

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 057**

51 Int. Cl.:

C07K 14/72 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/64 (2007.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2003** E 10005016 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018** EP 2228390

54 Título: **Usos terapéuticos de anticuerpos monoclonales frente al receptor de la angiotensina II tipo 1**

30 Prioridad:

21.08.2002 GB 0219524

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

17.05.2019

73 Titular/es:

QUEEN MARY AND WESTFIELD COLLEGE

(100.0%)

Mile End Road

London E1 4NS, GB

72 Inventor/es:

VINSON, GAVIN PAUL;

PUDDEFOOT, JOHN RICHARD y

BARKER, STEWART

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 713 057 T3

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

DESCRIPCIÓN

Usos terapéuticos de anticuerpos monoclonales frente al receptor de la angiotensina II tipo 1

5 La presente invención se refiere a usos terapéuticos de anticuerpos monoclonales frente al receptor de la angiotensina II tipo I, en particular en el tratamiento de la proliferación de células del músculo liso vascular.

10 La angiotensina II desempeña un papel esencial en la homeostasis de electrolitos en los mamíferos y en el control de la tensión 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 angiotensina II, designados tipos 1 y 2 (AT1 y AT2), pero la mayoría de las acciones bien conocidas de la angiotensina II se producen 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 Se ha utilizado el anticuerpo monoclonal 6313/G2 para el subtipo de receptor AT1 (Barker *et al* *J. Mol. Endocrinol.* 11 241-245 (1993)) para estudiar la distribución del receptor (Vinson *et al* *Mol. Med. Today* 1 35-38 (1995)). El anticuerpo monoclonal se ha sugerido para su uso como agente terapéutico para controlar la vasoconstricción, por ejemplo, en el tratamiento de la hipertensión o las contracciones uterinas.

20 El anticuerpo se ha utilizado como un agente específico para la obtención de imágenes en diversos tejidos, por ejemplo en 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 demostrado que el anticuerpo bloquea la internalización del receptor AT1 inducida por angiotensina II y la activación de la PKC, pero que, por el contrario, estimula la respuesta de calcio (Kapas *et al* *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 204 1292-1298 (1994; Vinson *et al* *J. Endocrinol.* 141 R5-R9 (1994)). Se ha informado la presencia de receptores AT1 y At2 en tumores de mama con producción local de angiotensina (Inwang *et al* *Brit. J. Cancer* 75 1279-1283 (1997); Tahmasebi *et al* *Eur. J. Cancer* 34 1777-1782 (1998)).

30 El anticuerpo monoclonal 6313/G2 es secretado por una línea celular de hibridoma depositada el 21 de julio de 1993 en la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales (ECACC, forma siglada de *European Collection of Animal Cell Cultures*), Porton Down, Reino Unido, bajo el Tratado de Budapest, y designada por el n.º de referencia 93072117. El depósito los realizaron el Dr Gavin P Vinson y el Dr Stewart Barker, Department of Biochemistry, Queen Mary & Westfield College, Mile End Road, Londres E1 4NS. El depositante ha autorizado al solicitante a referirse al material depositado en la solicitud y ha dado su consentimiento sin reservas e irrevocable para que el material depositado se ponga a disposición del público en conformidad con la Regla 28 (1)(d) del Convenio Europeo de Patentes.

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

40 O, se expresa alternativamente como, NH₂-Glu-Asp-Gly-Ile-Lys-Arg-Ile-Gln-Asp-Asp-COOH.

45 Ahora se ha descubierto, sorprendentemente, que los anticuerpos monoclonales para la secuencia peptídica que comprende la secuencia N-terminal del receptor de la angiotensina II tipo 1 tienen usos terapéuticos adicionales en determinadas afecciones médicas, donde tales usos no se habían sugerido o mostrado previamente. Adicionalmente, estos efectos terapéuticos se observan en la capacidad de los anticuerpos monoclonales para bloquear las acciones dañinas de la angiotensina II en las afecciones médicas correspondientes, mientras se conservan las acciones beneficiosas de la molécula. Se ha realizado ahora un papel funcional importante para toda la secuencia N-terminal.

50 Los aspectos de la invención para la que se busca protección son como se definen en las reivindicaciones adjuntas. De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo para un péptido que consiste en la secuencia EDGIKRIQDD

55 para su uso en el tratamiento de la proliferación de células del músculo liso vascular (MLV).

En lo anterior, y a lo largo de la presente memoria descriptiva, los restos de aminoácido se designan mediante la nomenclatura usual de una sola letra de la IUPAC. Las designaciones de una sola letra pueden correlacionarse con las designaciones clásicas de tres letras de los restos de aminoácido, de la siguiente manera:

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

60

Como se usa en el presente documento, el término "péptido" incluye oligopéptido o polipéptido y estos términos pueden usarse indistintamente.

5 En una realización preferente, la invención abarca, por lo tanto, el uso de un anticuerpo monoclonal contra una secuencia peptídica que consiste en la secuencia de aminoácidos: EDGIKRIQDD.

10 Esta secuencia se toma de la secuencia del receptor de la angiotensina II tipo 1 de rata, restos 8 a 17. Las sustituciones conservativas en este fragmento serían D por E, E por D, A por G, L por I, R por K, K por R, N por Q, o cualquier combinación de estas.

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

Por consiguiente, una secuencia de consenso preferente para el péptido correspondiente a los restos 8 a 17 del receptor de angiotensina II tipo 1 tiene la estructura:

20 EDGIKRIQDD
donde los siguientes restos pueden ser cada uno independientemente como sigue: el resto 8 pueden ser E, D o Q, el resto 9 pueden ser D o E, el resto 10 pueden ser D o A, el resto 11 pueden ser I o A, el resto 12 pueden ser K o R, el resto 13 pueden ser R o K, el resto 14 pueden ser I o A, el resto 15 pueden ser Q o N y los restos 16 y 17 pueden ser cada uno D o E.

25 El péptido, generalmente, será antigénico y tendrá la capacidad de estimular la producción de anticuerpos que, cuando se administran, se pueden utilizar en el tratamiento del cáncer.

Los subfragmentos activos alternativamente pueden consistir en o incluir heptapéptidos, incluyendo uno o más de:

SSTEDGI
STEDGIK
TEDGIKR
EDGIKRI
DGIKRIQ
GIKRIQD
IKRIQDD
KRIQDDC
RIQDDCP
IQDDCPK

30

Adicionalmente, los subfragmentos activos pueden consistir en o incluir octapéptidos, incluyendo:

NSSTEDGI
SSTEDGIK
STEDGIKR
TEDGIKRI
EDGIKRIQ
DGIKRIQD
GIKRIQDD
IKRIQDDC
KRIQDDCP
RIQDDCPK
IQDDCPKA

Adicionalmente, los subfragmentos activos pueden consistir en o incluir nonapéptidos, incluyendo:

LNSSTEDGI
NSSTEDGIK

SSTEDGIKR
STEDGIKRI
TEDGIKRIQ
EDGIKRIQD
DGIKRIQDD
GIKRIQDDC
IKRIQDDCP
KRIQDDCPK
RIQDDCPKA
IQDDCPKAG

5

Adicionalmente, los subfragmentos activos pueden consistir en o incluir decapéptidos, incluyendo:

ILNSSTEDGI
 LNSSTEDGIK
 NSSTEDGIKR
 SSTEDGIKRI
 STEDGIKRIQ
 TEDGIKRIQD
 EDGIKRIQDD
 DGIKRIQDDC
 GIKRIQDDCP
 IKRIQDDCPK
 KRIQDDCPKA
 RIQDDCPKAG
 IQDDCPKAGR

Los fragmentos preferentes incluyen los que contienen algunos, por ejemplo, al menos cuatro, restos de la secuencia EDGIKRIQDD.

5 Cabe destacar que pueden usarse combinaciones de más de una de las secuencias anteriores.

Los péptidos y otras moléculas utilizadas para preparar anticuerpos monoclonales para su uso en conformidad con la invención pueden volverse antigénicos, o presentarse, en una diversidad de modos. Por preferencia, una región antigénica (tal como un fragmento o subfragmento peptídico) en una molécula en conformidad con la invención contendrá la secuencia de aminoácidos de elección unida a un péptido o proteína soporte. Generalmente, es preferente tener una pluralidad, por ejemplo, 5 a 10, de copias de una secuencia peptídica (por ejemplo, una o más de las secuencias anteriores) unidas al soporte. El soporte puede ser, por conveniencia, una proteína en general grande, que sea inerte en aspectos materiales, y que proceda de una especie o género distinto del asociado con la hormona de crecimiento natural. Los ejemplos de vehículos incluyen albúminas tales como seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina y ovoalbúmina (aunque en este último caso es probable que no se puedan transportar tantos péptidos). Como alternativa, se puede usar hemocianina de lapa californiana. Generalmente, el soporte provendrá preferentemente de una especie distinta de aquella en la que se basa el fragmento.

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

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

Alternativamente, es posible que los anticuerpos monoclonales se preparen contra moléculas que son o que comprenden péptidos para que sean o incluyan polímeros de secuencias como se describe anteriormente. Las secuencias apropiadas se pueden polimerizar mediante reticulación de dos restos de cisteína para formar enlaces disulfuro o mediante el uso de agentes de acoplamiento químico externos (tales como carbodiimida, glutaraldehído u otros dialdehídos, o ácidos di- (o poli-) carboxílicos funcionales. Como alternativa adicional, se podrían usar técnicas de ADN recombinante para producir un polímero peptídico.

40 Cabe destacar que el acoplamiento químico (que podría tener lugar, por ejemplo, mediante restos de lisina) y la formación de enlaces disulfuro no se limitan a cuando los restos de acoplamiento están en el extremo de la secuencia: los restos internos también podrían ser apropiados. Los restos de acoplamiento, por ejemplo, los restos de cisteína, pueden añadirse según se desee.

Se puede encontrar que no sea necesario acoplar ninguna de las secuencias descritas anteriormente con péptidos externos. Pueden ser antigénicas por sí mismas. En dicho caso, puede ser aconsejable seleccionar adyuvantes particulares tales como DEAE dextrano y Merck 7426.

5 Los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar inmunizando ratones endogámicos mediante la técnica tradicional de Kohler y Milstein (Nature 256 495-497 (1975)). Se puede sintetizar un péptido correspondiente a las secuencias de epítomos descritas anteriormente por cualquier vía química o biológica conveniente, el cual se conjuga después con seroalbúmina bovina (BSA), u otra molécula adecuada, y después se usa para inmunizar a los ratones. Después de una inyección de refuerzo del conjugado péptido-BSA, se extraen los bazo de los ratones y se combinan los esplenocitos con células de mieloma de ratón. Los híbridos mixtos de mieloma-linfocito se pueden seleccionar después por crecimiento en hipoxantina, timidina y aminopterina, en un medio de cultivo celular apropiado, para inhibir la proliferación de las células de mieloma no fusionadas y de los híbridos de mieloma.

15 Las células de hibridoma se pueden explorar mediante ELISA por la reactividad contra al epítomo usado del receptor de la angiotensina II tipo 1, mediante adaptaciones de la técnica descrita en Engvall *et al* Immunochem. 8 871 (1991). Como alternativa, se puede usar la técnica de captura por anticuerpos descrita en Beckmann *et al* J. Immunol. 144 4212 (1990). Las células de hibridoma positivas pueden inyectarse por vía intraperitoneal en ratones Balb/c singénicos para producir ascitis que contengan altas concentraciones de los anticuerpos monoclonales generados contra el epítomo utilizado de la secuencia N-terminal del receptor de la angiotensina II tipo 1 descrito anteriormente. Como alternativa, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vitro* en matraces o frascos rotativos mediante diversas técnicas. Los anticuerpos monoclonales producidos en la ascitis del ratón se pueden purificar por precipitación con sulfato de amonio, seguido de cromatografía de exclusión en gel. Como alternativa, se puede usar cromatografía de afinidad basada en la unión del anticuerpo a proteína A o proteína G, así como cromatografía de afinidad basada en la unión al epítomo usado para generar el anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal 6313/G2 se preparó como se describe en Barker *et al* J. Mol. Endocrinol. 11 241-245 (1993). Los usos del anticuerpo en el tratamiento de la hipertensión y en el control de las contracciones uterinas se describieron en el documento WO-A-9509186. Sin embargo, no se sugirió ninguna utilidad más amplia en otras áreas terapéuticas potenciales.

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

35 Los epítomos de los restos 1 a 45 de la secuencia N-terminal, preferentemente, 8 a 17, del receptor de la angiotensina II tipo 1 descrito anteriormente pueden modificarse y variarse mediante la sustitución, y/o inserción, y/o delección de aminoácidos, de manera que la forma y/o la conformación global del epítomo todavía sea antigénica.

40 En realizaciones preferentes de la invención, el anticuerpo monoclonal es 6313/G2. El anticuerpo monoclonal 6313/G2 es secretado por una línea celular de hibridoma depositada el 21 de julio de 1993 en la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales (ECACC, forma siglada de *European Collection of Animal Cell Cultures*), Porton Down, Reino Unido, bajo el Tratado de Budapest, y designada por el n.º de referencia 93072117. La línea celular de hibridoma puede cultivarse adecuadamente en las condiciones normales.

45 La invención también proporciona el uso de un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que se une a un péptido que consiste en la secuencia
EDGIKRIQDD
en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la proliferación de células del músculo liso vascular (MLV).

50 El tratamiento de la proliferación de células de músculo liso vascular puede incluir el tratamiento de la aterosclerosis, una enfermedad compleja que muestra una asociación con la proliferación de células del MLV.

55 Los anticuerpos utilizados en conformidad con la presente invención pueden formularse para la inyección intravenosa usando adyuvantes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables apropiados. La inyección puede ser intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, incluyendo la inyección subcutánea. No están excluidos otros modos de administración, tales como, por ejemplo, por vía oral a través de liposomas, cápsulas gastroresistentes y similares.

60 De manera adecuada, los anticuerpos utilizados en conformidad con la presente invención pueden ser anticuerpos humanizados, como se describe en los documentos US 4.816.567 y WO 94/10332; o microcuerpos, como se describe en el documento WO 94/09817; o anticuerpos transgénicos, como se describe en el documento GB-A-2272440. Dichas construcciones sintéticas incluyen moléculas quiméricas. Por lo tanto, por ejemplo, los usos de los anticuerpos humanizados (o primatizados) o los derivados de los mismos están dentro del ámbito de la presente invención. Un ejemplo de un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene regiones marco conservadas humanas, pero tiene regiones hipervariables de roedor.

65

Además de los anticuerpos completos, la presente invención incluye usos de derivados de los anticuerpos monoclonales definidos anteriormente que tienen la capacidad de unirse al epítipo seleccionado de la región N-terminal del receptor de la angiotensina II tipo 1 descrito anteriormente. Por lo tanto, la presente invención también incluye usos de fragmentos de anticuerpos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se proporcionan en Dougall *et al* Tibtech 12 372-379 (1994).

Los fragmentos de anticuerpo incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')₂ y Fv (Roitt *et al* "Immunology", segunda edición (1989), Churchill Livingstone, Londres). Los fragmentos Fv pueden modificarse para producir una construcción sintética conocida como una molécula de Fv monocatenario (scFv). Esta incluye un enlazador peptídico que une covalentemente las regiones V_H y V_L, que contribuye a la estabilidad de la molécula.

Otras construcciones sintéticas incluyen péptidos CDR. Estos son péptidos sintéticos que comprenden determinantes de unión a antígeno. También se pueden usar peptidomiméticos. Estas moléculas son, habitualmente, anillos orgánicos conformacionalmente restringidos que imitan la estructura de un bucle de CDR y que incluyen cadenas laterales interactivas con el antígeno. Los usos de tales moléculas capaces de unirse al epítipo deseado están, por lo tanto, también dentro del ámbito de la presente invención.

Las características preferentes para los aspectos segundo y subsiguientes de la invención son como para el primer aspecto, con los cambios que correspondan.

La invención se describirá adicionalmente ahora por medio de la referencia a los siguientes Ejemplos y Figuras, que se proporcionan solo con fines de ilustración y no deben interpretarse como limitantes de la invención. Se hace referencia a una serie de Figuras en las que:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 1: El anticuerpo 6313/G2 inhibe la proliferación celular en células de próstata PNT1A

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

PNT1a, una línea de células epiteliales de próstata, se sembró en una placa de cultivo de 96 pocillos a una concentración de 1000 células por pocillo. Las células se cultivaron en presencia de medio RPMI 1640 complementado con L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales al 1 %, penicilina y estreptomycin al 2 % y piruvato de sodio 1 mM, suero fetal bovino al 10 %, durante dos días, y posteriormente se hicieron latentes mediante la incubación en medio sin suero RPMI 1640 (200 µl/pocillo) durante 24 h. Después se añadieron estimulantes a la concentración apropiada y se incubaron durante 24 horas y 96 horas. Cuatro horas antes del final de la incubación, se añadieron 20 µl de solución (en medio RPMI) de MTT 5 mg/ml filtrada (tamaño de poro de 0,2 µm) a cada pocillo y la incubación continuó a 37 °C. En el momento apropiado, se añadieron a cada pocillo 200 µl de DMSO, seguido de 25 µl de tampón de glicina de Sorensen (glicina 0,1 M, NaCl 0,1 M ajustado a pH 10,5 con NaOH 1 M), se mezcló minuciosamente. Después de 5 minutos, se leyó la absorbancia a 545 nm.

Los resultados se muestran en la Figura 1, en que se añadió anticuerpo (Ac) purificado a células PNT1a en cultivo. Las concentraciones de anticuerpo fueron (1:1600) 100 nmol/l, (1:160) 1 μ mol/l, (1:16) 10 μ mol/l. La inhibición de la proliferación fue significativa ($P < 0,05$ o mejor) en todas las concentraciones de anticuerpo utilizadas.

5 Ejemplo 2: El anticuerpo 6313/G2 inhibe la proliferación celular en células de músculo liso vascular

Se aislaron las CMLA de la arteria aórtica torácica y abdominal de rata (CMLSR) y de aorta de bovino (CMLAB) mediante el método de explante en medio y se cultivaron durante varios pases. Se obtuvieron segmentos de aorta tanto abdominal como torácica de ratas mediante disección cuidadosa de ratas muertas. Se obtuvieron segmentos de aorta de terneros con anestesia. Los segmentos de aorta se colocaron en un portaobjetos excavado que contenía medio de cultivo tisular, después de lo cual la adventicia y la porción externa de cada segmento se eliminaron cuidadosamente al microscopio de disección. La porción interna restante del tejido y la íntima se retiraron a una placa de disección distinta y se lavaron varias veces con medio de cultivo recién preparado. En este punto, cada segmento se cortó en cuadrados de aproximadamente 1 mm y se colocó en un matraz de cultivo de tejidos de 25 cm². Los
10
15
20
matraces se taparon sin apretar y se colocaron en una incubadora de CO₂ humidificada. Después de dos horas, 4 ml de medio de cultivo RPMI-1640 complementado con 100 unidades/ml de penicilina, estreptomycin 100 μ g/ml, L-glutamina 4 μ mol/l y SFB al 20 %, se añadieron cuidadosamente a los matraces sin desplazar el tejido. Después de una semana se añadió medio fresco a las muestras. Las células de los explantes estaban relativamente confluentes al cabo de un período de aproximadamente 2 semanas. Después, se enjuagaron con PBS y posteriormente se trataron con tripsina, con una solución de tripsina al 0,125 % y EDTA al 0,02 % en PBS durante 1-2 minutos a 37 °C. La suspensión de células resultante se pipeteó en matraces de cultivo de tejidos de 75 cm² que contenían 10 ml de medio de cultivo y, se incubó como anteriormente. Los experimentos se realizaron con células de los pases 3-5.

Se preparó una suspensión de CMLAR (10⁵ células/ml) el primer día del experimento utilizando RPMI-1640 complementado con SFB al 20 %. Se distribuyó un ml de esta suspensión celular a cada pocillo de una placa
25
30
multipocillo de 24 pocillos. El medio se reemplazó 24 h después del subcultivo con medio RPMI-1640. Las células latentes (sin suero) o repletas de suero se incubaron con los medios experimentales apropiados durante 48 horas, con 4 pocillos por grupo. Se añadió 10 μ l de ³H-metilimidina (0,1 mCi/ml) a cada pocillo (1 ml de medio/pocillo). 24 horas después de la adición de timidina radiactiva, se aspiró el medio y las células cultivadas se enjuagaron 3 veces con PBS frío. Las células se disolvieron después en 0,5 ml de NaOH 0,1 N y se mezcló una alícuota de 0,3 ml con 3,5 ml de líquido de centelleo y, después de dejar durante la noche a temperatura ambiente, se sometió a ensayo el contenido de tritio en un contador de centelleo líquido.

Los resultados se muestran en la Figura 2, en que la proliferación se estimuló con angiotensina II 10 nmol/l y se inhibió
35
con 6313/G2 (10 μ mol/l, ** $P < 0,01$).

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

Se sembraron células MCF-7 (obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, forma siglada de
40
45
50
American Type Culture Collection) Manassas, VA 20108, EE. UU.) en placas de 24 pocillos a una densidad de 5000 células por pocillo y se cultivaron durante 24 horas en Medio Esencial Mínimo de Eagles (MEM) que contenía suero fetal bovino al 5% (SFB). Las células se incubaron a continuación durante 24 horas adicionales en medio sin suero. Después de esto, las células se cultivaron en medio sin suero solo (pocillos de control) o en medio sin de suero con adición a los pocillos experimentales de angiotensina II sola (1-10 nM), o con el anticuerpo 6313/G2. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado. A continuación, las células se cultivaron durante 24 horas. Después de 20 horas, se añadió timidina tritiada a cada pocillo (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, RU, 50 μ Ci/ml, actividad esp. 5 Ci/mmol) y las células se cultivaron durante 4 horas adicionales. Al final de este período, el medio se aspiró y las células cultivadas se enjuagaron tres veces con una solución de tampón enfriada en hielo (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4). Las células se disolvieron después en 1 ml de NaOH 0,1 N y 0,5 ml de esta solución se mezclaron con 3,5 ml de cóctel de centelleo (centelleador de tolueno, Packard Bioscience B.V. Groningen, Países Bajos) y se analizó el contenido de tritio.

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

55 Se llevó a cabo un ensayo de adhesión celular de células MCF-7 en proteína de matriz extracelular para investigar. Se recubrieron placas de cultivo celular de 96 pocillos (de fondo plano) con cantidades graduadas de proteína de matriz humana purificada, colágeno tipo IV (50 μ g/pocillo). Se dejaron toda la noche en una cabina de flujo laminar para evaporarse, a temperatura ambiente.

60 Se trataron células MCF-7 (obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) Manassas, VA 20108, USA) con anticuerpo 6163/G2 durante 48 horas. Los controles no estaban tratados. Antes de usarse, se trató cada pocillo con BSA (200 μ g/ml) para eliminar la unión no específica.

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

Después, los pocillos se observaron al microscopio y se contó el número de células adheridas. El anticuerpo 6313/G2 redujo significativamente la adhesión celular ($P < 0,05$). Los resultados se muestran en la Figura 3, como el número de células MCF-7 adheridas a colágeno ($50 \mu\text{g/pocillo}$) frente a los tratamientos con y sin anticuerpo 6313.

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

Se llevó a cabo un ensayo de quimioinvasión de células MCF-7 sobre proteína de matriz extracelular para investigar. Se recubrieron insertos de filtro de $8 \mu\text{m}$ con proteína de matriz colágeno tipo IV humano purificado y se dejaron durante la noche en una cabina de flujo laminar para secar a temperatura ambiente. Las células MCF-7 se trataron con anticuerpo 6163/G2 (sobrenadante de hibridoma) durante 48 horas. Los controles de células no estaban tratados.

10 Antes de usarse, Se añadió BSA ($100 \mu\text{g/ml}$) a cada pocillo durante 1 hora. Se utilizó como factor quimiotáctico DMEM precondicionado por incubación con fibroblastos 3T3. Los insertos recubiertos se colocaron en cada pocillo para formar una cámara superior y una inferior. Se añadieron 10.000 células MCF-7 en la cámara superior, con la adición de DMEM sin suero. El medio de células 3T3 condicionado se colocó en el compartimento inferior. Las placas se cubrieron e incubaron a 37°C en un ambiente humidificado con CO_2 al 5 % durante 24 horas.

Después de la incubación, las células que permanecían en la superficie superior del filtro se retiraron por completo y las células que habían atravesado el colágeno y se habían unido a la superficie inferior del filtro se tiñeron con Diff-Quik, y se contaron. Los resultados se muestran en la Figura 4, como el número de células MCF-7 que invadieron el colágeno ($50 \mu\text{g/pocillo}$) frente a los tratamientos con y sin anticuerpo 6313. El anticuerpo 6313 inhibió significativamente la invasión celular ($P < 0,01$).

25 Ejemplo 6: Efecto del anticuerpo 6313 sobre la expresión de integrina en células de cáncer de mama

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

30 Las líneas celulares MCF-7 se trataron durante 48 horas con el anticuerpo 6313/G2, los controles no estaban tratados. Se prepararon fracciones de membranas celulares y se fraccionó en gel de SDS-PAGE al 8 % no reducido.

Las proteínas se transfirieron después a una membrana de nitrocelulosa durante una noche, a 30 V a 4°C .

35 Se utilizaron anticuerpos primarios y secundarios para las integrinas $\alpha 3$ y $\beta 1$ para detectar estos componentes en las membranas de nitrocelulosa utilizando métodos establecidos para transferencia de Western. Las bandas luminiscentes se revelaron mediante la incubación de la membrana en reactivos de detección de transferencias de Western de quimioluminiscencia potenciada (ECL) durante 1 minuto, mediante la exposición a hyper film ECL. Los resultados se muestran en la figura 5, en que, C = control, A = anticuerpo analizado, los otra calles (M) son los marcador de peso molecular.

40 Ejemplo 7: Efecto del anticuerpo 6313 sobre las respuestas de calcio en células MCF-7 y en CMLAR

Se investigó el efecto del anticuerpo 6313 sobre las respuestas de calcio en células MCF-7 y en CMLAR. Se encontró en ambas que el anticuerpo 6313 estimulaba la respuesta de calcio.

45 Para la medición del ion calcio ($[\text{Ca}^{2+}]$), las células se cargaron con fura-2 $1 \mu\text{M}$ durante 30 minutos en medio de solución de bicarbonato de Ringer modificada por Krebs (K^+ 3,6 mM, Ca^{2+} 1,2 mM, Mg^{2+} 0,5 mM, Hepes 5 mM y HCO_3^- 20 mM) a 37°C . Para mediciones simultáneas de medición de la fluorescencia de fura-2, las células sembradas en placa en cubreobjetos se montaron en la pletina de un microscopio invertido (Zeiss) en solución de bicarbonato de Ringer modificada por Krebs. Las longitudes de onda de excitación fueron 340 nm y 380 nm, y la emisión se detectó a 510 nm. La concentración del ion calcio ($[\text{Ca}^{2+}]$) se calculó a partir de la relación de intensidades de fluorescencia a las longitudes de onda de excitación de 340 nm y 380 nm.

55 Los resultados se muestran en la Figura 6, en células MCF-7 y en CMLAR. La flecha vertical indica el punto de aplicación de anticuerpo 6313/G2. El aumento de la relación de intensidades de fluorescencia es proporcional a la concentración de ion calcio intracelular.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que se une al péptido que consiste en la secuencia EDGIKRIQDD para su uso en el tratamiento de la proliferación de células del músculo liso vascular (MLV).
- 10 2. El uso de un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que se une al péptido que consiste en la secuencia EDGIKRIQDD en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la proliferación de células del MLV.
- 15 3. El anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en que el anticuerpo monoclonal se genera contra el péptido EDGIKRIQDD.
- 20 4. El anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado.
- 25 5. El anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en que el anticuerpo monoclonal es 6313/G2 producido por la línea celular de hibridoma designada por el nº. de referencia 93072117 de la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales (ECACC) o un anticuerpo humanizado del mismo.
- 30 6. El anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 5, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en que el fragmento es un fragmento Fab, F(ab')₂ o Fv o una molécula de Fv monocatenario (scFv).
7. El anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 6, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde dicho tratamiento de la proliferación de células del MLV es para la aterosclerosis.

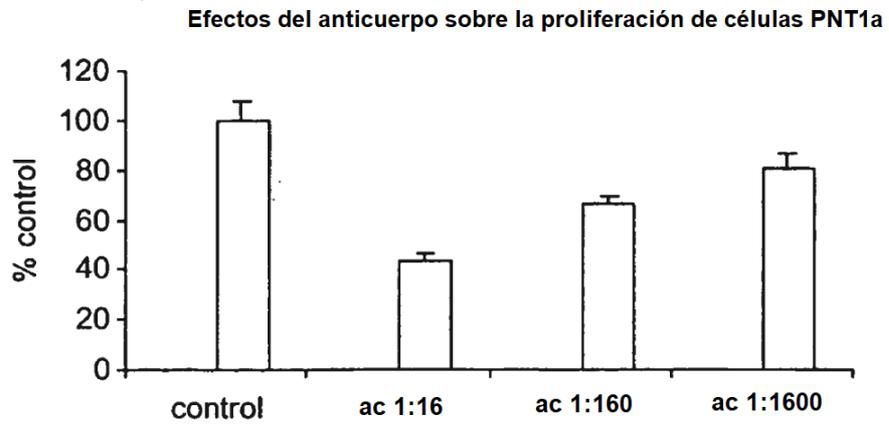


FIG. 1

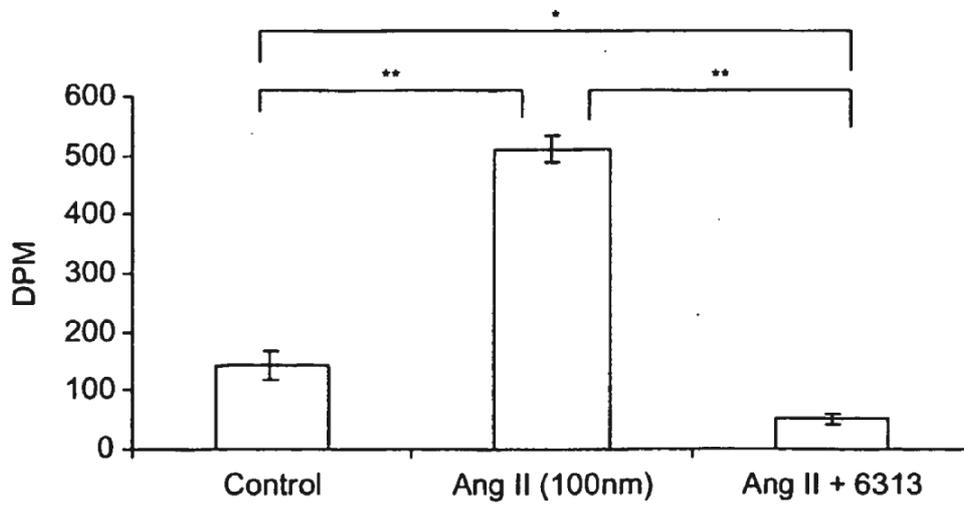


FIG. 2

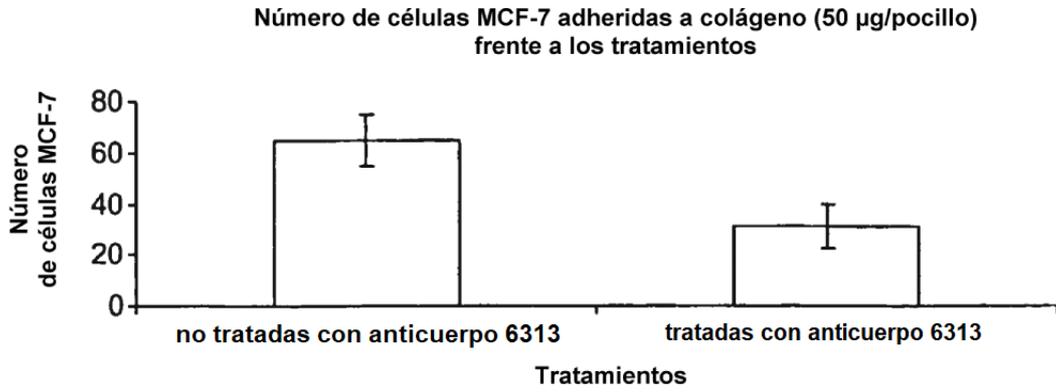


FIG. 3

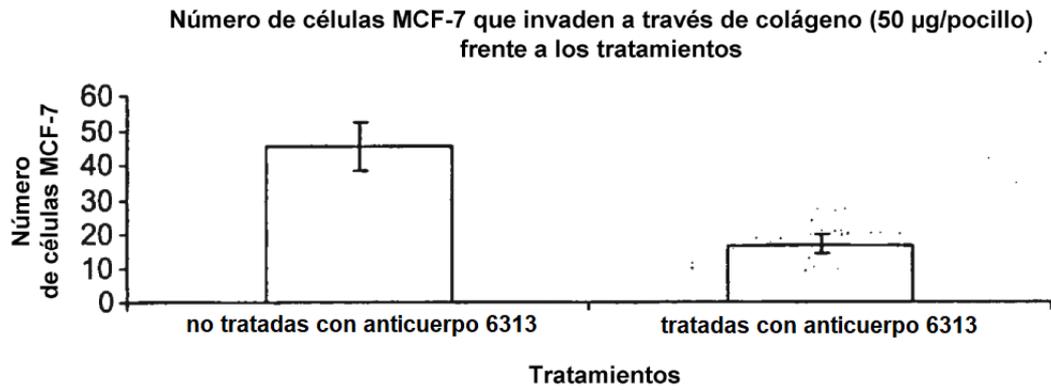


FIG. 4

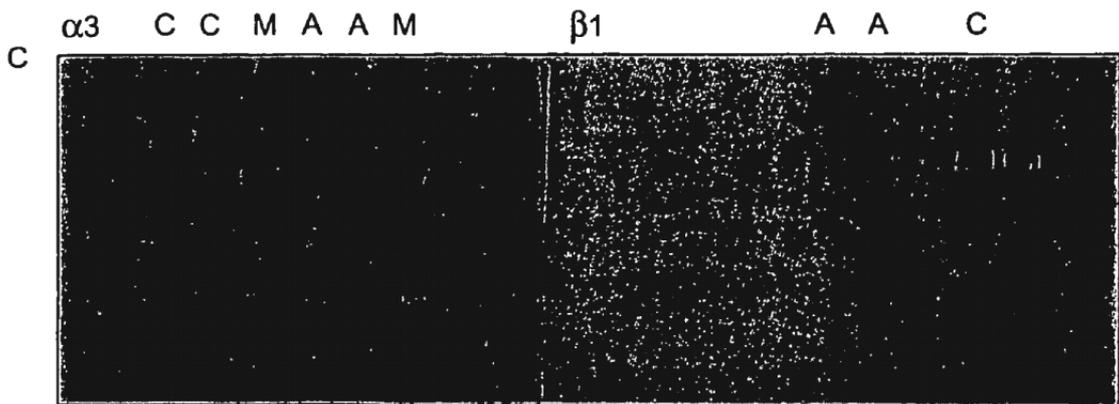


FIG. 5

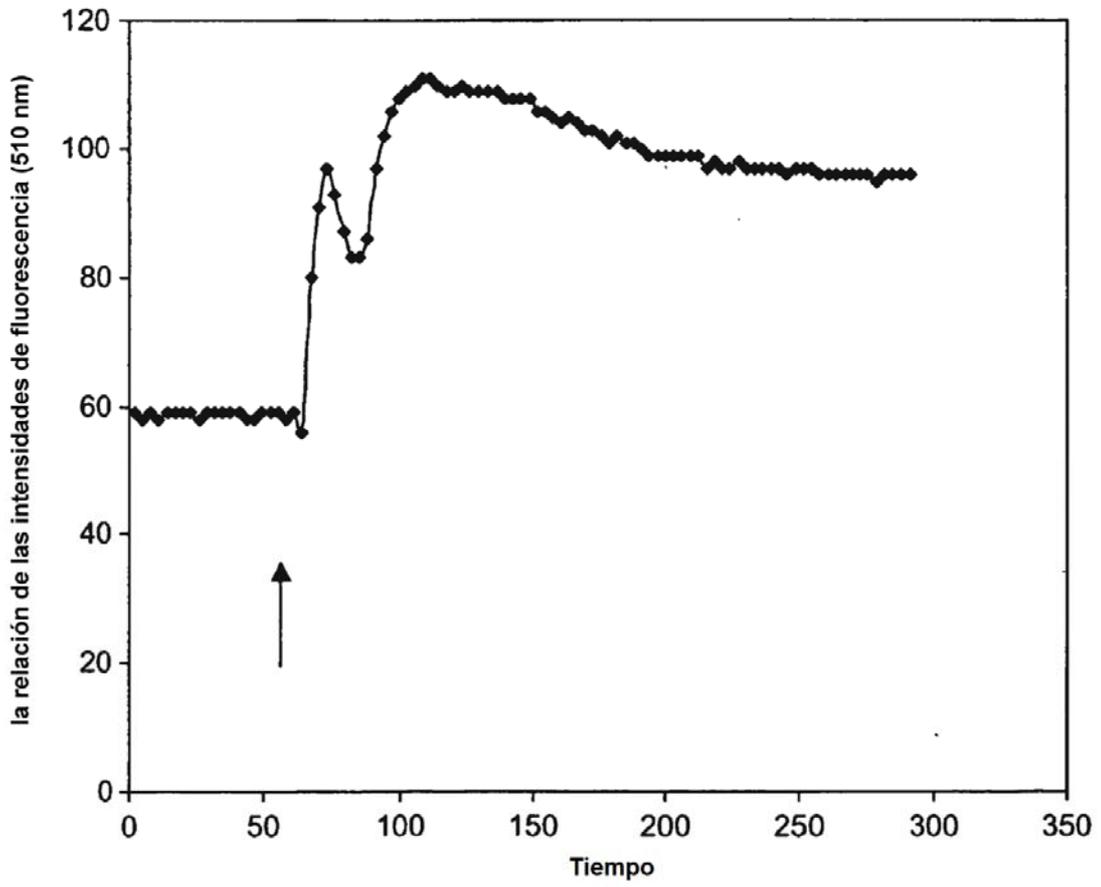


FIG. 6

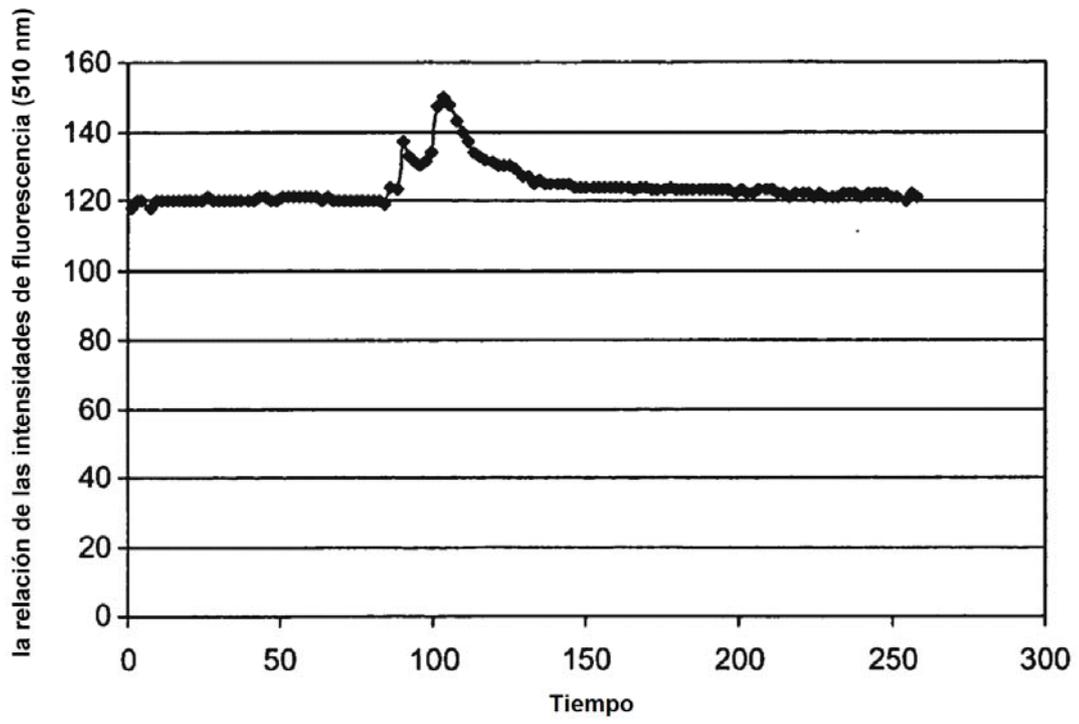


FIG. 7

Acciones de la angiotensina II

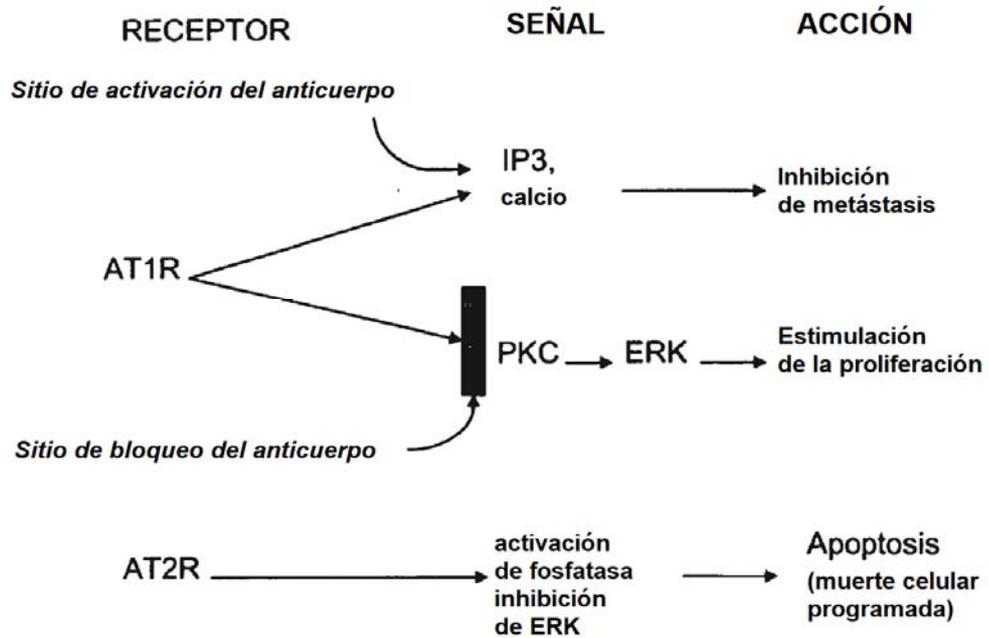


FIG. 8

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

- denota resto idéntico

X denota resto faltante

FIG. 9