgrupo, los animales se sacrifican y los implantes de Matrigel se recuperan y fijan en formol, a continuación se incluyen en parafina para los análisis histológicos. A los animales del segundo subgrupo se les inyecta en anestesia dextrano-FITC (Sigma, Francia) y se sacrifican al cabo de 30 minutos. Los implantes de Matrigel se tratan a continuación con Dispase (Roche), se centrifugan a 5.000 rpm a 4 °C. Los sobrenadantes se recuperan y se lee la fluorescencia a 492 nm (excitación) y 512 nm (emisión).
- 20

I.5. Análisis por transferencia Western

Preparación de los extractos proteicos

- Los sedimentos celulares que proceden de los neuroglíocitos tumorales U87, los homogeneizados obtenidos a partir de los tumores neurogliales xenotrasplantados en los ratones *nudes* (atímicos) o los tumores de pacientes que padecen glioblastomas se recogen en un tampón de lisis (HEPES a 20 mM, pH 7,9, NaCl a 10 mM, MgCl₂ a 1 mM, glicerol al 10%, EDTA a 0,2 mM, DTT a 0,5 mM, inhibidores de proteasas al 1% y Triton X-100 al 0,35%), y se homogeneizan a 4 °C. Después de centrifugar a 12.000 xg durante 10 minutos, se recupera el sobrenadante que contiene las proteínas, y las proteínas se cuantifican mediante el método de Pierce.
- 25

Transferencia Western

- 30 Los lisados celulares (50 µg) se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes y reductoras. La migración se realiza en un tampón de Tris-base a 0,25 M, glicina a 1,92 M, SDS al 1%. Las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF a 1 mA/cm² durante 1h y 30 min. Las membranas se saturan 1 h a temperatura ambiente en PBS con leche desnatada al 5%. Después de 2 lavados (PBS con Tween 20 al 0,2%), las membranas se incuban en agitación durante una noche a 4 °C en presencia de los anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 o anti-RAMP3 diluidos a 1/400 en PBS con leche desnatada al 1%. Después de 3 lavados (PBS con Tween 20 al 0,2%), las membranas se incuban durante 1h y 30 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (kit de ECL, GE Healthcare, Amersham). La señal se revela con el kit de quimioluminiscencia (kit de ECL, GE Healthcare, Amersham).
- 35

I.6. Estudios inmunohistoquímicos

- 40 Los diferentes análisis histológicos se han realizado sobre cortes de 6 µm de tumores congelados (criótomo) o después de la inclusión en parafina (micrótomo). Los cortes son de 30 a 50 µm para los tumores de las ratonas a las que se les inyectó la lectina biotinilada.

- Los cortes se desparafinan en un baño de xileno seguido de 3 baños de etanol (100%, 95% y 75%). Después del lavado en PBS, los sitios inespecíficos se saturan con el suero del kit Vectastain (Abcys). A continuación, los cortes se incuban durante una noche con el anticuerpo primario. Los diferentes anticuerpos utilizados son: el antifactor VIII (Dako, 1:300), anti-CD31 (Dako, 1:40), anti-CD34 (Zymed Laboratories), anti-αSMA (Dako, 1:100), anti-NG2 (Chemicon, 1:150) y antidesmina (Abcam 1:50). Los leucocitos y los monocitos/macrófagos se han detectado con la ayuda de los anticuerpos anti-CD45 (BD Pharmingen, 1:40) y el anticuerpo MOMA-2 (Chemicon, 1:25).
- 45

- Para la marcación de las células en apoptosis, se ha utilizado el anticuerpo monoclonal F7-26 (AbCys), y para la proliferación celular, el anticuerpo anti-Ki67 (Dako, 1:80).
- 50

Después de 3 lavados con el tampón de fosfato a 0,1 M, pH 7,4, se incuban los cortes a la temperatura ambiente

durante 1 h 30 min con dapi (Invitrogen, 1/30.000) y los anticuerpos secundarios conjugados a los fluorocromos (Invitrogen, 1/250). La lectina biotinilada se revela con el anticuerpo secundario estreptavidina-Alexa flúor (Invitrogen, 1/250). Después de 3 lavados, se cubren los cortes con cubreobjetos. Las adquisiciones de las fotografías se efectúan con ayuda de un microscopio Zeiss y el programa informático de Leika.

5 I.7. Análisis estadísticos

Todos los experimentos se han repetido 3 o 4 veces. El análisis estadístico se ha realizado mediante la prueba Anova/prueba S. Los resultados se consideran significativos a partir de $p < 0,05$.

II: Resultados

10 II.1. Los anticuerpos anti-AMR (mezcla de anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3) inhiben la proliferación *in vitro* de los neurogliocitos

Durante la caracterización de los anticuerpos contra los receptores de la adrenomedulina, se ha demostrado que estos anticuerpos son capaces de inhibir de una forma dependiente de la dosis la fijación de la adrenomedulina radioactiva «¹²⁵I-AM» en las preparaciones membranas que proceden de células tumorales (figura 1A).

15 Estos experimentos *in vitro* permiten también poner de manifiesto la presencia de un bucle autocrino y/o paracrino que hace intervenir a la adrenomedulina y a sus receptores CRLR, RAMP2 y RAMP3 en la proliferación de las células tumorales (figura 1B). Estos datos demuestran también que la mezcla de anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3 reconocen el receptor de la adrenomedulina y bloquean, por consiguiente, la proliferación de estas células debido a la acción de la adrenomedulina secretada por estas mismas células.

20 II.2. Los anticuerpos anti-AMR (mezcla de anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3) inhiben el crecimiento tumoral *in vivo* de los neurogliocitos

Los tumores desarrollados en las ratonas atímicas después de la inyección subcutánea de las estirpes celulares (U87) representan un modelo experimental que tiene en cuenta todos los componentes del microentorno tumoral.

Administración intratumoral de los anticuerpos

25 La administración intratumoral de la mezcla de anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3 induce una inhibición del crecimiento tumoral de los xenotrasplantes del 60-70% tras 21 días de tratamiento (figura 2A). Al cabo de 16 días de tratamiento, se ha observado que los tumores de los animales tratados con los anticuerpos anti-AMR aparecen pálidos, translúcidos y menos vascularizados (figura 2B). Por el contrario, los animales de control presentan tumores grandes muy vascularizados. Estos efectos importantes observados *in vivo* hacen pensar que, además de una acción sobre la proliferación de las células tumorales, el tratamiento con los anticuerpos anti-AMR altera un mecanismo fundamental indispensable para el crecimiento tumoral.

Administración de los anticuerpos por vía intraperitoneal

Para evaluar el efecto terapéutico de los anticuerpos anti-AMR sobre el crecimiento tumoral *in vivo*, los anticuerpos anti-AMR se han administrado por vía intraperitoneal.

35 Cuatro grupos de 8 ratonas cada uno se han tratado 3 veces por semana con las IgG de control (330 µg), anti-AMR (100, 200, 330 µg) (figura 3A).

Estos resultados muestran que el crecimiento tumoral de los neurogliocitos se inhibe de forma dependiente de la dosis después del tratamiento con los anticuerpos anti-AMR. Para los estudios que vienen a continuación, se ha adoptado la concentración de 330 µg con el mismo protocolo de inyección.

40 El tratamiento por vía intraperitoneal muestra una inhibición muy importante del crecimiento de los neurogliocitos tumorales y una supervivencia mucho más importante de las ratonas tratadas con los anticuerpos anti-AMR con respecto a las ratonas tratadas con las IgG de control (figura 3B).

45 El tratamiento por vía intraperitoneal muestra también una inhibición muy importante del crecimiento de los neurogliocitos tumorales y una supervivencia mucho más importante de las ratonas tratadas con la mezcla de los tres anticuerpos, anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3, respecto a las ratonas tratadas con un único anticuerpo anti-CRLR, anti-RAMP2 o anti-RAMP3 (figura 3C).

II.3. Los anticuerpos anti-AMR (mezcla de anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3) desestabilizan la vascularización tumoral *in vivo*

50 Para comprender mejor los mecanismos implicados en la regresión tumoral después del tratamiento con los anticuerpos anti-AMR (anti-CRLR/anti-RAMP2/anti-RAMP3), se han realizado análisis histológicos sobre los cortes de los tumores. La utilización de marcadores endoteliales tales como CD31 o el factor de von Willebrand (vWF), atestigua una desorganización profunda, incluso una desestabilización, de la arquitectura vascular, que se traduce

en una disminución del tamaño de los vasos.

La inyección de la lectina biotilada (marcador que tiene gran afinidad por las células endoteliales) en la ratona 15 minutos antes del sacrificio muestra una vascularización estable y funcional en los animales tratados con las IgG de control, mientras que se ha observado una desorganización vascular en los animales tratados con los anticuerpos anti-AMR. Ha resultado muy interesante que el estudio inmunohistoquímico con los marcadores de los pericitos (NG2, desmina o α -SMA) muestre una disminución muy significativa, incluso una desaparición, de los pericitos en los vasos de los tumores tratados con respecto a los tumores de control (figura 4A). La cuantificación de la vascularización y de la densidad celular (células endoteliales frente a pericitos) entre los 2 grupos de animales muestra una disminución significativa en los tumores tratados (figura 4B). Los experimentos sugieren también que la adrenomedulina regula el recubrimiento de los vasos con pericitos y que los anticuerpos anti-AMR son capaces de bloquear la incorporación de los pericitos en los vasos. Esto revela que los anticuerpos anti-AMR inducen una regresión de la vascularización tumoral probablemente por desestabilización de los vasos después de la pérdida de las células de sostén, los pericitos.

El análisis inmunohistoquímico de la vascularización de los diferentes órganos (riñón, corazón, pulmón, etc...) con la ayuda de una marcación simultánea de las células endoteliales/pericitos en los diferentes grupos de ratonas tratadas con los anticuerpos anti-AMR y las ratonas tratadas con las IgG de control muestra que el tratamiento no tiene ningún efecto sobre la arquitectura vascular no tumoral (figura 4C). Estos resultados revelan que los anticuerpos anti-AMR actúan solamente sobre el tumor, sin tener, por lo tanto, efectos sobre la vascularización de los diferentes órganos de la ratona.

Los pericitos contribuyen al proceso angiogénico al alterar la síntesis o la degradación de la matriz extracelular, a la estabilidad de la pared vascular al participar en el ensamblaje de la membrana basal, y aparecen también como un factor de la regulación paracrina que suprime la proliferación y la migración de las células endoteliales (SATO y RIFKIN, *J. Cell Biol.* 1989, 109: 309-15; BENJAMIN et al., *Development*, 1998, 125: 1591-8). La arquitectura del árbol vascular está controlada y estabilizada por el torrente circulatorio, pero también por las interacciones que se establecen entre las células endoteliales, los pericitos, las células musculares lisas y la matriz extracelular (ALLT y LAWRENSON, *Cells Tissues Organs*, 2001, 169: 1-11). La utilización de los anticuerpos monoclonales F7-26, que ponen de manifiesto la presencia de apoptosis, muestra que las células endoteliales desprendidas del endotelio, debido a la ausencia de los pericitos, causada por el tratamiento con los anticuerpos anti-AMR, entran en apoptosis (figura 5A). Esta misma marcación se ha observado en las pocas células pericitarias presentes en los tumores tratados (figura 5B). En cambio, la marcación de la proliferación celular general el 16.º día de tratamiento solo muestra una disminución del 25 al 35% en los tumores tratados con respecto a los tumores de control (figura 5C). Estos resultados ponen de manifiesto la posible importancia de la adrenomedulina en el reclutamiento de los pericitos, lo que implica, por lo tanto, que este tipo celular es un componente funcional importante de la vascularización tumoral.

II.4. Efecto del tratamiento con los anticuerpos anti-AMR (mezcla de anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3) por vía intraperitoneal.

El análisis de la angiogénesis *in vivo* con ayuda del Matrigel desprovisto de los factores de crecimiento y complementado solamente con la adrenomedulina, inyectado a las ratonas C57BL/6 en localización subcutánea, es un buen modelo para estudiar el efecto de la presencia de este factor sobre la movilización de los diferentes tipos celulares. La marcación con hematoxilina/eosina de los cortes histológicos muestra una invasión celular dentro del Matrigel que contiene la adrenomedulina en comparación con el Matrigel sin ningún factor. Además, la densidad celular es más importante si se compara con el Matrigel que contiene el VEGF (figura 6A). Para evaluar la importancia de los anticuerpos anti-AMR (anti-CRLR/anti-RAMP2/anti-RAMP3) en el reclutamiento de las células circulantes, se ha analizado el efecto del tratamiento con estos anticuerpos por vía intraperitoneal. Los resultados muestran que el tratamiento con los anticuerpos anti-AMR induce una disminución de la incorporación de las células circulantes en los implantes de Matrigel de una forma dependiente de la dosis (figuras 6A y 6B). La especificidad de los anticuerpos anti-AMR está probada en comparación con el tratamiento con la ayuda de las IgG preinmunitarias.

II.5. El efecto de la adrenomedulina sobre el proceso de la angiogénesis *in vivo*

La inyección de dextrano-FITC en las ratonas C57BL/6 que han recibido en localización subcutánea el Matrigel que contiene o no la adrenomedulina, 30 minutos antes del sacrificio del animal, permite estudiar el efecto de la adrenomedulina sobre la angiogénesis *in vivo*. La dosis de FITC fluorescente muestra una cantidad importante de dextrano en el Matrigel que contiene la adrenomedulina respecto al control que atestigua que se ha puesto en marcha una angiogénesis funcional bajo el efecto de la adrenomedulina (figura 7A). La cantidad de FITC-dextrano disminuye de una forma dependiente de la dosis en las ratonas tratadas con los anticuerpos anti-AMR con respecto a las ratonas tratadas con las IgG de control.

La formación de los vasos sanguíneos es un proceso en el que intervienen varios tipos celulares: las células endoteliales, que tapizan la pared de los vasos; los pericitos, que estabilizan estas paredes; y las células circulantes (células inflamatorias, precursores de las células endoteliales, y células mesenquimatosas). La marcación con la ayuda de diferentes marcadores de células endoteliales y sus precursores (anti-CD31, anti-FvIII, anti-CD34), los

pericitos (anti- α SMA, antidesmina, anti-NG2) y las células inflamatorias (anti-CD45 y MOMA-2) ha permitido identificar los diferentes tipos celulares atraídos por la presencia de la adrenomedulina (figura 7B). La marcación con los anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3 ha permitido diferenciar las poblaciones celulares que expresan los receptores de la adrenomedulina y, por consiguiente, que se reclutan por el efecto paracrino de la adrenomedulina en el Matrigel. En cambio, los resultados revelan también la presencia de células que no expresan estos receptores y que son probablemente reclutadas en el Matrigel por el efecto de otros factores que podrían liberar las diferentes células después de entrar en contacto con la adrenomedulina.

Estos resultados muestran que la adrenomedulina está implicada, por un efecto autocrino/paracrino, en las diferentes etapas de la neoangiogénesis intratumoral, tales como la migración, la invasión y la diferenciación celular a través de sus receptores. De igual modo, el bloqueo de los receptores de la adrenomedulina (AMR) parece ser suficiente para inhibir el crecimiento tumoral.

II.6. Efecto del tratamiento con los anticuerpos anti-AMR (mezcla de anticuerpos anti-CRLR, anti-RAMP2 y anti-RAMP3) en diferentes modelos tumorales

Los diferentes resultados obtenidos definen que la adrenomedulina es un factor que interviene en la angiogénesis tumoral.

Con el objetivo de establecer un tratamiento antineoplásico, se ha verificado el efecto del tratamiento con los anticuerpos anti-AMR (anti-CRLR/anti-RAMP2/anti-RAMP3) sobre otros modelos tumorales, tales como el cáncer de pulmón, de colon, de riñón, de mama y de piel.

El análisis mediante la técnica de transferencia Western realizado en los extractos proteicos de diferentes estirpes tumorales, A549 para el cáncer de pulmón, HT29 para el cáncer de colon, A498, Caki1, Caki2 y BIZ para el cáncer de riñón, MDA-MB-231 para el cáncer de mama, e IGR para el cáncer de piel, muestra la presencia de las diferentes proteínas que constituyen los receptores de la adrenomedulina, CRLR, RAMP2 y RAMP3 (figura 8A).

El estudio *in vitro* del efecto de los anticuerpos anti-AMR (anti-CRLR/anti-RAMP2/anti-RAMP3) sobre la proliferación de estas diferentes estirpes muestra que la inhibición de la proliferación alcanza el 70% a 70 μ g/ml después de 6 días de tratamiento en la estirpe del riñón, BIZ (figura 8B). En cuanto a las otras estirpes, A549, IGR-37 y MDA-MB-231, la inhibición de la proliferación celular es de aproximadamente el 30% con la misma concentración de anticuerpos (figura 8B). Además, estos resultados muestran que la proliferación *in vitro* de la estirpe BIZ necesita la presencia de la adrenomedulina en comparación con las otras estirpes estudiadas.

La investigación se ha llevado a cabo *in vivo* en ratonas atómicas (Balb-c nu/nu). Por esto, se han desarrollado xenotrasplantes heterotópicos en localización subcutánea.

El tratamiento por vía intraperitoneal con los anticuerpos anti-AMR en las ratonas xenotrasplantadas con las estirpes HT29 (figura 8C) y A549 (figura 8D) muestra una inhibición importante del crecimiento tumoral con respecto a las ratonas tratadas con el suero preinmunitario. Estas primeras observaciones sugieren una buena tolerancia general del tratamiento con los anticuerpos anti-AMR (curva de peso y estado general de las ratonas tratadas). Los tumores de las ratonas tratadas son 3 veces menos voluminosos que los tumores de control y aparecen también menos vascularizados. Estos resultados ponen de manifiesto la enorme importancia que debe tener la adrenomedulina en el desarrollo de los tumores malignos. Los estudios preliminares de inmunohistoquímica sobre los cortes de los xenotrasplantes de colon, mediante marcación con el factor VIII y el CD31 para la célula endotelial, y el α -SMA y la desmina para el pericito, muestran un efecto muy importante de los anticuerpos anti-AMR sobre la angiogénesis tumoral.

II.7. Efecto de los anticuerpos anti-AMR (anti-CRLR/anti-RAMP2/anti-RAMP3) sobre el crecimiento de los neuroglíocitos tumorales de los xenotrasplantes desarrollados en ortotopía.

A tres grupos de 10 ratonas cada uno se les ha inyectado por vía intracerebral un millón de células U87. Diez días más tarde, las ratonas debilitadas por la enfermedad experimentan una pérdida de peso (14 g \pm 2 g) respecto a las ratonas normales sin inyección de células (20 g \pm 2 g). Las ratonas se separan en varios grupos y han recibido 3 veces por semana 330 μ g por vía intraperitoneal de las IgG de control o del anticuerpo contra la adrenomedulina (anti-AM) o de los anticuerpos contra los receptores de la adrenomedulina (anti-AMR) (figura 9A).

En las ratonas que han recibido inyecciones de las IgG de control, la supervivencia era de 5 a 10 días tras el tratamiento con una caída espectacular de su peso (figura 9B).

En cambio, en los grupos de ratonas tratadas con los anticuerpos anti-AM o anti-AMR, se ha observado que del 60 al 70% de ellas aumenta de peso unos días después del tratamiento con una supervivencia que se prolongaba más allá de los 230 días (figura 9B).

Finalmente, en las ratonas tratadas no se ha observado ninguna metástasis en los órganos después del sacrificio del animal.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSITE AIX MARSEILLE 2 / UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE
 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE
 (INSERM)

5 ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE MARSEILLE
 OUAFIK, L'Houcine
 MABROUK, Kamel
 KAAFARANY, Itidal
 MARTIN, Pierre-Marie

10 <120> Anticuerpos que se fijan a los receptores de la adrenomedulina y sus usos como medicamento

<130> F2159PCT1

15 <160> 6

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

20 <211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Péptido derivado del fragmento S6-K30 de la proteína hCRLR

<400> 1

Ser Pro Glu Asp Ser Ile Gln Leu Gly Val Thr Arg Asn Lys Ile Met
 1 5 10 15

Thr Ala Gln Tyr Glu Ala Tyr Gln Lys
 20 25

30 <210> 2

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> Péptido derivado del fragmento P68-R98 de la proteína hCRLR

<400> 2

Pro Asp Tyr Phe Gln Asp Phe Asp Pro Ser Glu Lys Val Thr Lys Ile
 1 5 10 15

Ala Asp Gln Asp Gly Asn Trp Phe Arg His Pro Ala Ser Asn Arg
 20 25 30

40

<210> 3

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

45

<220>

<223> Péptido derivado del fragmento K59-K81 de la proteína hRAMP2

<400> 3

Lys Asn Tyr Glu Thr Ala Val Gln Phe Ala Trp Asn His Tyr Lys Asp
 1 5 10 15

50

Gln Met Asp Pro Ile Glu Lys
 20

<210> 4

55 <211> 28

ES 2 556 270 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>

5 <223> Péptido derivado del fragmento R91-R118 de la proteína hRAMP2

<400> 4

Arg Pro Tyr Ser Thr Leu Arg Asp Ala Leu Glu His Phe Ala Glu Leu
1 5 10 15

Phe Asp Leu Gly Phe Pro Asn Pro Leu Ala Glu Arg
20 25

10 <210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Péptido derivado del fragmento L34-K55 de la proteína hRAMP3

<400> 5

Leu Glu Arg Leu Pro Leu Ala Gly Lys Ala Phe Ala Asp Met Met Gly
1 5 10 15

Lys Val Asp Val Trp Lys
20

20

<210> 6

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Péptido derivado del fragmento G91-E112 de la proteína hRAMP3

<400> 6

Gly Phe Ile Thr Gly Ile His Arg Gln Phe Phe Ser Asn Ala Thr Val
1 5 10 15

30

Asp Arg Val His Leu Glu
20

REIVINDICACIONES

1. Mezcla de al menos tres anticuerpos y/o fragmentos de dichos anticuerpos que se fijan a las proteínas CRLR, RAMP2 y RAMP3 que forman los receptores de la adrenomedulina, en donde cada anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo se fija a una proteína diferente, y en donde cada anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo es un antagonista de uno de dichos receptores de la adrenomedulina, para ser utilizado como medicamento.
2. Mezcla para ser utilizada según la reivindicación 1, caracterizada por que el medicamento está destinado al tratamiento preventivo o curativo de los tumores.
3. Mezcla para ser utilizada según la reivindicación 2, caracterizada por que dichos tumores son tumores sólidos.
4. Mezcla para ser utilizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que dichos anticuerpos se fijan a un dominio extracelular de cada una de dichas proteínas.
5. Mezcla para ser utilizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que dichos anticuerpos son anticuerpos policlonales o monoclonales.
6. Mezcla para ser utilizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que el anticuerpo que se fija a un dominio extracelular de CRLR se obtiene por inmunización de un animal no humano con un péptido elegido entre las secuencias SEQ ID n.º 1 y SEQ ID n.º 2.
7. Mezcla para ser utilizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada por que el anticuerpo que se fija al dominio extracelular de RAMP2 se obtiene por inmunización de un animal no humano con un péptido elegido entre las secuencias SEQ ID n.º 3 y SEQ ID n.º 4.
8. Mezcla para ser utilizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que el anticuerpo que se fija al dominio extracelular de RAMP3 se obtiene por inmunización de un animal no humano con un péptido elegido entre las secuencias SEQ ID n.º 5 y SEQ ID n.º 6.
9. Composición farmacéutica, caracterizada por comprender al menos tres anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo que se fijan a las proteínas CRLR, RAMP2 y RAMP3 que forman los receptores de la adrenomedulina, en donde cada anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo se fija a una proteína diferente, y en donde cada anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo es un antagonista de dichos receptores de la adrenomedulina, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, caracterizada por que dichos anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo son tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8.
11. Anticuerpo que se fija a un dominio extracelular de CRLR, caracterizado por que se puede obtener por inmunización de un animal no humano con el péptido de secuencia SEQ ID n.º 1.
12. Anticuerpo que se fija a un dominio extracelular de RAMP2, caracterizado por que se puede obtener por inmunización de un animal no humano con el péptido de secuencia SEQ ID n.º 4.
13. Anticuerpo que se fija al dominio extracelular de RAMP3, caracterizado por que se puede obtener por inmunización de un animal no humano con el péptido de secuencia SEQ ID n.º 6.
14. Procedimiento de obtención de un anticuerpo que se fija a un dominio extracelular de CRLR, caracterizado por comprender una etapa de inmunización de un animal no humano con el péptido de secuencia SEQ ID n.º 1.
15. Procedimiento de obtención de un anticuerpo que se fija al dominio extracelular de RAMP2, caracterizado por comprender una etapa de inmunización de un animal no humano con el péptido de secuencia SEQ ID n.º 4.
16. Procedimiento de obtención de un anticuerpo que se fija al dominio extracelular de RAMP3, caracterizado por comprender una etapa de inmunización de un animal no humano con el péptido de secuencia SEQ ID n.º 6.
17. Procedimiento de obtención de una mezcla de tres anticuerpos que se fijan a los péptidos de secuencia SEQ ID n.º 2, 3 y 5, tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 y 5, que comprende:
 - una etapa de inmunización de un animal no humano con el péptido de secuencia SEQ ID n.º 2.
 - una etapa de inmunización de un animal no humano con el péptido de secuencia SEQ ID n.º 3 y
 - una etapa de inmunización de un animal no humano con el péptido de secuencia SEQ ID n.º 5.

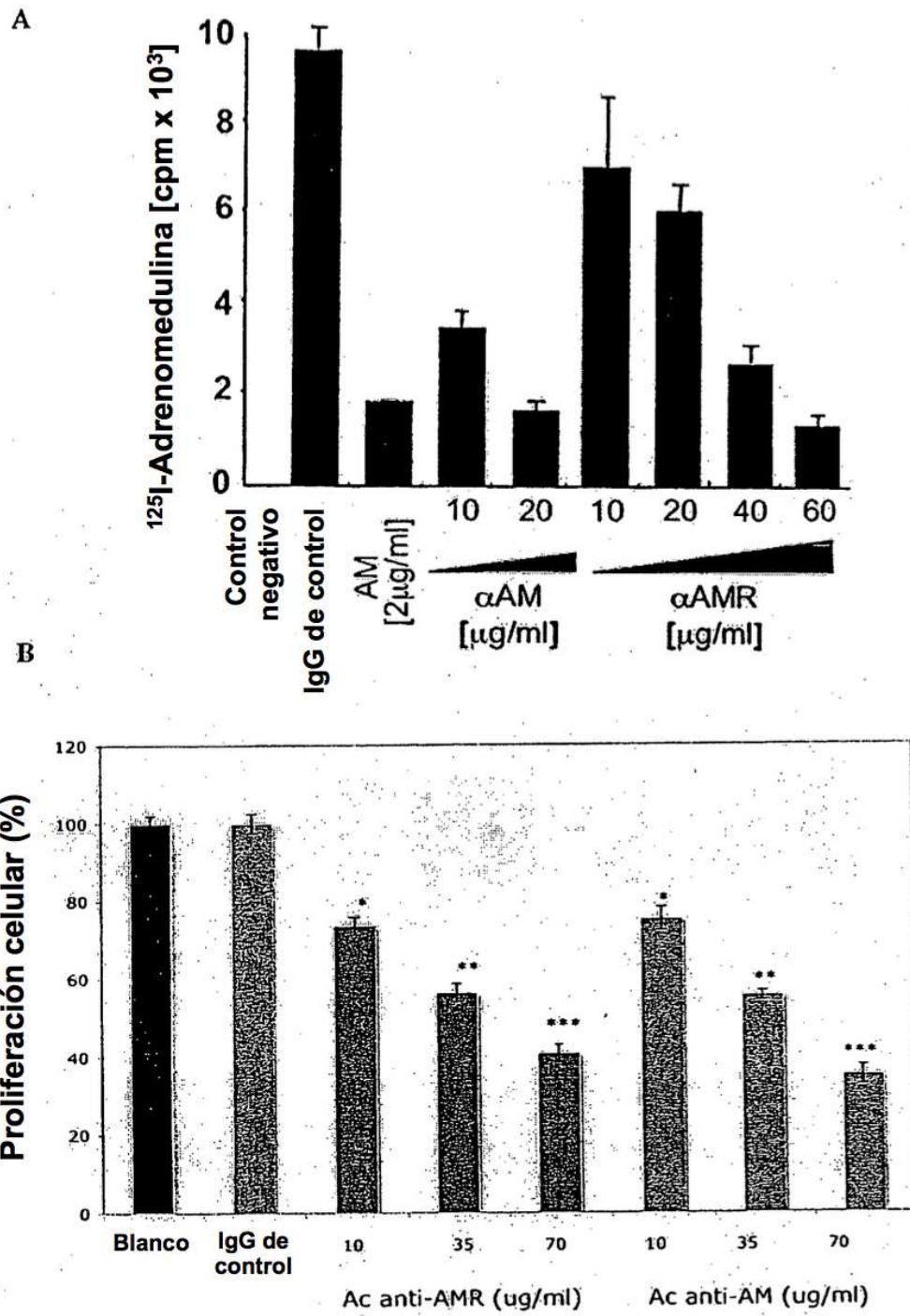


FIGURA 1

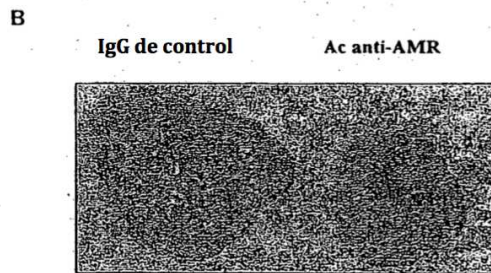
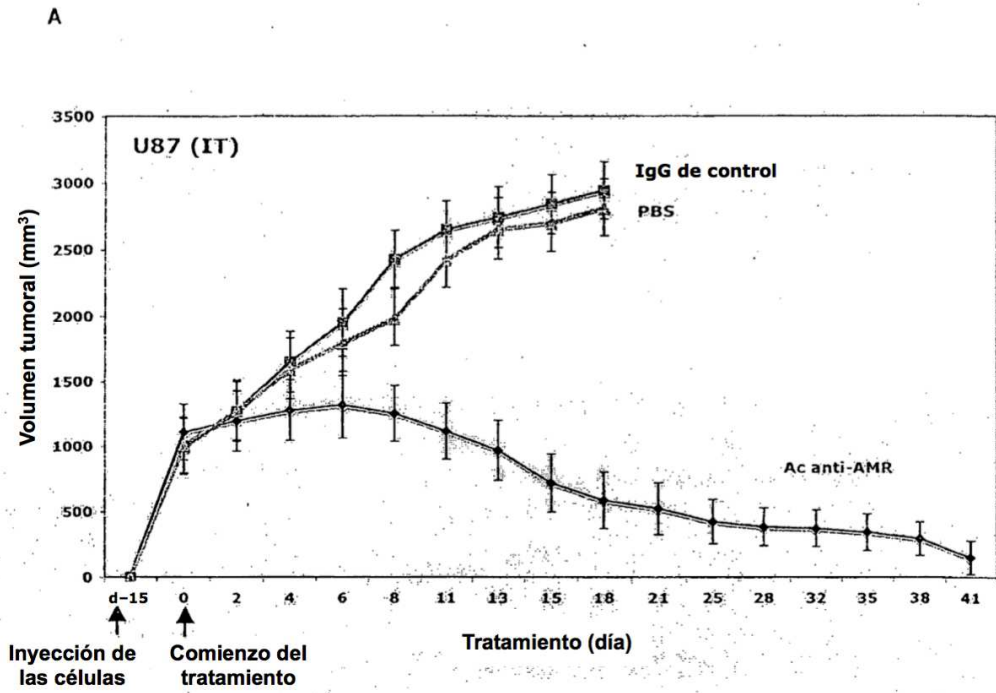


FIGURA 2

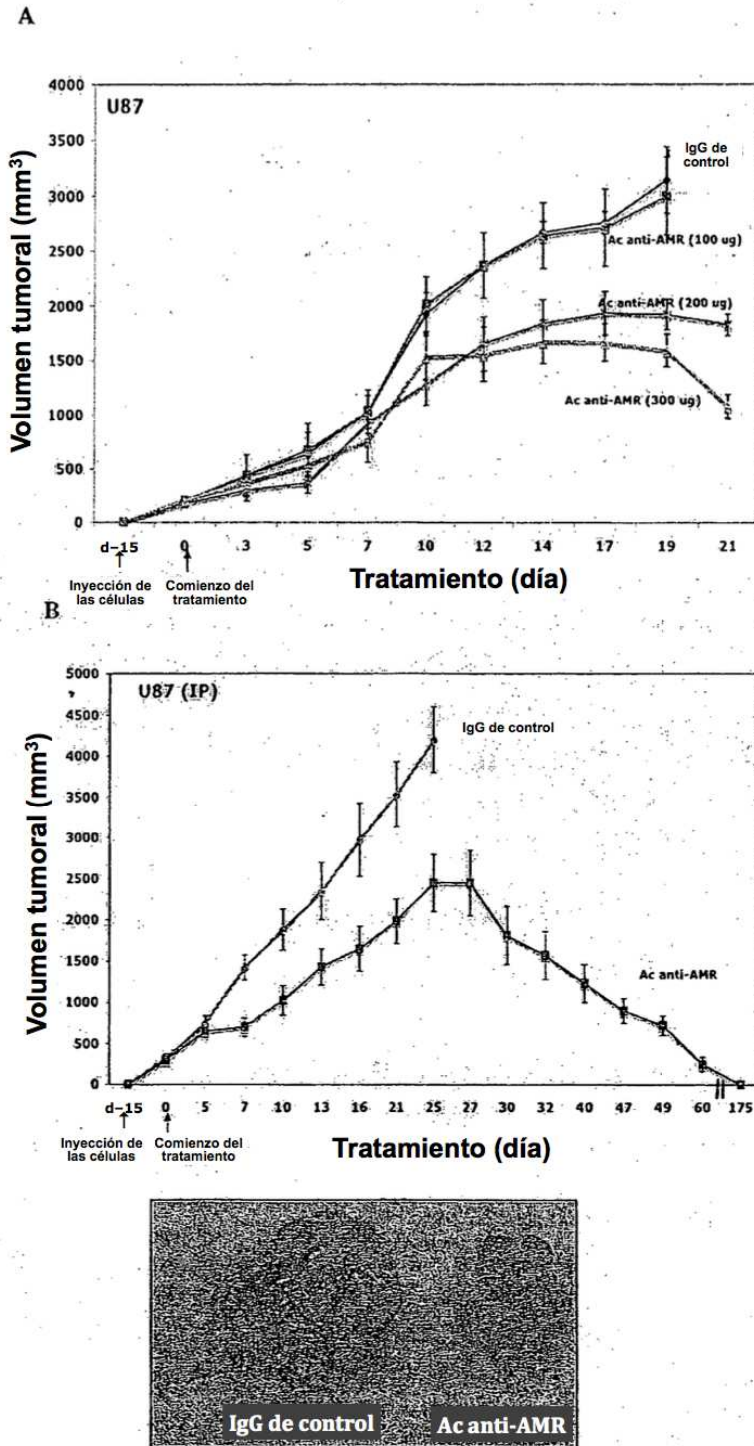


FIGURA 3

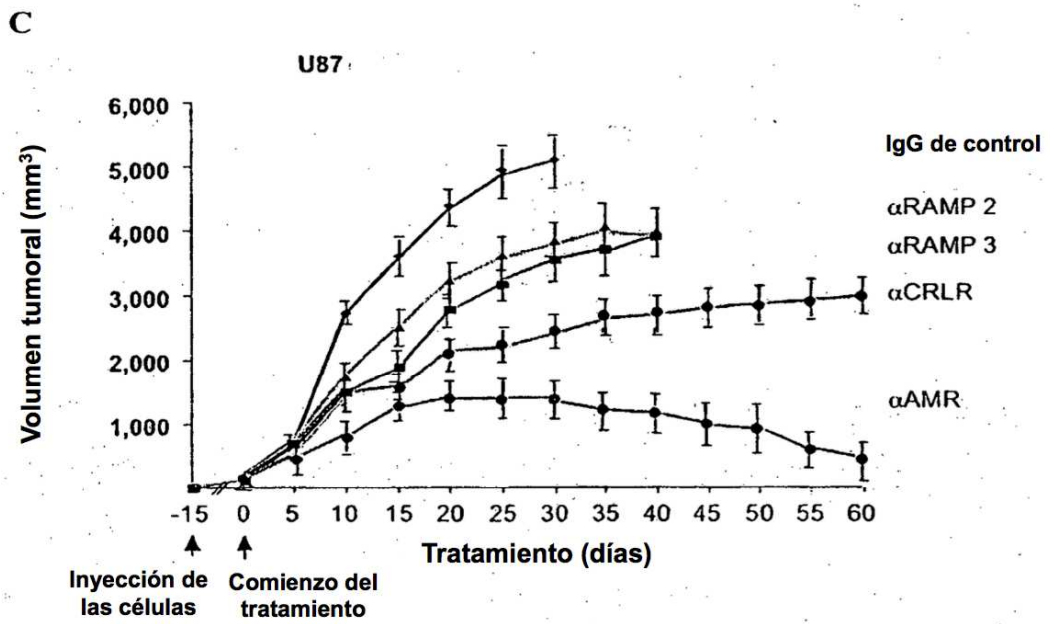


Figura 3 (cont)

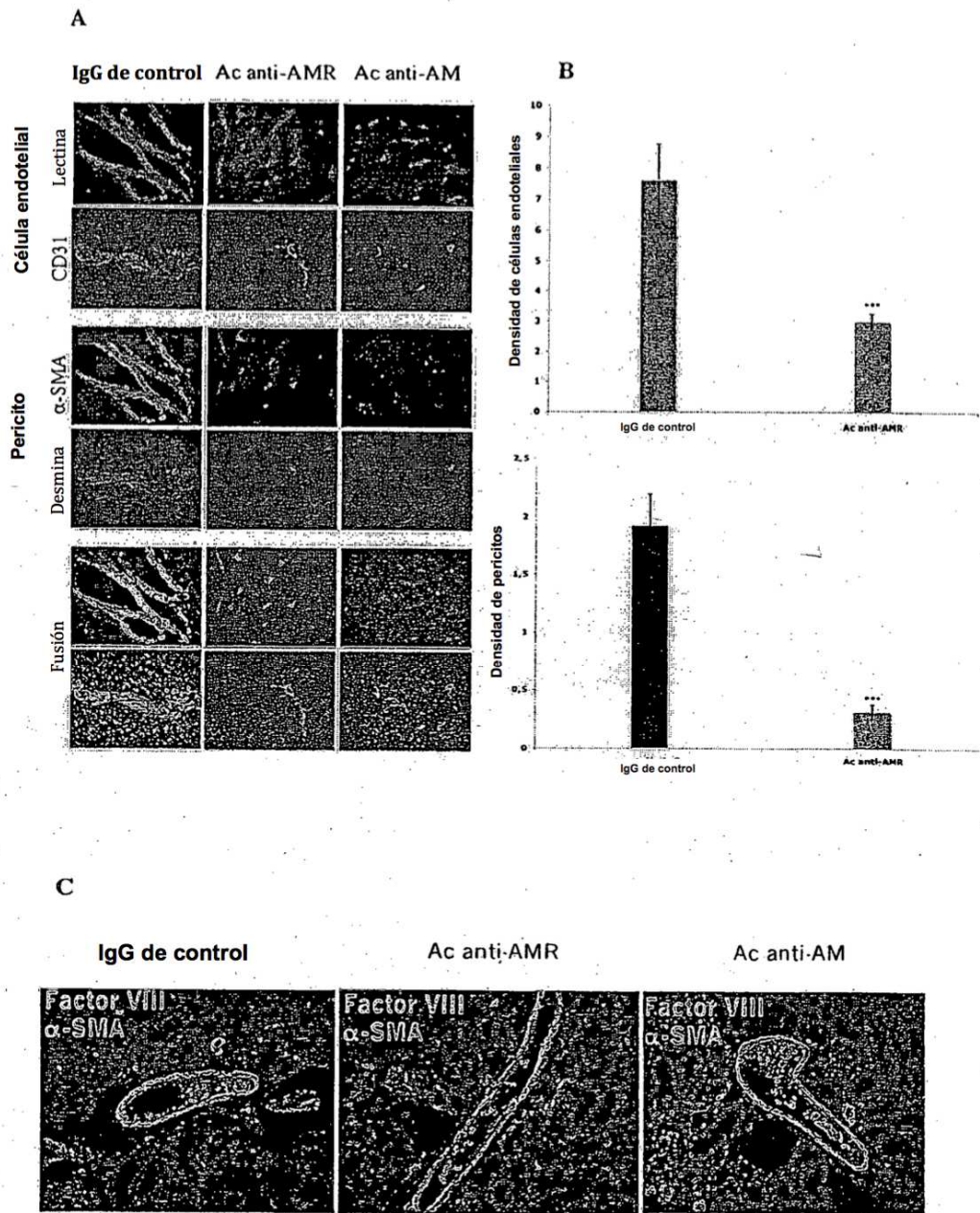


FIGURA 4

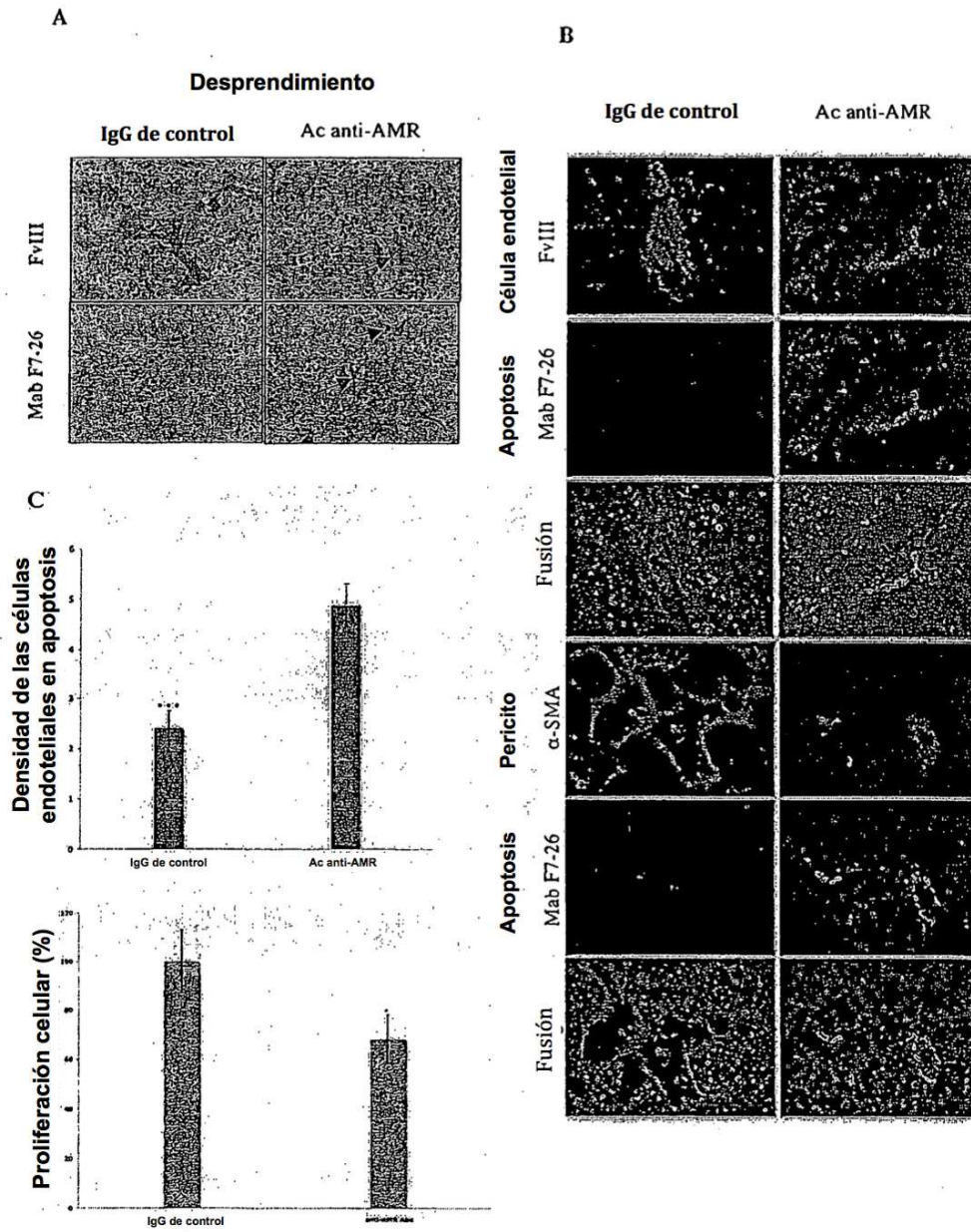
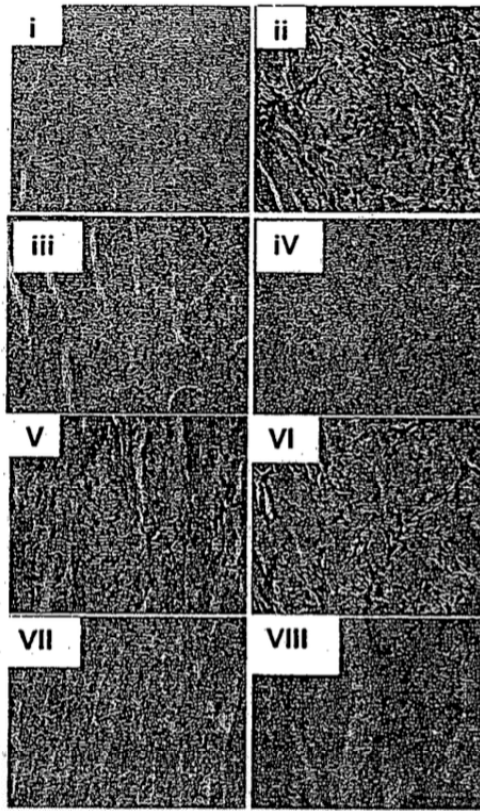


FIGURA 5

A



B

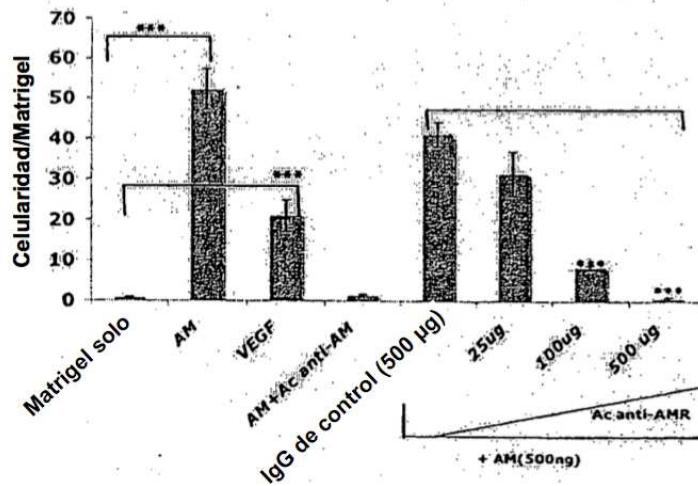


FIGURA 6

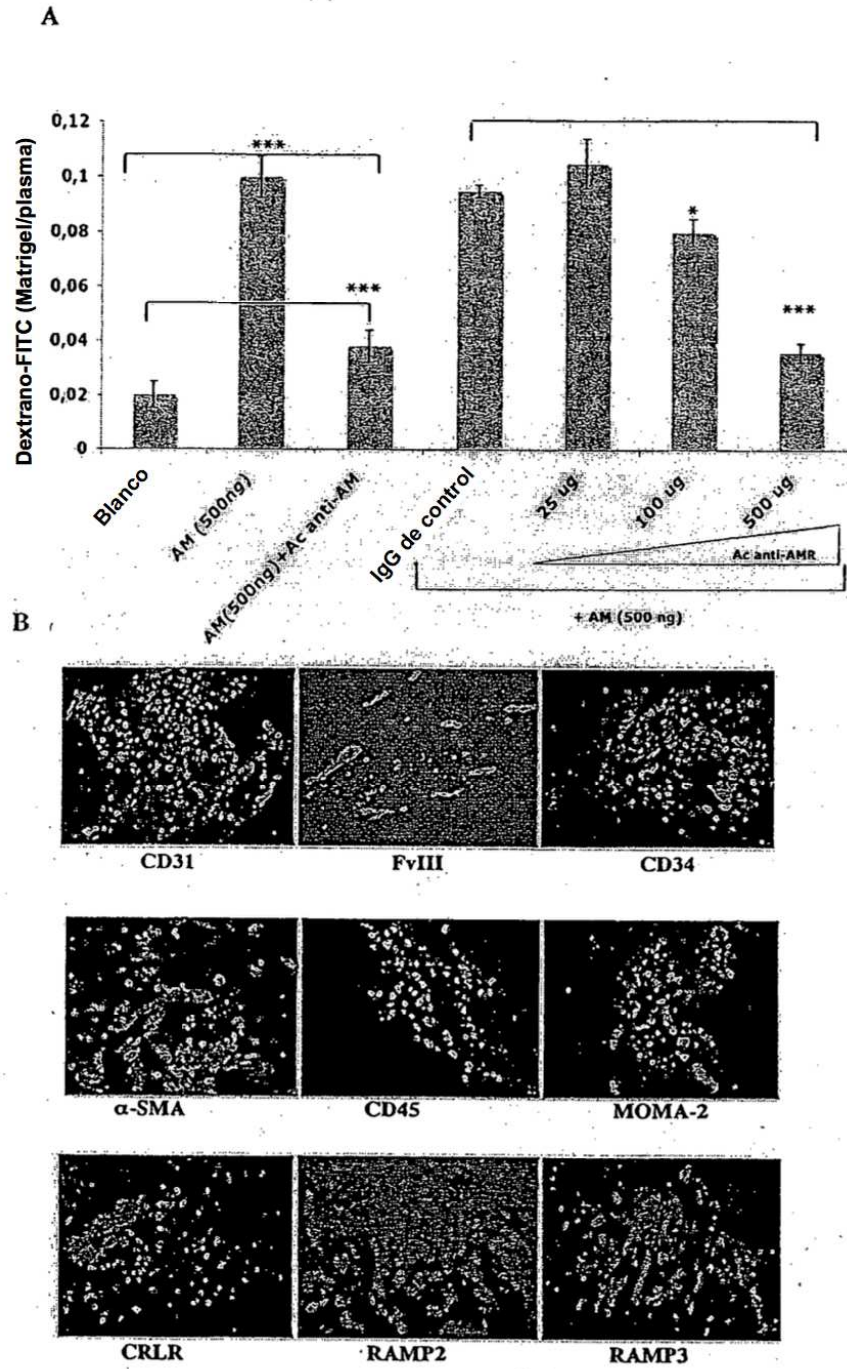


FIGURA 7

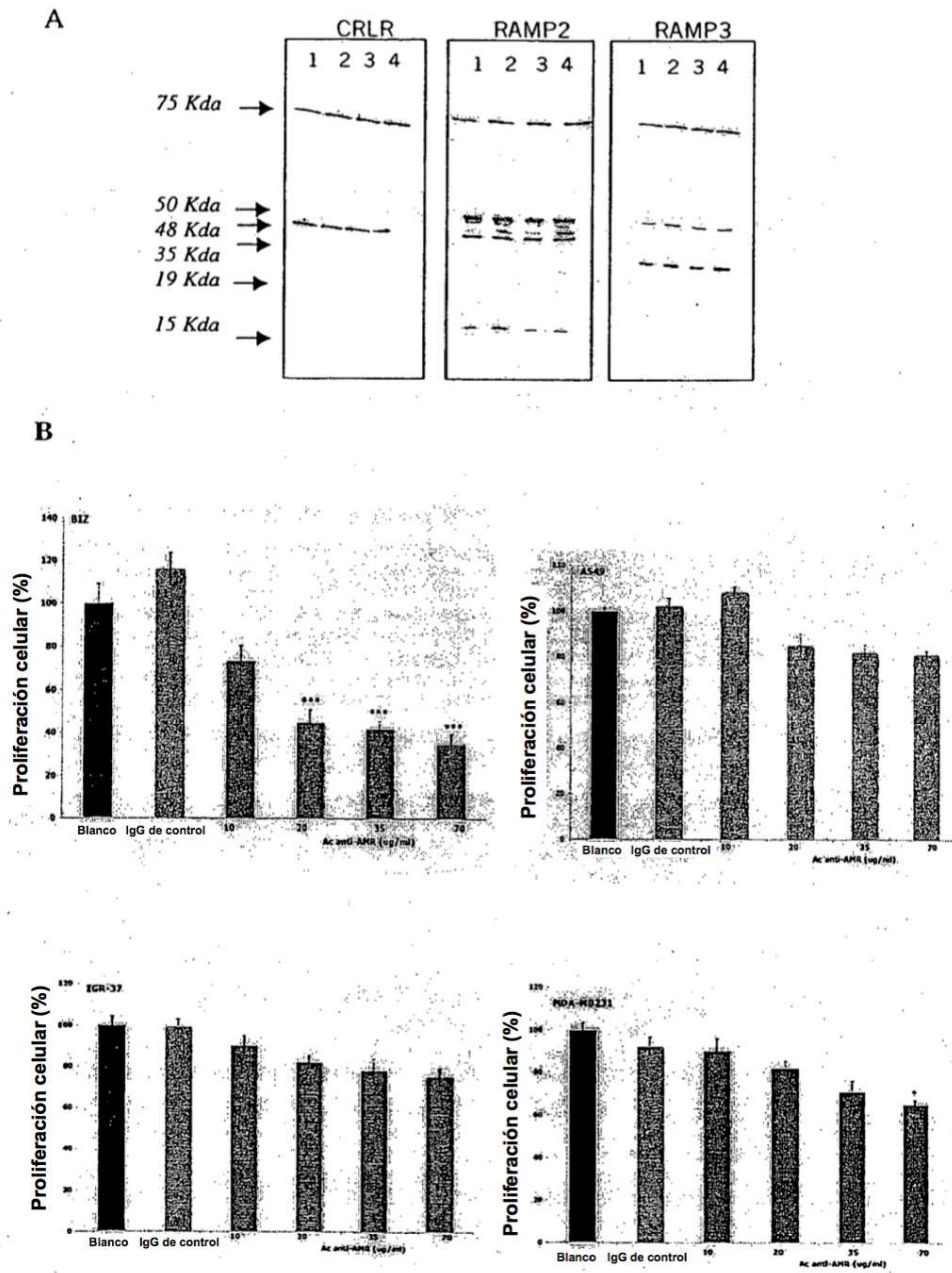
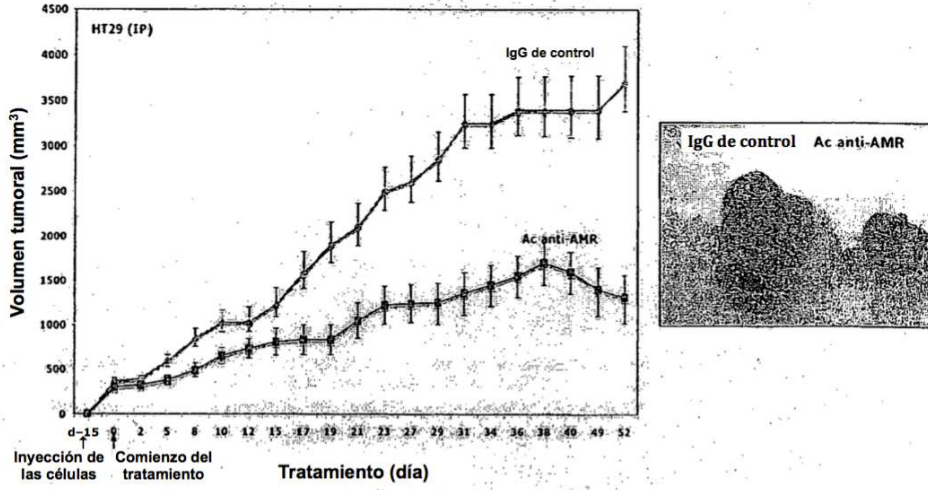


FIGURA 8

C



D

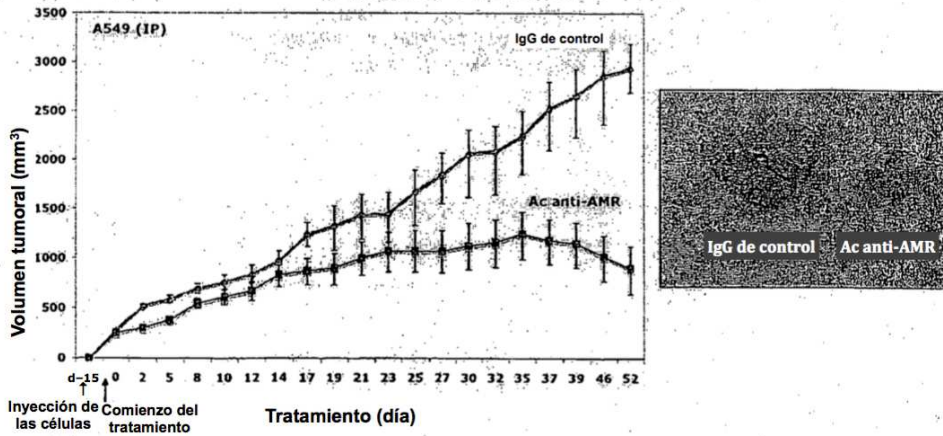


Figura 8 (cont)

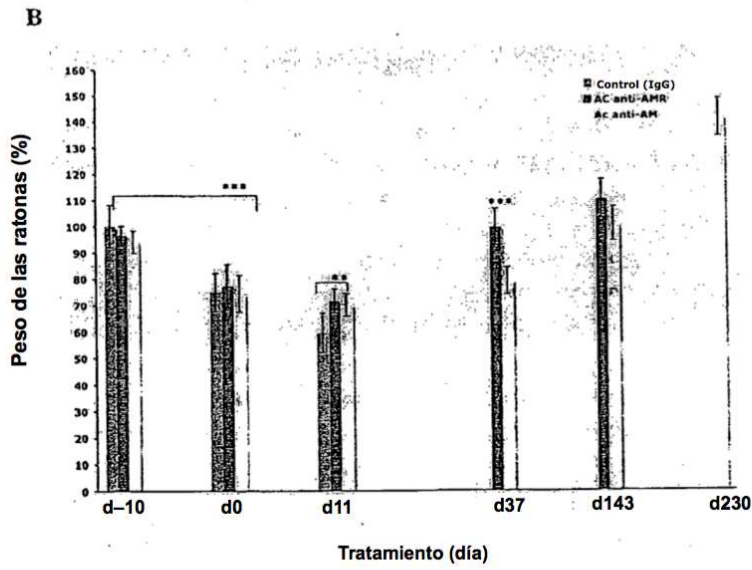
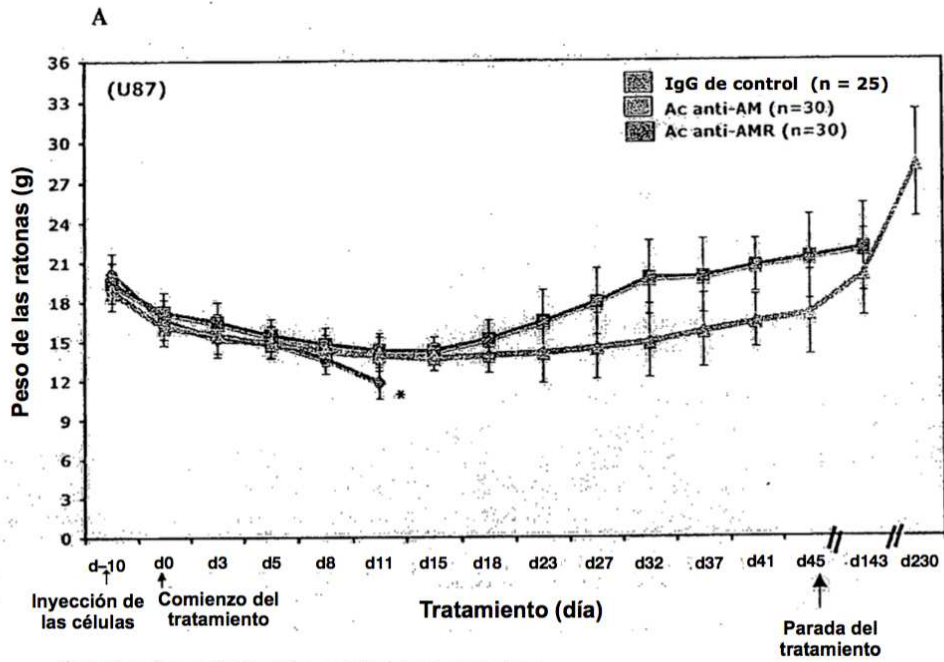


FIGURA 9