

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 865 300**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2017 PCT/EP2017/065442**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.12.2017 WO17220739**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2017 E 17734032 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2021 EP 3458480**

54 Título: **Anticuerpo dirigido contra el receptor de endotelina subtipo beta**

30 Prioridad:

24.06.2016 FR 1655915

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

15.10.2021

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
Bâtiment "Le Ponant D" 25, rue Leblanc
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BOQUET, DIDIER;
DUCANCEL, FRÉDÉRIC;
HERBET, AMAURY;
COSTA, NARCISO y
HUGNOT, JEAN-PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 865 300 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

Anticuerpo dirigido contra el receptor de endotelina subtipo beta

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al campo técnico de los anticuerpos, su uso terapéutico y diagnóstico, así como su uso como herramienta de investigación.

10 Más particularmente, la presente invención proporciona anticuerpos, ventajosamente anticuerpos monoclonales, específicos para la conformación nativa y funcional del receptor de endotelina subtipo B y en particular los receptores de endotelina humanos expresados en la superficie de células cancerosas tales como células de glioblastoma.

15 La presente invención se refiere al uso de estos anticuerpos con fines terapéuticos y de diagnóstico, así como con fines de investigación.

Estado de la técnica anterior

20 Los receptores de diferentes endotelinas (designadas ET1, ET2 y ET3 en seres humanos) pertenecen a la familia de receptores con 7 dominios transmembrana también llamados GPCR para "receptores acoplados a proteína G". Los receptores de endotelina tienen, en los seres humanos, dos subtipos principales que son el subtipo A (ETA-R) y el subtipo B (ETB-R). El hecho de que estos receptores se clasifiquen en la familia GPCR les confiere una estructura tridimensional compleja. Esta característica explica en parte la dificultad para obtener anticuerpos que reconozcan la estructura nativa de estos receptores que se expresa en la membrana celular. De hecho, la dificultad para obtener anticuerpos monoclonales específicos de los GPCR es consecuencia de los problemas relacionados con la obtención de estos receptores, en forma nativa y funcional, fuera de su contexto de membrana.

25 El eje de la endotelina y sus receptores están implicados en varias funciones y disfunciones fisiopatológicas. A modo de ejemplos no limitativos, pueden mencionarse hipertensión arterial, aterosclerosis, arteriopatías coronarias, disfunciones hepáticas, enfermedades cerebrovasculares, enfermedad de Crohn, fibrosis pulmonar, asma, etc. (véase, para revisión R. Shah, 2007, "Endothelins in health and disease", Eur. J. Int. Med., vol. 18, páginas 272-282).

30 Además, los receptores de endotelina también resultaron estar asociados con el desarrollo de muchos cánceres, al promover la proliferación, supervivencia y diseminación de las células cancerosas, así como la angiogénesis (Bagnato y Rosano, 2008, "The endothelin axis in cancer", Int. J. of Biochem. & Cell Biology, vol. 40, páginas 1443-1451). En cuanto al receptor de endotelina subtipo B, este último presenta una modificación de su nivel de expresión, en particular en melanomas, cáncer de colon, sarcoma de Kaposi, glioblastomas (tumores cerebrales) y en casos de cáncer de vejiga.

40 También se establece que el receptor de endotelina subtipo B está implicado en la falta de reconocimiento de algunas células cancerosas, en particular de las células cancerosas de ovario por parte del sistema inmunitario, induciendo una fuerte reducción en la infiltración de linfocitos (Buckanovich et al., 2008, "Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy", Nature Medicine, vol. 14, páginas 28-36).

45 Por lo tanto, el direccionamiento de un isómero conformacional ETB-R expresado en la superficie de las células cancerosas y, en particular, en las células de glioblastoma, parece ser particularmente relevante en biología clínica humana en términos de una herramienta de diagnóstico para el seguimiento del desarrollo de estos tumores y, en particular, de estos tumores cerebrales y sus recidivas después de una operación quirúrgica, pero también para aplicaciones terapéuticas dirigidas a estas células tumorales. Sin embargo, en el arsenal de inmunoterapia pasiva de los cánceres que usa anticuerpos monoclonales (hasta la fecha se han aprobado 40 anticuerpos), ninguno de ellos se dirige a los GPCR.

50 Generalmente, hasta la fecha se han descrito pocos anticuerpos dirigidos a receptores de endotelina y, en particular, al subtipo ETB-R.

55 Kondoh et al., 1990 ("Isolation of anti-endothelin receptor monoclonal antibodies for use in receptor characterization", BBRC, vol. 172, páginas 503-510) describen las propiedades de unión de 4 anticuerpos monoclonales (A2, G9, E7 y G10) a complejos solubilizados de receptores de endotelina presentes en la superficie de las membranas pulmonares de rata. Los anticuerpos G9 y G10 son inmunoglobulinas de tipo G isotipo 2a (IgG2a), mientras que los anticuerpos A2 y E7 son inmunoglobulinas IgG1. Si estos 4 anticuerpos son realmente específicos de receptores de endotelina solubilizados, Kondoh et al. no aportan ninguna información sobre la fina especificidad de estos anticuerpos (ETA-R y/o ETB-R), en cuanto al reconocimiento de receptores de origen humano, ni en cuanto a una posible propiedad antagonista.

65 Yamaguchi et al., 2004 ("Characterization and application of monoclonal antibodies against human endothelin B

receptor expressed in insect cells", *Biotechnology Letters*, vol. 26, páginas 293-299) se refieren a la caracterización de las propiedades de unión de 5 anticuerpos monoclonales de ratón obtenidos tras la inmunización proteica con ETB-R humano recombinante producido en células de insecto. Cuatro de ellos tienen una afinidad similar (en el intervalo nanomolar) por ETB-R, mientras que el quinto es 10 veces menos afín. El análisis epitópico de 3 de ellos (N-6, N-3 y N-1) reveló que reconocen el dominio N-terminal de ETB-R y más particularmente la secuencia correspondiente a los aminoácidos 27-35 de ETB-R para N-6; la secuencia correspondiente a los aminoácidos 27-41 de ETB-R para N-3 y la secuencia correspondiente a los aminoácidos 71-85 para N-1. Finalmente, estos 5 anticuerpos son capaces de reconocer células COS que sobreexpresan ETB-R.

La solicitud de patente US 2010/003240 depositada en nombre de la Universidad de Nueva York y publicada el 7 de enero de 2010 se refiere a protocolos terapéuticos y mezclas farmacéuticas dentro del alcance del tratamiento y la prevención de cánceres y, en particular, melanomas. Para ello y más específicamente, se reivindica el uso de antagonistas de ETB-R. Los ejemplos descritos sobre estos antagonistas solo se refieren a formas de endotelina-1 modificadas, pero por extensión, se reivindica el uso de anticuerpos antagonistas de ETB-R mientras que no se describe ni se proporciona ningún ejemplo particular de dichos anticuerpos.

La solicitud de patente JP 2012111706 en nombre de Seikisui Chemical Co Ltd y publicada el 14 de junio de 2012 se refiere a un anticuerpo monoclonal llamado hB07. Se trata de una inmunoglobulina de ratón de isotipo IgG2a/lambda, que es específica del receptor de endotelina subtipo B humano. Los autores han demostrado que el anticuerpo hB07 es capaz de bloquear competitivamente la unión de endotelina 1 con una eficiencia (CI_{50}) calculada de $1,7 \cdot 10^{-7}$ M. Por lo tanto, este anticuerpo, cuyas secuencias no se describen, tiene propiedades antagónicas.

Asimismo, en la solicitud internacional WO 2012/045776 en nombre de CEA y publicada el 12 de abril de 2012 se ha descrito un anticuerpo monoclonal antagonista de las propiedades farmacológicas del receptor de endotelina subtipo B y, en particular, el subtipo B humano, llamado Rendomab-B1.

Finalmente, la solicitud internacional WO 2013/063001 en nombre de Genentech y Hoffmann-La Roche y publicada el 2 de mayo de 2013 describe un anticuerpo terapéutico conjugado con moléculas citotóxicas para el tratamiento de melanomas, sin referencia a un isómero conformacional expresado preferentemente por las células tumorales. Este anticuerpo llamado 5E9 se dirige al ETB-R humano sobreexpresado en la superficie de los melanomas. Cabe señalar que el anticuerpo 5E9 se cruza con el ETB-R de roedor, así como con el receptor de primates no humanos, como se expone en Asundi et al., 2011 ("An antibody-drug conjugate targeting the endothelin B receptor for the treatment of melanoma", *Clinical Cancer Research*, vol. 17, páginas 965-975).

Por lo tanto, los inventores se fijaron el propósito de obtener anticuerpos capaces de dirigirse a isómeros conformacionales particulares del receptor de endotelina subtipo B expresado en la superficie de las células cancerosas.

Divulgación de la invención

La presente invención permite resolver problemas técnicos tales como los previamente definidos y alcanzar el propósito fijado por los inventores.

De hecho, los inventores han desarrollado y utilizado una estrategia de inmunización de selección particular ya publicada en Allard et al., 2011 ("Electroporation-aided DNA immunization generates polyclonal antibodies against the native conformation of human endothelin B receptor", *DNA and Cell Biology*, vol. 30, páginas 727-737). Esta estrategia junto con un procedimiento de cribado de hibridomas en células ELISA y a continuación mediante citometría de flujo favorece la obtención de anticuerpos monoclonales específicos de ETB-R en su conformación nativa. Este enfoque además tiene la ventaja de no necesitar el receptor de interés extraído y purificado, lo que todavía hoy es particularmente difícil.

Mediante esta estrategia, los inventores han podido seleccionar diferentes anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor de endotelina subtipo B y en particular el subtipo B humano, denominados en lo sucesivo en el presente documento Rendomab-B49, Rendomab-B41 y Rendomab-B36. Estos anticuerpos no solo son cercanos entre sí en cuanto a sus secuencias de nucleótidos y péptidos, sino también en cuanto a sus propiedades. Por lo tanto, ninguno de estos anticuerpos es un antagonista de las propiedades farmacológicas del receptor de endotelina subtipo B (ETB-R). En otras palabras, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención no son capaces de inhibir o bloquear la unión de los ligandos de endotelina y en particular los ligandos ET1, ET2 y ET3 en ETB-R. Por el contrario, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son capaces de reconocer los isómeros conformacionales particulares del receptor de endotelina subtipo B expresado en la superficie de las células cancerosas y en particular de las células de glioblastoma.

La presente invención es como se define en el conjunto de reivindicaciones adjuntas y se refiere a un anticuerpo dirigido contra el receptor de endotelina subtipo B, un fragmento o derivado del mismo como se define en las reivindicaciones 1-10 adjuntas.

Antes de describir la invención con más detalle, se recordarán o se sugerirán las siguientes definiciones.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" son equivalentes y pueden usarse indistintamente en la presente invención.

5 Un anticuerpo es una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y al menos dos cadenas ligeras (L) conectadas entre sí por uno o más puentes disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable (o dominio) (VH) y una región constante que comprende 3 dominios, normalmente denominados CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable (o dominio) (VL) y una región constante que comprende un dominio
10 único, habitualmente denominado CL. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras involucradas en el reconocimiento de antígenos pueden subdividirse en 3 regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), rodeadas por 4 regiones más conservadas, también llamadas regiones marco (FR). La organización de cada región variable de cadena pesada (o cadena ligera) es, desde el extremo N al extremo C, de la siguiente manera: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Dentro del alcance de la presente
15 invención, la definición de las CDR y las FR que se ha utilizado es la de IMGT (la base de datos internacional ImMunoGeneTics <http://imgt.cines.fr:8104>). Por lo tanto, los cálculos de los porcentajes de identidad de las secuencias de CDR mencionadas y reivindicadas en lo sucesivo en el presente documento deben tenerse en cuenta basándose en esta anotación.

20 Además, el término "anticuerpo" incluye, dentro del alcance de la presente invención, no solo moléculas completas de anticuerpos sino también fragmentos y derivados de las mismas.

Por "fragmento de anticuerpo", se entiende, dentro del alcance de la presente invención, tanto un fragmento monovalente que tiene un único sitio de unión a antígeno como un fragmento divalente que tiene dos sitios de
25 combinación de antígeno. Por lo tanto, un fragmento de acuerdo con la invención tiene al menos un sitio de unión a antígeno. Entre estos fragmentos, se pueden mencionar los fragmentos Fab, F(ab')₂, Fv y otros fragmentos que conservan el sitio de unión a antígeno (scFv y diacuerpo). Un fragmento Fab es un fragmento monovalente que consiste en la cadena ligera completa y parte de la cadena pesada (Fd) que comprende los dominios VH y CH1 como se han definido previamente. Un fragmento F(ab')₂ es un fragmento divalente correspondiente a la asociación de dos
30 fragmentos Fab conectados por puentes disulfuro presentes en la región bisagra de las inmunoglobulinas situadas entre los dominios constantes CH1 y CH2. Un fragmento Fv es un fragmento monovalente que consiste únicamente en las regiones variables VL y VH de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo. Un fragmento scFv es un fragmento polipeptídico monovalente, obtenido únicamente por ingeniería genética, correspondiente a los dominios variables conectados por un enlace peptídico. Un diacuerpo es una molécula de anticuerpo divalente recombinante que consiste
35 en dos moléculas scFv de cabeza a cola debido al enlace peptídico demasiado corto para permitir que se forme un scFv. Los fragmentos de acuerdo con la invención también incluyen fragmentos que se han mencionado previamente, cuya semivida se ha aumentado mediante modificación química en particular mediante la incorporación en un liposoma o la introducción de un polialquilenglicol tal como un polietilenglicol (PEG), denominándose esta técnica "PEGilación" y dando fragmentos tales como Fab-PEG, F(ab')₂-PEG o Fv-PEG. Por vía recombinante, también es posible generar
40 fragmentos únicos o fusionados del anticuerpo de acuerdo con la presente invención, que tienen propiedades más eficientes y mejor controladas de penetrabilidad de tumores sólidos y de farmacocinética. Los fragmentos de anticuerpos útiles dentro del alcance de la presente invención pueden ser naturales o recombinantes.

Por "derivado de anticuerpo" se entiende, dentro del alcance de la presente invención, fragmentos de anticuerpo
45 obtenidos mediante ingeniería genética tales como moléculas de Fv monocatenario (scFv) y de anticuerpo de dominio único (dAb). El término también incluye moléculas de tipo anticuerpo que pueden introducirse usando técnicas de presentación en fagos u otras técnicas de selección aleatoria para moléculas que se unen al receptor de endotelina subtipo B o a regiones específicas de este subtipo (no forman parte de la presente invención).

50 Por lo tanto, los "fragmentos de anticuerpos" y los "derivados de anticuerpos" incluyen moléculas que contienen una estructura peptídica, que forma parte del sitio de reconocimiento (es decir, la parte del anticuerpo que se une o se combina con el epítipo o el antígeno) de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención. Además, los fragmentos y derivados de anticuerpos de acuerdo con la presente invención son capaces de reconocer isómeros conformacionales particulares del receptor de endotelina subtipo B expresado en la superficie de las células
55 cancerosas y en particular de las células de glioblastoma.

La presente memoria descriptiva divulga un anticuerpo dirigido contra el receptor de endotelina subtipo B que comprende:

- 60 - una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 (designada en lo sucesivo en el presente documento CDR1_H), una CDR2 (designada en lo sucesivo en el presente documento CDR2_H) y una CDR3 (designada en lo sucesivo en el presente documento CDR3_H) de tal forma que la yuxtaposición ordenada formada por las secuencias de aminoácidos de la CDR1_H, CDR2_H y CDR3_H presente al menos un 80 % de identidad con la siguiente secuencia de aminoácidos: GYTFISYWIDPDSGGTAREGDYAWFAY (SEQ ID NO: 1) y
65 - una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 (designada en lo sucesivo en el presente documento CDR1_L), una CDR2 (designada en lo sucesivo en el presente documento CDR2_L) y una CDR3

(designada en lo sucesivo en el presente documento CDR3_L) de tal forma que la yuxtaposición ordenada formada por las secuencias de aminoácidos de la CDR1_L, CDR2_L y CDR3_L presente al menos un 80 % de identidad con la siguiente secuencia de aminoácidos: QSIVHSNGNTYKVSFQGSHPWT (SEQ ID NO: 2).

5 Dentro del alcance de la presente invención, las secuencias de aminoácidos se dan de acuerdo con el código internacional de 1 letra.

10 Por "yuxtaposición ordenada formada por las secuencias de aminoácidos de la CDR1_H, CDR2_H y CDR3_H (o por las secuencias de aminoácidos de la CDR1_L, CDR2_L y CDR3_L)", se entiende la secuencia de aminoácidos (aa) artificial que tiene la siguiente fórmula: secuencia de aa de la CDR1_H + secuencia de aa de la CDR2_H + secuencia de aa de la CDR3_H (o secuencia de aa de la CDR1_L + secuencia de aa de la CDR2_L + secuencia de aa de la CDR3_L).

15 Normalmente, la yuxtaposición ordenada formada por las secuencias de aminoácidos de la CDR1_H, CDR2_H y CDR3_H tiene al menos un 81 % de identidad con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Además, la yuxtaposición ordenada formada por las secuencias de aminoácidos de la CDR1_L, CDR2_L y CDR3_L tiene al menos un 85 % de identidad con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

20 El anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende una región variable de cadena pesada cuya CDR1_H tiene la siguiente secuencia consenso: GYTFX₁SYW (SEQ ID NO: 3) en la que X₁ es I o T, y la secuencia de aminoácidos de la CDR1_H de la región variable de cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la presente invención es GYTFISYW (SEQ ID NO: 5) o GYTFTSYW (SEQ ID NO: 7).

25 El anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende una región variable de cadena pesada cuya CDR2_H tiene la siguiente secuencia consenso: IDPX₂SGGT (SEQ ID NO: 8) en la que X₂ es D o N, y la secuencia de aminoácidos de la CDR2_H de la región variable de cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la presente invención es IDPDSGGT (SEQ ID NO: 10) o IDPNSGGT (SEQ ID NO: 12).

30 El anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende una región variable de cadena pesada cuya CDR3_H tiene la siguiente secuencia consenso: X₃REGX₄X₅AWFX₆Y (SEQ ID NO: 13) en la que X₃ es A o V; X₄ se elige del grupo que consiste en D, W y E; X₅ se elige del grupo que consiste en Y, D y F y X₆ es A o V. En una realización más particular adicional, la secuencia de aminoácidos de la CDR3_H de la región variable de cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la presente invención se elige del grupo que consiste en AREGDYAWFAY (SEQ ID NO: 15), VREGDAWFVY (SEQ ID NO: 17) y AREGEFAWFAY (SEQ ID NO: 19).

35 El anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende una región variable de cadena ligera cuya CDR1_L tiene la siguiente secuencia consenso: QX₇IVHSNGX₈TY (SEQ ID NO: 20) en la que X₇ es N o S, y X₈ es N o Y. En una realización más particular adicional, la secuencia de aminoácidos de la CDR1_L de la región variable de cadena ligera del anticuerpo de acuerdo con la presente invención es QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 22) o QNIVHSNGYTY (SEQ ID NO: 24).

40 El anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende una región variable de cadena ligera cuya CDR2_L tiene la siguiente secuencia consenso: KVX₉ en la que X₉ es S o F, y la secuencia de aminoácidos de la CDR2_L de la región variable de cadena ligera del anticuerpo de acuerdo con la presente invención es KVS o KVF.

45 El anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende una región variable de cadena ligera cuya CDR3_L tiene la siguiente secuencia consenso: FQGSHVPX₁₀T (SEQ ID NO: 25) en la que X₁₀ es W o L, y la secuencia de aminoácidos de la CDR3_L de la región variable de cadena ligera del anticuerpo de acuerdo con la presente invención es FQGSHVPWT (SEQ ID NO: 27) o FQGSHVPLT (SEQ ID NO: 29).

50 Ventajosamente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende:

i₁) una región variable de cadena pesada que comprende:

- 55
- una CDR1_H cuya secuencia de aminoácidos es GYTFISYW (SEQ ID NO: 5);
 - una CDR2_H cuya secuencia de aminoácidos es IDPDSGGT (SEQ ID NO: 10); y una herramienta de investigación de tal anticuerpo en el campo de los cánceres y, en particular, del glioblastoma.
 - una CDR3_H cuya secuencia de aminoácidos es AREGDYAWFAY (SEQ ID NO: 15);

o

60 ii₁) una región variable de cadena pesada que comprende:

- 65
- una CDR1_H cuya secuencia de aminoácidos es GYTFTSYW (SEQ ID NO: 7);
 - una CDR2_H cuya secuencia de aminoácidos es IDPDSGGT (SEQ ID NO: 10); y
 - una CDR3_H cuya secuencia de aminoácidos es VREGDAWFVY (SEQ ID NO: 17);

o

iii₁) una región variable de cadena pesada que comprende:

- una CDR1_H cuya secuencia de aminoácidos es GYTFTSYW (SEQ ID NO: 7);
- una CDR2_H cuya secuencia de aminoácidos es IDPNSGGT (SEQ ID NO: 12); y
- una CDR3_H cuya secuencia de aminoácidos es AREGEFAWFAY (SEQ ID NO: 19).

Más particularmente, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos presenta al menos un 80 % de identidad con la siguiente secuencia:

QVQLQQPGAALVKPGASVKLSCKASGYTFISYWMLWVKQRPGRGLEWIGRIDP

DSGGTKYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREGDYAWFAYWGQGLTLPVSA

(SEQ ID NO: 31).

Por lo tanto, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos presenta al menos un 80 % de identidad y puede presentar al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, o incluso al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 31.

Además, más particularmente, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos corresponde a, es decir, consiste en, la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 31 (en el caso de Rendomab-B49).

Como alternativa (en el caso de Rendomab-B41), el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos corresponde a, es decir, consiste en, la siguiente secuencia de aminoácidos:

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGRGLEWIGRID

PDSGGTKYNEKFKSKATLTVDKPSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCVREGWDAWFVYWGQGLTLLTVS

A (SEQ ID NO: 33).

En otra alternativa (en el caso de Rendomab-B36), el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos corresponde a, es decir, consiste en, la siguiente secuencia de aminoácidos:

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWIHWVNQRPGRGLEWIGRIDP

NSGGTKYNEKFKSKATLTVDKTSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCAREGEFAWFAYWGQGLTIVSA

(SEQ ID NO: 35).

Ventajosamente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende:

i₂) una región variable de cadena ligera que comprende:

- una CDR1_L cuya secuencia de aminoácidos es QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 22);
- una CDR2_L cuya secuencia de aminoácidos es KVS;
- una CDR3_L cuya secuencia de aminoácidos es FQGSHVPWT (SEQ ID NO: 27);

o

ii₂) una región variable de cadena ligera que comprende:

- una CDR1_L cuya secuencia de aminoácidos es QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 22);
- una CDR2_L cuya secuencia de aminoácidos es KVF;
- una CDR3_L cuya secuencia de aminoácidos es FQGSHVPLT (SEQ ID NO: 29);

o

iii₂) una región variable de cadena ligera que comprende:

- una CDR1_L cuya secuencia de aminoácidos es QNIVHSNGYTY (SEQ ID NO: 24);
- una CDR2_L cuya secuencia de aminoácidos es KVS;
- una CDR3_L cuya secuencia de aminoácidos es FQGSHVPLT (SEQ ID NO: 29).

5 Más particularmente, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos presenta al menos un 80 % de identidad con la siguiente secuencia:

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS**Q**SIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK

VSNRFGV**P**DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYY**CFQ**G**S**H**V**P**W**T**F**GGG**T**KLEIK (SEQ ID NO: 37).

10 Por lo tanto, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos presenta al menos un 80 % de identidad y puede presentar al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 % o incluso al menos un 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 37.

15 Además, más particularmente, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos corresponde a, es decir, consiste en, la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 37 (en el caso de Rendomab-B49).

20 Como alternativa (en el caso de Rendomab-B41), el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos corresponde a, es decir, consiste en, la siguiente secuencia de aminoácidos:

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS**Q**SIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK

VFNRFSGV**P**DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYY**CFQ**G**S**H**V**PL**T**FGAG**T**KLELKR (SEQ ID NO: 39).

25 En otra alternativa (en el caso de Rendomab-B36), el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos corresponde a, es decir, consiste en, la siguiente secuencia de aminoácidos:

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS**Q**NIVHSNGYTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK

VSNRFGV**P**DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYY**CFQ**G**S**H**V**PL**T**FGSG**T**KLEIKR (SEQ ID NO: 41).

35 Ventajosamente, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada tal como se ha definido previamente.

La cadena ligera del anticuerpo de acuerdo con la invención es normalmente una cadena ligera kappa.

40 La cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la invención es en particular una cadena pesada gamma 1 o una cadena pesada gamma 3.

En particular, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención es una inmunoglobulina de tipo G.

Más particularmente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención es una inmunoglobulina de tipo IgG1/kappa o tipo IgG3 kappa.

45 El anticuerpo dirigido contra el receptor de endotelina subtipo B, que es la materia objeto de la presente invención, se une selectivamente a segmentos extracelulares del ETB-R. Por "anticuerpo que se une selectivamente a" al menos un dominio o región especificada del ETB-R, en particular del ETB-R humano, se entiende, dentro del alcance de la presente invención, un anticuerpo que se une al dominio o dominios específicos con mayor afinidad que cualquier otra

región de ETB-R. Ventajosamente, el anticuerpo se une al dominio o dominios específicos del ETB-R con una afinidad al menos 2, o al menos 5, o al menos 10, o al menos 50 veces mayor que la que presenta para cualquier otra región del ETB-R. Esta unión se puede determinar mediante procesos bien conocidos en el campo, tales como citometría de flujo, radioinmunoensayo (RIA), microscopia confocal, marcaje de inmunoensayo enzimático (EIA) revelando directa o indirectamente el anticuerpo que se va a ensayar (ELISA).

El anticuerpo que es la materia objeto de la presente invención puede obtenerse de un animal inmunizado contra el receptor de endotelina subtipo B o contra un fragmento de este receptor que comprende el epítipo o epítipos reconocidos por el anticuerpo de acuerdo con la presente invención. El animal inmunizado puede ser cualquier animal que se utilice habitualmente para producir un anticuerpo tal como un ratón, rata, conejo, cabra, perro, caballo o camélido tal como un camello o lama.

El anticuerpo que es la materia objeto de la presente invención también se puede obtener a partir de bibliotecas recombinantes sin tratar (scFv, Fab, etc.) expresadas en la superficie de virus, fagos, bacterias, levaduras u otras células eucariotas, estando estas bibliotecas construidas a partir de inmunoglobulinas de diferentes animales inmunizados como se ha divulgado anteriormente.

El anticuerpo obtenido de este modo puede purificarse en una columna de afinidad en la que se ha inmovilizado previamente el receptor de endotelina subtipo B o una de las secuencias reconocidas específicamente por el anticuerpo de acuerdo con la invención. Esta purificación también puede implicar una cromatografía de afinidad de proteína A.

Dentro del alcance de la presente invención, el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal poliespecífico o monoespecífico, o un anticuerpo monoclonal.

Ventajosamente, el anticuerpo de la presente invención es monoclonal. Un "anticuerpo monoclonal" se refiere, por definición habitual en inmunología, a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, una población de anticuerpos idénticos, y una cantidad relativamente baja de los mismos puede tener posiblemente una mutación. Se obtiene un anticuerpo monoclonal a partir de la proliferación de un solo clon de células, tal como un hibridoma.

Más particularmente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención es el anticuerpo monoclonal murino obtenido de un hibridoma elegido del hibridoma depositado en la CNCM el 19 de mayo de 2016 con el número de acceso CNCM I 5084 (Rendomab-B49), el hibridoma depositado en la CNCM el 7 de junio de 2016 con el número de acceso CNCM 1-5104 (Rendomab-B41) y el hibridoma depositado en la CNCM el 7 de junio de 2016 con el número de acceso CNCM 1-5103 (Rendomab-B36). La presente invención también se refiere a tales hibridomas.

Como alternativa, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede ser un anticuerpo quimérico, es decir, un anticuerpo que contiene regiones variables o regiones hipervariables de una o más cadenas pesadas y ligeras derivadas de un anticuerpo de una especie dada en combinación con las regiones constantes de una o más cadenas pesadas y ligeras derivadas de un anticuerpo de otra especie heteróloga a la anterior.

Una primera alternativa de la presente invención corresponde a un anticuerpo quimerizado y, en particular, a un anticuerpo monoclonal quimerizado, que es un anticuerpo cuyos dominios variables del anticuerpo murino descritos anteriormente están asociados con dominios constantes de origen humano. Debe recordarse que varios anticuerpos terapéuticos en uso en seres humanos son anticuerpos quimerizados.

Una segunda alternativa particularmente interesante puede ser un anticuerpo humanizado y, en particular, un anticuerpo monoclonal humanizado. De hecho, es preferible utilizar un anticuerpo humanizado, si este último debe administrarse repetidamente a un sujeto humano.

En el caso de un anticuerpo monoclonal humanizado de acuerdo con la presente invención, este último podría prepararse insertando CDR de un anticuerpo murino y, en particular, el anticuerpo murino de un hibridoma elegido del hibridoma depositado en la CNCM el 19 de mayo de 2016 con el número de acceso CNCM I-5084 (Rendomab-B49), el hibridoma depositado en la CNCM el 7 de junio de 2016 con el número de acceso CNCM 1-5104 (Rendomab-B41) y el hibridoma depositado en la CNCM el 7 de junio de 2016 con el número de acceso CNCM 1-5103 (Rendomab-B36), en un anticuerpo humano, independientemente de su isotipo (IgG, IgA, IgM). Los anticuerpos humanizados pueden prepararse usando técnicas y enfoques descritos en Verhoeyen et al., 1988 ("Reshaping human antibodies: Grafting an antilysozyme activity", Science, vol. 239, páginas 1534-1536) y en la patente de EE.UU. 4.816.567 en nombre de Genentech y publicada el 28 de marzo de 1989.

Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos humanos porque tienen la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos anti-ETB-R humano a través de procesos de preparación conocidos en el campo que no requieren vacunación humana. Por ejemplo, dichos anticuerpos pueden obtenerse mediante inmunización genética/refuerzos de inmunización celular de ratones transgénicos que están disponibles y que contienen en esencia genes de inmunoglobulina humana (véase Vaughan et al., 1998, "Human antibodies by design", Nature Biotechnol. vol. 16,

páginas 535-539). Como alternativa, dichos anticuerpos pueden obtenerse clonando ADNc que codifican linfocitos B humanos dirigidos contra ETB-R.

5 La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados elegidos de los diferentes polinucleótidos en lo sucesivo en el presente documento:

- α) un polinucleótido que codifica un anticuerpo como se ha definido previamente;
- β) un polinucleótido complementario del polinucleótido como se ha definido en (α) (no forma parte de la presente invención);
- 10 γ) un polinucleótido de al menos 18 nucleótidos, capaz de hibridar en condiciones de alta rigurosidad con los polinucleótidos como se ha definido en (α) y (β) (no forma parte de la presente invención).

15 Por "polinucleótido" se entiende, dentro del alcance de la presente invención, un ácido nucleico, una secuencia nucleica, una secuencia de ácido nucleico, un oligonucleótido, una secuencia polinucleotídica, una secuencia de nucleótidos, un ADN monocatenario, un ADN bicatenario o un ARN. Un polinucleótido de acuerdo con la presente invención puede comprender nucleótidos naturales y nucleótidos no naturales.

20 El polinucleótido de acuerdo con la invención no corresponde a una secuencia de nucleótidos en su estado natural, es decir, en su entorno cromosómico natural. Por el contrario, el polinucleótido de acuerdo con la invención se ha aislado y posiblemente purificado, en consecuencia, se ha modificado su entorno. El polinucleótido de acuerdo con la invención también se puede obtener mediante recombinación genética o síntesis química.

25 Las condiciones de alta rigurosidad corresponden a las condiciones de temperatura y fuerza iónica que permiten mantener una hibridación entre dos secuencias de nucleótidos complementarias. Los expertos en la técnica podrán determinar las condiciones de alta rigurosidad más adecuadas, en particular dependiendo del tamaño de las secuencias de nucleótidos, haciendo referencia a las enseñanzas de Sambrook et al., 1989 (Molecular cloning, Noland C. ed., Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

30 El polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica la CDR_{1H} elegida de las siguientes secuencias de nucleótidos:

GGC TAC ACC TTC ATC AGC TAC TGG (SEQ ID NO: 4) y
 GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC TGG (SEQ ID NO: 6).

35 Ventajosamente, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica la CDR_{2H} elegida de las siguientes secuencias de nucleótidos:

ATT GAT CCT GAT AGN₁ GGT GGT ACT, representando N₁ C o T (SEQ ID NO: 9) y
 ATT GAT CCT AAT AGT GGT GGC ACT (SEQ ID NO: 11).

40 Más ventajosamente, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica la CDR_{3H} elegida de las siguientes secuencias de nucleótidos:

45 GCA AGA GAA GGG GAT TAC GCC TGG TTT GCT TAC (SEQ ID NO: 14);
 GTA AGA GAA GGG TGG GAC GCC TGG TTT GTT TAC (SEQ ID NO: 16) y
 GCA AGA GAG GGG GAA TTC GCC TGG TTT GCT TAC (SEQ ID NO: 18).

50 Normalmente, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica la CDR_{1L} elegida de las siguientes secuencias de nucleótidos:

CAG AGC ATT GTA CAT AGT AAT GGA AAC ACC TAT (SEQ ID NO: 21) y
 CAG AAC ATT GTC CAT AGT AAT GGA TAC ACC TAT (SEQ ID NO: 23).

55 En particular, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica la CDR_{2L} elegida de las siguientes secuencias de nucleótidos:

AAA GTTTCC y
 AAA GTT TTC.

60 Más particularmente, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica la CDR_{3L} elegida de las siguientes secuencias de nucleótidos:

TTT CAA GGTTCA CAT GTT CCG TGG ACG (SEQ ID NO: 26) y
 TTT CAA GGT TCA CAT GTT CCN₂ CTC ACG, representando N₂ G o T (SEQ ID NO: 28).

65 Ventajosamente, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos tres secuencias de

nucleótidos correspondientes a uno de los siguientes grupos:

- (i₁') las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, representando N₁ C y SEQ ID NO: 14;
- 5 (ii₁') las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, representando N₁ T y SEQ ID NO: 16; y
- (iii₁') las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 11, representando N₁ T y SEQ ID NO: 18.

Está claro que, para cada uno de los grupos, las tres secuencias enumeradas anteriormente tienen que organizarse entre sí de manera que el polipéptido obtenido al final de la traducción del polinucleótido de acuerdo con la invención comprenda 3 secuencias peptídicas correspondientes a CDR_{1H}, CDR_{2H} y CDR_{3H}.

10 Más particularmente, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la siguiente secuencia de nucleótidos:

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGCGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAG
 TGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCT**GGCTACACCTTCATCAGCTACTGGATGCTCTGGGTGAAGCAG**
 AGGCCTGGACGAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGGATT**GATCCTGATAGCGGTGGTACTAAGTAC**
 AATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCA
 GCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGT**GCAAGAGAAGGGGATTACGCC**
 15 **TGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCCCTGTCTCTGCA** (SEQ ID NO: 30).

Por lo tanto, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad y puede presentar al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, o incluso al menos un 90 % de identidad con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 30.

20 Además, más particularmente, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 30 (en el caso de Rendomab-B49). Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada de Rendomab-B49 comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 30.

25 Como alternativa (en el caso de Rendomab-B41), el polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende la siguiente secuencia de nucleótidos:

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCA
 GTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCT**GGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCA**
 GAGGCCTGGACGAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGGATT**GATCCTGATAGTGGTGGTACTAAATAC**
 AATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAACCCTCCAACACAGCCAACATGC
 AGCTCAGCAGCCTGACATCTGAAGACTCTGCGGTCTATTATTGT**GTAAGAGAAGGGTGGGACGC**
 30 **CTGGTTTGTTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGCTCACTGTCTCTGCA** (SEQ ID NO: 32).

Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada de Rendomab-B41 comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 32.

35 En otra alternativa (en el caso de Rendomab-B36), el polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende la siguiente secuencia de nucleótidos:

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAG
 TGAAGCTGTCTGCAAGGCTTCT**GGCTACACCTTACCAGCTACTGG**GATACACTGGGTAAATCAG
 AGGCCTGGACGAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGG**ATTGATCCTAATAGTGGTGGCACTA**AGTACA
 ATGAGAAGTTCAAGAGTAAGGCCACACTGACTGTAGACAAAACCTCCAGCACAGCCTACATGCA
 GTTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGT**GCAAGAGAGGGGGAATTGCGC**
TGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 34).

Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada de Rendomab-B36 comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 34.

5 Ventajosamente, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos tres secuencias de nucleótidos correspondientes a uno de los siguientes grupos:

- 10 (i₂') las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 21, AAAGTTTCC y SEQ ID NO: 26;
- (ii₂') las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 21, AAAGTTTCC y SEQ ID NO: 28, representando N₂ G; y (iii₂') las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 23, AAAGTTTCC y SEQ ID NO: 28, representando N₂ T.

15 Está claro que, para cada uno de los grupos, las tres secuencias enumeradas anteriormente tienen que organizarse entre sí de manera que el polipéptido obtenido al final de la traducción del polinucleótido de acuerdo con la invención comprenda 3 secuencias peptídicas correspondientes a CDR1_L, CDR2_L y CDR3_L.

Más particularmente, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la siguiente secuencia de nucleótidos:

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
 AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT**CAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTT**AGAAT
 GGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACA**AAAGTTTCCA**ACCGATTTTCTG
 GGGTCCCAGACAGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGT
 GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTT**CAAGTTCACATGTTCCGTGGACGTT**CGGTG
 20 GAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 36).

25 Por lo tanto, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos una secuencia de nucleótidos que presenta al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 % o incluso al menos un 95 % de identidad con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 36.

30 Además, más particularmente, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 36 (en el caso de Rendomab-B49). Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera de Rendomab-B49 comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 36.

35 Como alternativa (en el caso de Rendomab-B41), el polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende la siguiente secuencia de nucleótidos:

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGT CAGTCTTGGAGATCA
 AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT**CAGAGCATTGTACATAGTAATGGAACACCTATTTAGAAT**
 GGTACTTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTAC**AAAGTTTTCAACCGATTTTCTG**
 GGGTCCCAGACAGGTT CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTT CACTCAAGATCAGCAGAGT
 GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTT**CAAGGTTACATGTTCCGCTCACGTT**CGGTG
 CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG (SEQ ID NO: 38).

Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera de Rendomab-B41 comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 38.

5 En otra alternativa (en el caso de Rendomab-B36), el polinucleótido de acuerdo con la presente invención comprende la siguiente secuencia de nucleótidos:

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGT CAGTCTTGGAGATCA
 AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT**CAGAACATTGTCCATAGTAATGGATACACCTATTTAGAAT**
 GGTACTTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTAC**AAAGTTTTCAACCGATTTTCTG**
 GGGTCCCAGACAGGTT CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTT CACTCAAGATCAGCAGAGT
 GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTT**CAAGGTTACATGTTCTCTCACGTT**CGGCT
 CGGGGACAAAGTTGAAATAAAACGG (SEQ ID NO: 40).

10 Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera de Rendomab-B36 comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 40.

15 Por "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos (o entre dos secuencias de nucleótidos), se entiende, dentro del alcance de la presente invención, un porcentaje de residuos de aminoácidos (o nucleótidos) idénticos entre las dos secuencias que se comparan, obteniéndose este porcentaje después de implementar el mejor alineamiento (alineamiento óptimo) entre ambas secuencias. Los expertos en la técnica conocen diferentes técnicas que permiten obtener dicho porcentaje de identidad y que implican algoritmos de homología o programas informáticos tal como el programa BLAST.

20 El porcentaje de identidad es estadístico y las diferencias entre ambas secuencias se distribuyen aleatoriamente a lo largo de estas secuencias. Las diferencias entre ambas secuencias pueden consistir en diferentes tipos de modificación de las secuencias: deleciones, sustituciones o adiciones de residuos de aminoácidos (o nucleótidos).

25 En una primera realización, las modificaciones implementadas en las secuencias dan como resultado sustituciones entre aminoácidos equivalentes, es decir, aminoácidos que tienen homologías estructurales o que no modifican sustancialmente la actividad biológica de los anticuerpos correspondientes.

30 En una segunda realización, las modificaciones implementadas en las secuencias dan como resultado sustituciones por aminoácidos no equivalentes, es decir, aminoácidos que no tienen una homología estructural. Es probable que estas modificaciones mejoren las propiedades biológicas del anticuerpo, es decir, mejor afinidad y/o especificidad, amplio espectro de reconocimiento, aumento de la estabilidad, reducción de la inmunogenicidad, etc.

35 Cuando se aplican a las dos realizaciones expuestas anteriormente, estas modificaciones, inserciones o deleciones pueden dirigirse a una CDR, que sea esencial o no, para las propiedades del anticuerpo de acuerdo con la invención.

40 Cuando se aplican a las dos realizaciones expuestas anteriormente, estas modificaciones, inserciones o deleciones también pueden dirigirse a una región FR, dado que dichas regiones, dentro de los dominios variables de los anticuerpos, también pueden desempeñar, dependiendo de los anticuerpos, un papel en la expresión de las propiedades del anticuerpo de acuerdo con la invención.

La presente invención también se refiere a un vector de clonación y/o expresión que contiene al menos un polinucleótido de acuerdo con la presente invención. Un vector de este tipo es particularmente útil para transformar un

organismo huésped y expresar en este último un anticuerpo de acuerdo con la presente invención.

El vector de acuerdo con la presente invención comprende además uno (o más) elementos que permiten que se exprese el polinucleótido de acuerdo con la presente invención y/o se secrete el producto resultante de la traducción del polinucleótido de acuerdo con la presente invención. Entre estos elementos, se pueden mencionar un constituyente o promotor inducible, una señal de inicio de la transcripción o una señal de terminación de la transcripción, una secuencia de inicio de la traducción o una señal de terminación de la traducción.

Ventajosamente, el vector de acuerdo con la presente invención comprende un promotor, un polinucleótido de la invención y un elemento terminador que están unidos operativamente entre sí. Por "unidos operativamente entre sí", de acuerdo con la invención, se entiende elementos unidos entre sí de manera que el funcionamiento de uno de los elementos se vea afectado por el de otro. A modo de ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante cuando es capaz de afectar a la expresión de la misma. Los elementos reguladores de la transcripción, traducción y maduración de péptidos que puede comprender el vector son conocidos por los expertos en la técnica que son capaces de elegirlos dependiendo del organismo huésped en el que deba realizarse la expresión o clonación.

El vector de acuerdo con la presente invención se elige ventajosamente de un plásmido, un cósmido, un bacteriófago y un virus tal como un baculovirus. En particular, el vector de la invención es un vector de replicación autónoma que incluye elementos que le permiten mantenerse y replicarse en el organismo huésped como origen de replicación. Además, el vector puede incluir elementos que le permitan seleccionarse en el organismo huésped como, por ejemplo, un gen resistente a antibióticos o un gen de selección que asegure la complementación con el gen respectivo eliminado en el genoma del organismo huésped. Dichos vectores de clonación y/o expresión se conocen bien por los expertos en la técnica y se describen ampliamente en la bibliografía.

La invención también se refiere a un organismo huésped transformado por o que comprende un polinucleótido de acuerdo con la presente invención o un vector de acuerdo con la presente invención.

Por "organismo huésped" se entiende cualquier organismo aislado, unicelular o multicelular, inferior o superior, en el que se introduce un polinucleótido de la invención para producir un anticuerpo de acuerdo con la presente invención.

Los expertos en la técnica conocen diferentes métodos para introducir eficazmente un polinucleótido en un organismo huésped con el fin de producir el anticuerpo codificado por dicho polinucleótido en el organismo huésped. A modo de ejemplo y de forma no exhaustiva, este método puede ser una electroporación, lipofección, transformación biológica de una planta usando *Agrobacterium tumefaciens*, un choque térmico o un proceso químico.

El organismo huésped es un microorganismo tal como una levadura, una bacteria o un hongo. La transformación de dichos microorganismos permite producir el anticuerpo de la invención a escala semiindustrial o industrial.

Como alternativa, el organismo huésped es una célula animal, tal como una célula de mamífero, célula vegetal, célula de insecto o una planta.

Dichos organismos huésped pueden usarse para producir un anticuerpo de acuerdo con la presente invención. De hecho, un proceso para producir un anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende las siguientes etapas de:

- a) cultivar un organismo huésped de acuerdo con la presente invención y, en particular, un organismo huésped unicelular en un medio de cultivo y en condiciones apropiadas;
- b) recuperar dicho anticuerpo del medio de cultivo de dicho organismo huésped cultivado o a partir de dicho organismo huésped cultivado.

El anticuerpo de acuerdo con la presente invención también es modificable para i) generar un anticuerpo marcado por un isótopo radiactivo, por un profármaco, una enzima o una toxina, y ii) modificar la especificidad y/o afinidad de unión, y/o la estabilidad y/o la inmunogenicidad de dicho anticuerpo asegurando el direccionamiento de las células que sobreexpresan ETB-R, en particular, células cancerosas tales como melanomas, glioblastomas, etc.

El anticuerpo de acuerdo con la presente invención también es modificable para acoplarlo química o genéticamente a una molécula peptídica; una molécula proteica; una molécula nucleica tal como un ADN, un ARN, un ARNi, un aptámero, un PNA o un LNA; una molécula lipídica; una molécula de carbohidrato o una molécula química.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un compuesto que comprende un anticuerpo de acuerdo con la presente invención conjugado con un elemento elegido del grupo que consiste en un grupo citotóxico, un grupo fácilmente detectable o un grupo efector.

Por "grupo citotóxico" se entiende un grupo directa o indirectamente tóxico para las células diana por el anticuerpo de acuerdo con la presente invención. Por "directamente citotóxico" se entiende un grupo que es citotóxico por sí solo. Por "indirectamente citotóxico" se entiende un grupo que, aunque no es citotóxico por sí solo, puede inducir una

citotoxicidad, por ejemplo, por su acción sobre otra molécula o por una acción adicional sobre sí mismo.

5 En una primera forma de implementación, el grupo citotóxico es un agente quimioterapéutico citotóxico. Los expertos en la técnica conocen diferentes agentes quimioterapéuticos citotóxicos utilizables dentro del alcance de la presente invención. La actividad de estos agentes se puede aumentar bajo irradiación. A modo de ejemplos ilustrativos y no limitantes, se pueden mencionar agentes alquilantes tales como mecloretamina o clorambucilo; metotrexato; 5-fluorouracilo; vinblastina; gemcitabina; fludarabina; nicotinamida; doxorubicina; mitomicina; L-asparaginasa; cisplatino; taxol y análogos/derivados del mismo.

10 En una segunda forma de implementación, el grupo citotóxico es un grupo (poli)peptídico citotóxico tal como ricina, abrina, exotoxina de *Pseudomonas*, TNF α e interleucina 2.

15 En una tercera forma de implementación, el grupo citotóxico es un agente quimioterapéutico indirectamente citotóxico. Un agente de este tipo, también llamado profármaco, es poco o no citotóxico como tal, pero puede dar, en particular después de una reacción enzimática o una irradiación, una sustancia citotóxica (o fármaco), en particular como se define en la primera forma de implementación. A modo de ejemplos ilustrativos y no limitantes, se pueden mencionar metotrexato-alanina; fosfato de mitomicina, 5-fluorocitosina; fotofrina y capecitabina.

20 En una cuarta forma de implementación, el grupo citotóxico es un grupo (poli)peptídico indirectamente citotóxico. Por grupo polipeptídico indirectamente citotóxico se entiende un péptido o polipéptido que presenta una actividad enzimática y puede convertir un profármaco relativamente no tóxico, en particular como se define en la tercera forma de implementación, en una sustancia citotóxica, en particular como se define en la primera forma de implementación. Entre dichos grupos (poli)peptídicos indirectamente citotóxicos, se pueden mencionar una peptidasa, tal como una carboxipeptidasa, aminopeptidasa o endopeptidasa; una fosfatasa; una sulfatasa; una amidasa; una cinasa; una glucosidasa; una desaminasa; una reductasa; y una oxidasa.

En una quinta forma de implementación, el grupo citotóxico es una molécula de ácido nucleico que es directa o indirectamente citotóxica, tal como un oligonucleótido antisentido o un aptámero.

30 Los expertos en la técnica conocen diferentes técnicas que permiten conjugar dichos grupos con un anticuerpo de acuerdo con la presente invención una vez obtenido o producido este último.

35 Estas técnicas permiten un acoplamiento covalente entre un anticuerpo de acuerdo con la invención y un grupo citotóxico aprovechando grupos químicos particulares portados por el anticuerpo de acuerdo con la invención y por el grupo citotóxico. Entre estos grupos químicos particulares, se pueden mencionar un grupo tiol, un grupo éster, un grupo amino, un grupo ácido y cualquier elemento químico que pueda implementarse en la "química clic".

40 Como alternativa, y en particular cuando el grupo citotóxico es un grupo de naturaleza peptídica, esta conjugación puede consistir en producir el compuesto de acuerdo con la invención como un compuesto de fusión mediante técnicas de recombinación genética, en la que un polinucleótido comprende las respectivas regiones que codifican el anticuerpo de acuerdo con la presente invención y el grupo citotóxico, que son adyacentes entre sí, yuxtapuestas o separadas por una región que codifica un enlazador peptídico que no destruye las propiedades deseadas del compuesto híbrido final.

45 Independientemente de la técnica utilizada para conjugar un anticuerpo de acuerdo con la presente invención con un grupo citotóxico, el único requisito a cumplir dentro del alcance de esta conjugación es que el anticuerpo conjugado conserve su especificidad de unión a ETB-R y su ausencia de propiedad antagonista, cuyas propiedades se asocian a las del grupo citotóxico.

50 Por "grupo fácilmente detectable" se entiende, dentro del alcance de la presente invención, un grupo que puede detectarse implementando una técnica de detección apropiada ventajosamente no invasiva tal como microscopía, gammagrafía, tomografía por emisión de positrones (PET) e imágenes por resonancia magnética (IRM). Un compuesto de acuerdo con la invención que comprende tal grupo fácilmente detectable es particularmente adecuado para el campo de la imagenología y el diagnóstico. En particular, permite identificar y localizar sitios en los que se sobreexpresa ETB-R debido a la especificidad de unión a ETB-R del anticuerpo de acuerdo con la invención presente en este compuesto.

60 En una primera forma de implementación, el grupo fácilmente detectable puede ser una enzima o una molécula capaz de generar una señal detectable y posiblemente cuantificable en condiciones particulares, tal como cuando se pone en contacto con un sustrato adaptado. A modo de ejemplos ilustrativos y no limitantes, pueden mencionarse biotina, digoxigenina, 5-bromodesoxiuridina, una fosfatasa alcalina, una peroxidasa, una acetilcolina esterasa (AChE), una glucosa amilasa y una lisozima.

65 En una segunda forma de implementación, el grupo fácilmente detectable puede ser un marcador fluorescente, quimiofluorescente o bioluminiscente, tal como fluoresceína y derivados de la misma, rodamina y derivados de la misma, GFP (proteína verde fluorescente) y derivados de la misma y umbeliferona; luminol; luciferasa y luciferina.

En una tercera forma de implementación, el grupo fácilmente detectable puede ser un marcador o isótopo radiactivo

tal como yodo-123, yodo-125, yodo-126, yodo-133, indio-111, indio-113m, bromo-77, galio-67, galio-68, rutenio-95, rutenio-97, tecnecio-99m, flúor-19, flúor-18, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, escandio-47, telurio-122m, tulio-165 e itrio-199. Debe observarse que algunos átomos radiactivos utilizados como grupos fácilmente detectables también pueden ser grupos citotóxicos debido a la cantidad de radiactividad que pueden liberar.

5 Todo lo explicado previamente para la conjugación del anticuerpo de acuerdo con la invención con grupos citotóxicos es aplicable *mutatis mutandis* a la conjugación del anticuerpo de acuerdo con la invención con los grupos fácilmente detectables. La conjugación del anticuerpo de acuerdo con la invención con los grupos fácilmente detectables también puede realizarse en relación con nanoobjetos, para densificar la concentración del mismo y así mejorar la señal emitida, el contraste o la toxicidad.

15 En caso de que este grupo fácilmente detectable sea un marcador radiactivo, este último puede introducirse en la secuencia peptídica del anticuerpo de acuerdo con la invención. Esta introducción puede tener lugar durante la síntesis del anticuerpo utilizando uno o más aminoácidos marcados. Como alternativa, esta introducción puede tener lugar después de esta síntesis uniendo el marcador radiactivo a los residuos de la secuencia peptídica del anticuerpo sintetizado. Por ejemplo, el itrio-90 se puede unir mediante un residuo de lisina. Además, como alternativa, el marcador radiactivo se puede unir indirectamente al anticuerpo por medios conocidos. Por ejemplo, puede unirse EDTA u otro agente quelante al anticuerpo de acuerdo con la invención y usarse para unir indio-111.

20 La presente invención se refiere al uso de un compuesto que comprende un anticuerpo y un grupo fácilmente detectable como una herramienta de diagnóstico, pronóstico y seguimiento *in vivo* muy eficaz en términos de imagenología médica. El formato del anticuerpo se elige para generar la mejor relación señal/ruido y la mejor farmacocinética.

25 En otras palabras, la presente invención se refiere a un proceso para detectar y cuantificar *in vivo* o *in vitro* la expresión o sobreexpresión del receptor de endotelina subtipo B, que consiste en:

- 30 a₁) poner en contacto una muestra biológica con un compuesto de acuerdo con la presente invención;
b₁) detectar el posible complejo entre dicho compuesto y dicho receptor de endotelina subtipo B.

Tal proceso se puede implementar para detectar, diagnosticar, pronosticar o hacer un seguimiento de un estado en el que el receptor de endotelina subtipo B está sobreexpresado y, en particular, para detectar, diagnosticar, pronosticar o hacer un seguimiento de un estado de cáncer (presencia, tamaño y evolución de los tumores cancerosos). En el caso de un proceso para diagnosticar un cáncer tal como un glioblastoma, este último comprende las etapas de:

- 35 a₁') poner en contacto una muestra biológica del sujeto con un compuesto de acuerdo con la presente invención;
b₁') detectar la señal emitida por el grupo fácilmente detectable y
c₁') determinar la presencia o ausencia de un cáncer en dicho sujeto basándose en la señal detectada en la etapa (b₁').

40 En una realización particular, el proceso de diagnóstico de acuerdo con la invención es un proceso realizado *in vitro* para el que se ha tomado la muestra biológica, tal como una biopsia del sujeto, antes de implementar la etapa (a₁'). Como alternativa, este proceso puede corresponder a un proceso de imagenología *in vivo* en el que se ha administrado de antemano al sujeto una cantidad eficaz del compuesto de acuerdo con la invención. Por "cantidad eficaz" se entiende una cantidad del compuesto de acuerdo con la presente invención que es suficiente para la imagenología de un cáncer. Esta cantidad varía en función del modo de administración, la formulación administrada, el excipiente y el cáncer a diagnosticar. Sin embargo, determinar esta cantidad eficaz es un trabajo de rutina para los expertos en la técnica.

50 Por "grupo efector" se entiende, dentro del alcance de la presente invención, un grupo capaz de reconocer específicamente un marcador de cáncer, o que permita reclutar (i) una célula efectora del sistema inmunitario, es decir, linfocitos NK, linfocitos T citotóxicos, macrófagos o (ii) el sistema del complemento. Por "grupo capaz de reconocer específicamente un marcador de cáncer" se entiende, dentro del alcance de la presente invención, un ligando de un marcador de cáncer; un anticuerpo idéntico o diferente del anticuerpo de acuerdo con la presente invención; una proteína; un péptido; o una molécula nucleica tal como un ADN, un ARN, un ARNi, un aptámero, un PNA o un LNA. Por "etiqueta de cáncer" se contemplan tanto un ETB-R como otro marcador de membrana.

60 En una primera forma de implementación, el grupo efector reconoce un marcador de cáncer que se expresa, idéntico o diferente de ETB-R, en la superficie de las células cancerosas, lo que garantiza de este modo una mejor especificidad de reconocimiento y, por lo tanto, un mayor direccionamiento de las células cancerosas.

En una segunda forma de implementación, el grupo efector presenta una especificidad de reconocimiento para un marcador presente específicamente en la superficie de las células efectoras del sistema inmunitario, es decir, linfocitos NK, macrófagos o linfocitos T citotóxicos. Tal reclutamiento asegura la lisis dirigida de las células cancerosas reconocidas por el anticuerpo de la presente invención.

65 En una tercera forma de implementación, el grupo efector tiene una especificidad de reconocimiento para el sistema del complemento y, en particular, para la proteína C1 o su forma truncada C1q, que inicia la cascada de

eventos moleculares que dan como resultado la muerte de la célula diana. Tal reclutamiento asegura la lisis dirigida de las células cancerosas reconocidas por el anticuerpo de la presente invención.

5 En una cuarta forma de implementación, el grupo efector presenta una especificidad de reconocimiento para el sistema del complemento y, en particular, para la proteína C3 o su forma truncada C3b, asegurando así el reclutamiento de las células efectoras del sistema inmunitario, cuyas células inducen la muerte de las células diana. Tal reclutamiento asegura la lisis dirigida de las células cancerosas reconocidas por el anticuerpo de la presente invención.

10 La presente invención se refiere a un anticuerpo de acuerdo con la presente invención, un polinucleótido de acuerdo con la presente invención o un compuesto de acuerdo con la presente invención para su uso como medicamento farmacéutico.

15 Por lo tanto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, un anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o un polinucleótido de acuerdo con la presente invención o un compuesto de acuerdo con la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Por "vehículo farmacéuticamente aceptable" se entiende, de acuerdo con la presente invención, cualquier sustancia que se añada a un anticuerpo, polinucleótido o compuesto de acuerdo con la presente invención para promover su transporte, evitar su degradación sustancial en dicha composición y/o aumentar su semivida. Ventajosamente, tal vehículo farmacéuticamente aceptable es estéril y apirógeno. Se elige en función del tipo de aplicación de la composición farmacéutica de la invención y, en particular, en función de su modo de administración.

25 Por lo tanto, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención consiste en al menos un anticuerpo, o polinucleótido o compuesto de acuerdo con la presente invención en forma libre o en forma de sal de adición con un ácido farmacéuticamente aceptable, en estado puro o en forma de una composición en la que se asocia con cualquier otro producto farmacéuticamente compatible. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden emplearse por vía sistémica; por vía parenteral, por ejemplo, vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea; por vía tópica; por vía oral; por vía rectal; por vía intranasal o por inhalación.

30 Como composiciones sólidas para administración oral, se pueden usar comprimidos, píldoras, polvos, etc., donde el anticuerpo, polinucleótido o compuesto de acuerdo con la invención se mezcla con uno o más diluyentes inertes usados convencionalmente, y posiblemente otras sustancias tales como, por ejemplo, un lubricante, un colorante, un recubrimiento, etc.

35 Como composiciones líquidas para administración oral u ocular se pueden usar suspensiones, soluciones, emulsiones, jarabes farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes usados convencionalmente y posiblemente otras sustancias tales como productos humectantes, edulcorantes, espesantes, etc.

40 Las composiciones estériles para administración parenteral pueden ser soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones o emulsiones. Como disolvente o vehículo, se pueden utilizar agua, propilenglicol, aceites vegetales u otros disolventes orgánicos adecuados. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como agentes humectantes, isotonzantes, emulsionantes, etc.

45 Las composiciones para administración tópica pueden ser, por ejemplo, cremas, lociones, pulverizaciones orales, gotas para la nariz o los ojos o aerosoles.

50 El nivel de dosis diaria del anticuerpo, polinucleótido o compuesto de acuerdo con la presente invención es habitualmente de 1 a 1000 mg por adulto (es decir, aproximadamente 0,015 a 15 mg/kg), administrado en dosis únicas o fraccionadas. Estas dosis se dan únicamente a modo de ilustración. El médico, en cualquier caso, podrá determinar la dosis real más adecuada para un paciente individual dado y esta dosis varía dependiendo de la edad, el peso y la respuesta del paciente.

55 La presente invención se refiere a un anticuerpo de acuerdo con la presente invención, un polinucleótido de acuerdo con la presente invención, un compuesto de acuerdo con la presente invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno o afección que implica una disfunción, directa o en asociación con otra vía fisiológica, del eje que comprende una endotelina y al menos uno de sus receptores tal como, en particular, el receptor de endotelina subtipo B.

60 Tal trastorno o tal condición es un cáncer. Como cánceres, se pueden mencionar un melanoma, cáncer de colon, sarcoma de Kaposi, glioblastoma, cáncer de ovario y cáncer de vejiga. Normalmente, este trastorno es un melanoma o un glioblastoma.

65 Aún en otras palabras, la presente invención se refiere a un proceso para tratar y/o prevenir un trastorno o una afección que implica una disfunción, directa o en asociación con otra vía fisiológica, del eje que comprende una endotelina y al menos uno de sus receptores tal como, en particular, el receptor de endotelina subtipo B en un paciente que tiene o

es probable que tenga tal trastorno o tal afección. Este proceso consiste en administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención, un polinucleótido de acuerdo con la presente invención, un compuesto de acuerdo con la presente invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

5 Finalmente, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención o un compuesto de acuerdo con la presente invención como herramienta de investigación particularmente adecuada para investigar las vías de señalización asociadas con el eje de la endotelina/receptores de endotelina, así como para avanzar en la comprensión de las características estructurales y funcionales de esta familia de receptores.

10 Las características y ventajas adicionales de la presente invención aparecerán mejor para los expertos en la técnica tras la lectura de los ejemplos dados a continuación a modo de ilustración y con fines no limitativos, en referencia a las figuras adjuntas.

15 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 muestra las curvas de unión de Rendomab-B49 (figura 1A), Rendomab-B41 (figura 1B) y Rendomab-B36 (figura 1C) en células CHO que sobreexpresan ETB-R con (cuadrados) o sin (puntos) preincubación de la células en presencia de 300 nM de endotelina 1. En ambos casos, se ha medido una afinidad del orden de un nanomol.

20 La figura 2 muestra imágenes obtenidas con microscopía confocal de neuroesferas de una biopsia de un paciente con un glioblastoma de alto grado en presencia de 1 µg/ml de Rendomab-B1 marcado (figura 2A) o 1 µg/ml de Rendomab-B49 marcado (figura 2B). En la figura 2A solo se ven los núcleos de las células marcadas con DAPI.

25 La figura 3 muestra imágenes obtenidas con microscopía confocal de células tumorales de una biopsia de un paciente que tiene un glioblastoma de bajo grado en presencia de DAPI (figura 3A) o 1 µg/ml de Rendomab-B49 (figura 3B).

La figura 4 muestra imágenes obtenidas con microscopía confocal de células tumorales de una biopsia de un paciente que tiene un glioblastoma en presencia de 1 µg/ml de Rendomab-B36.

30 La figura 5 muestra las secuencias nucleicas deducidas en aminoácidos de los dominios variables de la cadena ligera (VL) (figura 5A) y la cadena pesada (VH) (figura 5B) del anticuerpo murino IgG1/kappa Rendomab-B49 específico del receptor de endotelina B.

La figura 6 muestra las secuencias nucleicas deducidas en aminoácidos de los dominios variables de la cadena ligera (VL) (figura 6A) y la cadena pesada (VH) (figura 6B) del anticuerpo murino IgG1/kappa Rendomab-B41 específico del receptor de endotelina B.

35 La figura 7 muestra las secuencias nucleicas deducidas en aminoácidos de los dominios variables de la cadena ligera (VL) (figura 7A) y la cadena pesada (VH) (figura 7B) del anticuerpo murino IgG3/kappa Rendomab-B36 específico del receptor de endotelina B.

40 La figura 8 muestra el mapeo epitópico. La figura 8A presenta la membrana "Pep scan" revelada. La figura 8B presenta las secuencias de los péptidos reconocidos por Rendomab-B49 con alta intensidad (péptidos C5, C6, C7, C8, C9 y C10). La figura 8C presenta la ubicación del epítipo reconocido por Rendomab-B49 en la secuencia del receptor de endotelina humano subtipo B.

Divulgación detallada de realizaciones particulares

45 **I. Materiales y métodos**

I.1. Inmunización

50 La estrategia denominada de "inmunización genética" desarrollada en el laboratorio de los inventores consiste en combinar inyecciones de ADN con refuerzos de proteínas como una inyección de células que sobreexpresan ETB-R (Allard et al., 2011, "Electroporation-aided DNA immunisation generates polyclonal antibodies against the native conformation of human endothelin B receptor", DNA and Cell Biology, vol. 30, páginas 727-737).

55 Brevemente, se realizaron tres inyecciones, en un músculo tibial de ratón, de 50 µg de ADN plasmídico pcDNA3/ETB-R, con una periodicidad de 14 días. A cada inyección de ADN le siguió una electroestimulación de acuerdo con las siguientes características: 8 pulsos cada vez de 20 ms, 80 voltios, 1 Hz. A continuación, se realizaron tres refuerzos de inmunización, mediante inyección por vía intraperitoneal de 2.10⁶ células COS que sobreexpresaban transitoriamente ETB-R.

60 Se sacrificaron los ratones con mejor respuesta para realizar la fusión celular de las células linfoides de sus bazos con el mieloma murino NS-1.

I.2. Cribado de hibridomas

65 Los hibridomas obtenidos se cribaron primero mediante ELISA en células CHO que expresaban de forma estable ETB-R, con, como control negativo, células CHO que expresaban el receptor irrelevante NK1 (CHO-WT).

A continuación, los hibridomas retenidos se cribaron por citometría de flujo (aparato Guava, Millipore). Tres hibridomas llamados "Rendomab-B49", "Rendomab-B41" y "Rendomab-B36" se conservaron finalmente al final de ambos cribados. A continuación, los anticuerpos secretados se produjeron a partir de tumores líquidos (ascitis) inducidos en el ratón mediante inyección por vía intraperitoneal de los hibridomas seleccionados.

II. Caracterización bioquímica

Después de purificar Rendomab-B49, Rendomab-B41 y Rendomab-B36, se realizó la caracterización de sus propiedades bioquímicas.

El isotipado de las cadenas pesada y ligera de Rendomab-B49 se hizo usando el kit "Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping" de Pierce. Es una inmunoglobulina de isotipo 1, tipo G, para la cadena pesada y kappa para la cadena ligera. Por lo tanto, Rendomab-B49 es una inmunoglobulina de tipo IgG1/kappa. Rendomab-B41 y Rendomab-B36 son una inmunoglobulina de tipo IgG1/kappa y una inmunoglobulina de tipo IgG3/kappa, respectivamente.

Después de purificar Rendomab-B49, Rendomab-B41 y Rendomab-B36, se estableció su especificidad de unión mediante citometría de flujo (Facs Calibur, Becton Dickinson BD Bioscience), mediante marcaje indirecto utilizando un anticuerpo secundario anti-ratón fluorescente comercial (Life Technologie: Alexa Fluor® 488 Fragmento F(ab')₂ de IgG anti-ratón de cabra (H+L) *2 mg/ml*).

Las células CHO-ETBR se separaron en 2 grupos. Uno de los grupos se incubó previamente en un medio de cultivo durante 2 h a 37 °C en presencia de endotelina 1 a una concentración final de 300 nM para internalizar el receptor ETBR con el fin de demostrar la especificidad de reconocimiento de los 3 anticuerpos Rendomab contra ETB-R.

A continuación, las células se dividieron en alícuotas en un tubo Falcon de 15 ml (300.000 células/tubo) en presencia de una concentración creciente (intervalo de concentración de 0,04 nM a 800 nM dos por dos) de anticuerpo Rendomab-B49. Después de 2 h de incubación a 4 °C, las células se lavan tres veces en un tampón PBS y a continuación se incuban durante 1 h a 4 °C con el anticuerpo secundario a una concentración final de 4 µg/ml. A continuación, las células se lavan 3 veces con un tampón PBS y a continuación se analizan con FAC Calibur después de contar 30.000 células.

III. Propiedades de unión en células de glioblastoma

III.1. Protocolo

Las células se cultivan en neuroesferas (cultivo suspendido) o en adherencia sobre portaobjetos de vidrio cubiertos con poli D Lisina/Laminina. A continuación, las células se unen mediante una solución al 4 % de paraformaldehído durante 15 min a temperatura ambiente y a continuación se lavan dos veces con PBS (SigmaAldrich). Los sitios inespecíficos se bloquean y las células se permeabilizan con una solución de PBS + suero de burro al 5 % + Triton al 0,1 %, durante 30 min.

El anticuerpo primario Rendomab-B49, diluido en la solución anterior a 1 µg/ml, se pone en contacto con las células durante una noche a 8 °C. Después de 2 enjuagues con PBS, las células se incuban con un anticuerpo secundario comercial a una concentración final de 4 µg/ml, bien junto con Alexa 488 (Life Technologie: Alexa Fluor®488 Fragmento F(ab')₂ de IgG anti-ratón de cabra (H+L) *2 mg/ml*) o junto con Alexa 680 (Life Technologie Alexa Fluor®680 Fragmento F(ab')₂ de IgG anti-ratón de cabra (H+L) *2 mg/ml*) durante 2 h según las recomendaciones del proveedor, y a continuación se aclaran dos veces con PBS.

Las células se incuban brevemente con una solución de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) de 1 µg/ml para ver los núcleos, y a continuación, después del lavado con PBS, los cubreobjetos se montan entre el objeto y el portaobjeto con un medio de montaje *ad hoc* para su observación. Las fotografías se toman con un microscopio Zeiss dotado de un módulo Apotome de 400 aumentos.

III.2. Resultados

La afinidad cercana al rango nanomolar para Rendomab-B49, Rendomab-B41 y Rendomab-B36 y su especificidad exclusiva para el receptor de endotelina humano subtipo B se ilustran en la figura 1.

La curva de unión observada para Rendomab-B49 (figura 1A), Rendomab-B41 (figura 1B) y Rendomab-B36 (figura 1C) es característica de la unión de un anticuerpo a su diana con una meseta de saturación.

Además, la preincubación de células CHO-ETBR durante 2 h a 37 °C en presencia de 300 nM de endotelina 1 provoca la internalización de ETB-R, lo que da como resultado una caída de más del 50 % de la unión de Rendomab-B49, Rendomab-B41 y Rendomab-B36 en estas condiciones, demostrando así la especificidad de unión de estos anticuerpos por ETB-R. La constante de disociación aparente K_D de los anticuerpos se determina tomando el valor de

la concentración que da una IFM igual al 50 % del valor de la IFM en la meseta. Esta constante es cercana a 1 nM para los 3 anticuerpos.

5 A continuación, se observa la ausencia de unión de Rendomab-B49, Rendomab-B41 y Rendomab-B36 en células CHO-WT no transfectadas por ETBR, lo que muestra que la unión observada en células CHO-ETBR no se debe a una proteína de membrana de las células CHO.

Experimentos de unión en células tumorales aisladas de biopsias de pacientes con un glioblastoma.

10 En la figura 2, existe una ausencia de marcaje de neuroesferas aisladas de un tumor de glioblastoma de alto grado con el anticuerpo Rendomab-B1 (figura 2A) mientras que se observa, en las mismas células, un marcaje fluorescente muy fuerte con el anticuerpo Rendomab-B49 (figura 2B).

15 Asimismo, la figura 3 muestra un fuerte marcaje fluorescente por el anticuerpo Rendomab-B49 (figura 3B) de células tumorales aisladas de un tumor de glioblastoma de bajo grado, estando estas células también marcadas con DAPI (figura 3A).

20 Se obtienen resultados comparables con los anticuerpos Rendomab-B41 y Rendomab-B36. Para ese fin, la figura 4 muestra un fuerte marcaje fluorescente con el anticuerpo Rendomab-B36 en células tumorales aisladas de un tumor de glioblastoma.

IV. Clonación molecular

25 La clonación de precursores nucleicos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de Rendomab-B1 se realizó utilizando los kits: "Gene-Elute/total RNA" (Sigma) y "RACE-PCR" (Invitrogen).

Las secuencias nucleicas deducidas en aminoácidos de los dominios variables de la cadena ligera (VL) y la cadena pesada (VH) de Rendomab-B49, Rendomab-B41 y Rendomab-B36 se dan en las figuras 5 a 7, respectivamente.

30 V. Mapeo epitópico

V.1. *Materiales y métodos*

35 El mapeo del epítipo reconocido por Rendomab-B49, Rendomab-B41 y Rendomab-B36 en la superficie de ETB-R se realizó mediante una técnica de "Pep-scan" en colaboración con y según los protocolos desarrollados en UMR 3145 "SysDiag" CNRS/BioRad ubicado en Montpellier (Dr. Claude Granier). La secuencia del receptor de endotelina humano subtipo B presenta la siguiente secuencia de aminoácidos:

MQPPPSLCGRALVALVLACGLSRIWGEERGFPDRATPLLQTAEIMTPPTKTLW
 PKGSNASLARSLAPAEVPGDRTAGSPRTISPPPCQGPPIEKETFKYINTVVVSLVFLGIIGNSTLLRIY
 KNKCMRNGPNILIASLALGDLHIVIDIPINVYKLLAEDWPFGAEMCKLVPFIQKASVGITVLSLALSID
 RYRAVASWSRIKIGVVPKWTAVEIVLIWVSVVLAVPEAIGFDIITMDYKGSYLRIKLLHPVQKTAFMQ
 FYKTAKDWWLFSFYFCLPLAITAFFYTLMTCEMLRKKSGMQIALNDHLKQRREVAKTVFCLLVFALC
 WLPLHLSRILKLTLYNQNDPNRCELLSFLLVLDYIGINMASLNSCINPIALYLVSKRFKNCFKSCLCCWCQ
 SFEEKQSLEEKQSCLKFKANDHGYDNFRSSNKYSSS (SEQ ID NO: 42).

40 Para ello, se utilizaron 144 péptidos de los 12 aminoácidos, cada uno compensado por un aminoácido. Estos péptidos corresponden a todas las secuencias de ETB-R mostradas en el lado extracitoplasmático de la membrana.

45 Para revelar el péptido o péptidos epitópicos reconocidos por Rendomab-B49, la membrana "Pep-scan" se trató de acuerdo con el siguiente protocolo:

- humidificación de la membrana en un baño de etanol;
- 3 lavados en 25 ml de tampón TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) durante 10 min con agitación a temperatura ambiente;
- 50 - saturación de la membrana con 25 ml del tampón de saturación (TBS, leche desnatada en polvo al 5 %, Tween 20 al 0,1 %) durante 30 min con agitación a temperatura ambiente;
- incubación con 25 ml de tampón de saturación que contiene el anticuerpo Rendomab-B49 a una concentración

- final de 1 µg/ml durante una noche a 4 °C con agitación;
- 3 lavados cortos (30 segundos) con tampón TBS y a continuación 3 lavados de 10 min con agitación con 25 ml de tampón TBST (TBST = TBS + Tween 20 al 0,1 %);
 - 5 - incubación con 25 ml de tampón de saturación que contiene el anticuerpo secundario anti-ratón de cabra diluido a 1/5.000 durante 30 min a temperatura ambiente con agitación;
 - 3 lavados cortos (30 segundos) con tampón TBS y a continuación 3 lavados de 10 min con agitación con 25 ml de tampón TBST;
 - 10 - revelación de la membrana sumergiéndola en la solución reveladora de Pierce (transferencia de Western Pierce ECL Plus Ref.: 32132) durante 5 min y mediante la adquisición de la señal en modo automático por el sistema ChemiDoc™ de BioRad).

V.2. *Resultados*

15 Los resultados del análisis epitópico de Rendomab-B49 se presentan en la figura 8. Las secuencias peptídicas que hibridan con alta intensidad son los péptidos C5, C6, C7, C8, C9 y C10 (figura 8A).

20 Su alineamiento permite identificar el epítipo predominantemente reconocido por Rendomab-B49: Este último es EVPKGDGR correspondiente a la secuencia del aminoácido 70 al aminoácido 76 en la SEQ ID NO: 42 (figura 8B). Tan pronto como falta el ácido glutámico E70 en el péptido C11 de la secuencia VPKGDRTAGSPP correspondiente a la secuencia del aminoácido 71 al aminoácido 82 en la SEQ ID NO: 42, la unión del anticuerpo disminuye significativamente (figura 8A).

25 La ubicación del péptido epitópico en la secuencia del receptor de endotelina humano subtipo B se presenta en la figura 8C. Esta secuencia está en el extremo N del receptor.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Commissariat a l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives
- 30 <120> Anticuerpo dirigido contra el receptor de endotelina subtipo B y usos del mismo
- <130> S60677 PCT SG-T
- 35 <140> PCT/EPXX/XXXXX
- <141> 22/06/2017
- <150> FR 1655915
- <151> 24/06/2016
- 40 <160> 42
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 45 <211> 27
- <212> PRT
- <213> Desconocido
- <220>
- 50 <223> Yuxtaposición ordenada de las CDR de la región variable de cadena pesada
- <400> 1

Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr Trp Ile Asp Pro Asp Ser Gly Gly Thr
1 5 10 15

Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
20 25

- 55 <210> 2
- <211> 23
 - <212> PRT
 - 60 <213> Desconocido

ES 2 865 300 T3

<220>

<223> Yuxtaposición ordenada de las CDR de la región variable de cadena ligera

<400> 2

5

Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Lys Val Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Gly Ser His Val Pro Trp Thr
 20

<210> 3

<211> 8

10

<212> PRT

<213> desconocido

<220>

<223> Secuencia consenso para CDR1H

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X representa cualquier aminoácido y, en particular, I o T

20

<400> 3

Gly Tyr Thr Phe Xaa Ser Tyr Trp
 1 5

25

<210> 4

<211> 24

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

30

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(24)

<223> CDR1H de Rendomab B49

35

<400> 4

ggc tac acc ttc atc agc tac tgg
 Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr Trp
 1 5

24

40

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

45

<400> 5

Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr Trp
 1 5

50

<210> 6

<211> 24

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

ES 2 865 300 T3

<222> (1)..(24)
<223> CDR1H de Rendomab B41 y Rendomab B36

<400> 6

5 ggc tac acc ttc acc agc tac tgg 24
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
 1 5

<210> 7
<211> 8
10 <212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 7

 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
15 1 5

<210> 8
<211> 8
20 <212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Secuencia consenso para CDR2H

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4).. (4)
<223> X representa cualquier aminoácido y, en particular, D o N

30 <400> 8

 Ile Asp Pro Xaa Ser Gly Gly Thr
 1 5

<210> 9
35 <211> 24
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<220>
40 <221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> Secuencia que codifica CDR2H de Rendomab B49 (N = C) o de Rendomab B41 (N = T)

<220>
45 <221> misc_feature
<222> (15).. (15)
<223> N representa C o T

<400> 9
50 attgatcctg atagnggtgg tact 24

<210> 10
<211> 8
55 <212> PRT
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> DOMAIN
60 <222> (1)..(8)
<223> CDR2H de Rendomab B49 y de Rendomab B41

<400> 10

Ile Asp Pro Asp Ser Gly Gly Thr

1

5

5

<210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(24)
 <223> CDR2H de Rendomab B36

15

<400> 11

att gat cct aat agt ggt ggc act
 Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr

24

1 5

20

<210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25

<400> 12

Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr

1

5

30

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocido

35

<220>
 <223> Secuencia consenso para CDR3H

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X representa cualquier aminoácido y, en particular, se selecciona de A, D, Y, E, F, V y W y, más particularmente, es A o V

40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X representa cualquier aminoácido y, en particular, se selecciona de A, D, Y, E, F, V y W y, más particularmente, se selecciona de D, W y E

45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> X representa cualquier aminoácido y, en particular, se selecciona de A, D, Y, E, F, V y W y, más particularmente, se selecciona de Y, D y F

50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)

55

ES 2 865 300 T3

<223> X representa cualquier aminoácido y, en particular, se selecciona de A, D, Y, E, F, V y W y, más particularmente, es A o V

<400> 13

5

Xaa Arg Glu Gly Xaa Xaa Ala Trp Phe Xaa Tyr
1 5 10

<210> 14

<211> 33

10

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

15

<222> (1)..(33)

<223> CDR3H de Rendomab B49

<400> 14

gca aga gaa ggg gat tac gcc tgg ttt gct tac
Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

20

33

<210> 15

<211> 11

25

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 15

Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

30

<210> 16

<211> 33

<212> ADN

35

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

40

<222> (1)..(33)

<223> CDR3H de Rendomab B41

<400> 16

gta aga gaa ggg tgg gac gcc tgg ttt gtt tac
Val Arg Glu Gly Trp Asp Ala Trp Phe Val Tyr
1 5 10

45

33

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

50

<400> 17

Val Arg Glu Gly Trp Asp Ala Trp Phe Val Tyr

1

5

10

55

<210> 18

ES 2 865 300 T3

<211> 33
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(33)
 <223> CDR3H de Rendomab B36

10 <400> 18

gca aga gag ggg gaa ttc gcc tgg ttt gct tac 33
 Ala Arg Glu Gly Glu Phe Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 19

Ala Arg Glu Gly Glu Phe Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocido

30 <220>
 <223> Secuencia consenso para CDR1L

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X representa cualquier aminoácido y, en particular, se selecciona de N, Y y S y, más particularmente, es N o S

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> X representa cualquier aminoácido y, en particular, se selecciona de N, Y y S y, más particularmente, es N o Y

40 <400> 20

Gln Xaa Ile Val His Ser Asn Gly Xaa Thr Tyr
 1 5 10

45 <210> 21
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

50 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(33)
 <223> CDR1L de Rendomab B49 y de Rendomab B41

55 <400> 21

cag agc att gta cat agt aat gga aac acc tat
 Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

33

5 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 22

10 Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

15 <210> 23
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(33)
 <223> CDR1L de Rendomab B36

<400> 23

cag aac att gtc cat agt aat gga tac acc tat
 Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Tyr Thr Tyr
 1 5 10

33

25 <210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30 <400> 24

Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Tyr Thr Tyr
 1 5 10

35 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

40 <220>
 <223> Secuencia consenso para CDR3L

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> X representa cualquier aminoácido y, en particular, es W o L

<400> 25

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Xaa Thr
 1 5

50 <210> 26
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 55

ES 2 865 300 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(27)
 <223> CDR3L de Rendomab B49
 5
 <400> 26

 ttt caa ggt tca cat gtt ccg tgg acg 27
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
 1 5

 10 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 15 <400> 27

 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
 1 5

 20 <210> 28
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1).. (27)
 <223> Secuencia que codifica CDR3L de Rendomab B41 y de Rendomab B36

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21).. (21)
 <223> N representa G o T

 35 <400> 28
 ttcaagggtt cacatgttcc nctcacg 27

 40 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 45 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1)..(9)
 <223> CDR3L de Rendomab B41 y de Rendomab B36

 <400> 29

 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr
 1 5

 50 <210> 30
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

 55 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(354)
 <223> Región variable de cadena pesada de Rendomab B49

 60

ES 2 865 300 T3

<400> 30

cag gtc caa ctg cag cag cct ggg gct gcg ctt gtg aag cct ggg gct	48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc atc agc tac	96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr	
20 25 30	
tgg atg ctc tgg gtg aag cag agg cct gga cga ggc ctt gag tgg att	144
Trp Met Leu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga agg att gat cct gat agc ggt ggt act aag tac aat gag aag ttc	192
Gly Arg Ile Asp Pro Asp Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe	
50 55 60	
aag agc aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac	240
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tat tgt	288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gca aga gaa ggg gat tac gcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act	336
Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
100 105 110	
ctg gtc cct gtc tct gca	354
Leu Val Pro Val Ser Ala	
115	

5 <210> 31
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 31

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro Gly Ala

ES 2 865 300 T3

```

1             5             10             15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr
            20             25             30

Trp Met Leu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
            35             40             45

Gly Arg Ile Asp Pro Asp Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
            50             55             60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65             70             75             80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
            85             90             95

Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100            105            110

Leu Val Pro Val Ser Ala
            115

```

```

5
<210> 32
<211> 354
<212> ADN
<213> Mus musculus

10
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(354)
<223> Región variable de cadena pesada de Rendomab B41

15
<400> 32

cag gtc caa ctg cag cag cct ggg gct gag ctt gtg aag cct ggg gct      48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1             5             10             15

tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc acc agc tac      96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20             25             30

tgg atg cac tgg gtg aag cag agg cct gga cga ggc ctt gag tgg att      144
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
            35             40             45

gga agg att gat cct gat agt ggt ggt act aaa tac aat gag aag ttc      192
Gly Arg Ile Asp Pro Asp Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
            50             55             60

aag agc aag gcc aca ctg act gta gac aaa ccc tcc aac aca gcc aac      240
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Asn Thr Ala Asn
65             70             75             80

```

ES 2 865 300 T3

atg cag ctc agc agc ctg aca tct gaa gac tct gcg gtc tat tat tgt 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gta aga gaa ggg tgg gac gcc tgg ttt gtt tac tgg ggc caa ggg act 336
 Val Arg Glu Gly Trp Asp Ala Trp Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

ctg ctc act gtc tct gca 354
 Leu Leu Thr Val Ser Ala
 115

<210> 33
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 33

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Asp Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Asn Thr Ala Asn
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Arg Glu Gly Trp Asp Ala Trp Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Leu Thr Val Ser Ala
 115

10

<210> 34
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

15

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(354)

20

<223> Región variable de cadena pesada de Rendomab B36

ES 2 865 300 T3

<400> 34

cag gtc caa ctg cag cag cct ggg gct gaa ctt gtg aag cct ggg gct	48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc acc agc tac	96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
20 25 30	
tgg ata cac tgg gta aat cag agg cct gga cga ggc ctt gag tgg att	144
Trp Ile His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga agg att gat cct aat agt ggt ggc act aag tac aat gag aag ttc	192
Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe	
50 55 60	
aag agt aag gcc aca ctg act gta gac aaa acc tcc agc aca gcc tac	240
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Thr Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg cag ttc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tat tgt	288
Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gca aga gag ggg gaa ttc gcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act	336
Ala Arg Glu Gly Glu Phe Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
100 105 110	
ctg gtc act gtc tct gca	354
Leu Val Thr Val Ser Ala	
115	

5 <210> 35
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 35

ES 2 865 300 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Thr Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Glu Phe Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

- 5 <210> 36
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
- 10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(336)
 <223> Región variable de cadena ligera de Rendomab B49
- 15 <400> 36

ES 2 865 300 T3

gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc att gta cat agt 96
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca ggc cag tct 144
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

tca cat gtt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa 336
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 37
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 37

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

10

ES 2 865 300 T3

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

<210> 38
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)
 <223> Región variable de cadena ligera de Rendomab B41

<400> 38

	gat	gtt	ttg	atg	acc	caa	act	cca	ctc	tcc	ctg	cct	gtc	agt	ctt	gga	48
	Asp	Val	Leu	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly	
	1				5				10						15		
	gat	caa	gcc	tcc	atc	tct	tgc	aga	tct	agt	cag	agc	att	gta	cat	agt	96
	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	
			20						25					30			
	aat	gga	aac	acc	tat	tta	gaa	tgg	tac	ttg	cag	aaa	cca	ggc	cag	tct	144
	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	
			35					40					45				
	cca	aag	ctc	ctg	atc	tac	aaa	gtt	ttc	aac	cga	ttt	tct	ggg	gtc	cca	192
	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Phe	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	
			50				55					60					
	gac	agg	ttc	agt	ggc	agt	gga	tca	ggg	aca	gat	ttc	aca	ctc	aag	atc	240
	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
	65				70					75					80		
	agc	aga	gtg	gag	gct	gag	gat	ctg	gga	ggt	tat	tac	tgc	ttt	caa	ggt	288
	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	
				85					90						95		
	tca	cat	gtt	cag	ctc	acg	ttc	ggt	gct	ggg	acc	aag	ctg	gag	ctg	aaa	336
	Ser	His	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	
				100					105					110			

15

cgg
Arg

339

5 <210> 39
<211> 113
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 39

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Phe Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

10 Arg

<210> 40
<211> 339
<212> ADN
15 <213> *Mus musculus*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(339)
20 <223> Región variable de cadena ligera de Rendomab B36

<400> 40

gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag aac att gtc cat agt 96
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
20 25 30

25

ES 2 865 300 T3

aat gga tac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca ggc cag tct 144
 Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

tca cat gtt cct ctc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa 336
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

cgg 339
 Arg

<210> 41
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 41

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

10

<210> 42
 <211> 442

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <221> CHAIN
 <222> (1)..(442)
 <223> Secuencia del receptor de endotelina humano subtipo B

10 <220>
 <221> CHAIN
 <222> (1)..(101)
 <223> Región extracelular

15 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(26)
 <223> Péptido señal

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (64)..(64)
 <223> Sitio de proteólisis

25 <220>
 <221> CHAIN
 <222> (65)..(76)
 <223> Péptido C5

30 <220>
 <221> CHAIN
 <222> (66)..(77)
 <223> Péptido C6

35 <220>
 <221> CHAIN
 <222> (67)..(78)
 <223> Péptido C7

40 <220>
 <221> CHAIN
 <222> (68)..(79)
 <223> Péptido C8

45 <220>
 <221> CHAIN
 <222> (69)..(80)
 <223> Péptido C9

50 <220>
 <221> CHAIN
 <222> (70)..(81)
 <223> Péptido C10

55 <220>
 <221> CHAIN
 <222> (70)..(76)
 <223> Epítipo reconocido por Rendomab-B49

60 <220>
 <221> CHAIN
 <222> (71)..(82)
 <223> Péptido C11

65 <220>
 <221> CHAIN
 <222> (72)..(83)

<223> Péptido C12

<220>
 <221> CHAIN
 5 <222> (102)..(126)
 <223> Región transmembrana

<220>
 <221> CHAIN
 10 <222> (127)..(137)
 <223> Región intracelular

<220>
 <221> CHAIN
 15 <222> (138)..(163)
 <223> Región transmembrana

<220>
 <221> CHAIN
 20 <222> (164)..(175)
 <223> Región extracelular

<220>
 <221> CHAIN
 25 <222> (176)..(197)
 <223> Región transmembrana

<220>
 <221> CHAIN
 30 <222> (198)..(218)
 <223> Región intracelular

<220>
 <221> CHAIN
 35 <222> (219)..(243)
 <223> Región transmembrana

<220>
 <221> CHAIN
 40 <222> (244)..(274)
 <223> Región extracelular

<220>
 <221> CHAIN
 45 <222> (275)..(296)
 <223> Región transmembrana

<220>
 <221> CHAIN
 50 <222> (297)..(324)
 <223> Región intracelular

<220>
 <221> CHAIN
 55 <222> (325)..(350)
 <223> Región transmembrana

<220>
 <221> CHAIN
 60 <222> (351)..(362)
 <223> Región extracelular

<220>
 <221> CHAIN
 65 <222> (363)..(389)
 <223> Región transmembrana

ES 2 865 300 T3

<220>
 <221> CHAIN
 <222> (390)..(442)
 5 <223> Región intracelular
 <400> 42

```

Met  Gln  Pro  Pro  Pro  Ser  Leu  Cys  Gly  Arg  Ala  Leu  Val  Ala  Leu  Val
 1                    5                      10                      15

Leu  Ala  Cys  Gly  Leu  Ser  Arg  Ile  Trp  Gly  Glu  Glu  Arg  Gly  Phe  Pro
                20                      25                      30

Pro  Asp  Arg  Ala  Thr  Pro  Leu  Leu  Gln  Thr  Ala  Glu  Ile  Met  Thr  Pro
                35                      40                      45

Pro  Thr  Lys  Thr  Leu  Trp  Pro  Lys  Gly  Ser  Asn  Ala  Ser  Leu  Ala  Arg
 50                      55                      60

Ser  Leu  Ala  Pro  Ala  Glu  Val  Pro  Lys  Gly  Asp  Arg  Thr  Ala  Gly  Ser
65                      70                      75

Pro  Pro  Arg  Thr  Ile  Ser  Pro  Pro  Pro  Cys  Gln  Gly  Pro  Ile  Glu  Ile
                85                      90                      95

Lys  Glu  Thr  Phe  Lys  Tyr  Ile  Asn  Thr  Val  Val  Ser  Cys  Leu  Val  Phe
                100                      105                      110

Val  Leu  Gly  Ile  Ile  Gly  Asn  Ser  Thr  Leu  Leu  Arg  Ile  Ile  Tyr  Lys
                115                      120                      125

Asn  Lys  Cys  Met  Arg  Asn  Gly  Pro  Asn  Ile  Leu  Ile  Ala  Ser  Leu  Ala
130                      135                      140

Leu  Gly  Asp  Leu  Leu  His  Ile  Val  Ile  Asp  Ile  Pro  Ile  Asn  Val  Tyr
145                      150                      155                      160

Lys  Leu  Leu  Ala  Glu  Asp  Trp  Pro  Phe  Gly  Ala  Glu  Met  Cys  Lys  Leu
                165                      170                      175
    
```

10

ES 2 865 300 T3

Val Pro Phe Ile Gln Lys Ala Ser Val Gly Ile Thr Val Leu Ser Leu
180 185 190

Cys Ala Leu Ser Ile Asp Arg Tyr Arg Ala Val Ala Ser Trp Ser Arg
195 200 205

Ile Lys Gly Ile Gly Val Pro Lys Trp Thr Ala Val Glu Ile Val Leu
210 215 220

Ile Trp Val Val Ser Val Val Leu Ala Val Pro Glu Ala Ile Gly Phe
225 230 235 240

Asp Ile Ile Thr Met Asp Tyr Lys Gly Ser Tyr Leu Arg Ile Cys Leu
245 250 255

Leu His Pro Val Gln Lys Thr Ala Phe Met Gln Phe Tyr Lys Thr Ala
260 265 270

Lys Asp Trp Trp Leu Phe Ser Phe Tyr Phe Cys Leu Pro Leu Ala Ile
275 280 285

Thr Ala Phe Phe Tyr Thr Leu Met Thr Cys Glu Met Leu Arg Lys Lys
290 295 300

Ser Gly Met Gln Ile Ala Leu Asn Asp His Leu Lys Gln Arg Arg Glu
305 310 315 320

Val Ala Lys Thr Val Phe Cys Leu Val Leu Val Phe Ala Leu Cys Trp
325 330 335

Leu Pro Leu His Leu Ser Arg Ile Leu Lys Leu Thr Leu Tyr Asn Gln
340 345 350

Asn Asp Pro Asn Arg Cys Glu Leu Leu Ser Phe Leu Leu Val Leu Asp
355 360 365

Tyr Ile Gly Ile Asn Met Ala Ser Leu Asn Ser Cys Ile Asn Pro Ile
370 375 380

Ala Leu Tyr Leu Val Ser Lys Arg Phe Lys Asn Cys Phe Lys Ser Cys
385 390 395 400

Leu Cys Cys Trp Cys Gln Ser Phe Glu Glu Lys Gln Ser Leu Glu Glu
405 410 415

Lys Gln Ser Cys Leu Lys Phe Lys Ala Asn Asp His Gly Tyr Asp Asn
420 425 430

ES 2 865 300 T3

Phe Arg Ser Ser Asn Lys Tyr Ser Ser Ser
435 440

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo dirigido contra el receptor de endotelina subtipo B que comprende:

5 - una región variable de cadena pesada que comprende

- una CDR1 (designada en lo sucesivo en el presente documento CDR1_H) que tiene la siguiente secuencia consenso: GYTFX₁SYW (SEQ ID NO: 3) en la que X₁ es I o T;

10 - una CDR2 (designada en lo sucesivo en el presente documento CDR2_H) que tiene la siguiente secuencia consenso: IDPX₂SGGT (SEQ ID NO: 8) en la que X₂ representa D o N; y

- una CDR3 (designada en lo sucesivo en el presente documento CDR3_H) que tiene la siguiente secuencia consenso: X₃REGX₄X₅AWFX₆Y (SEQ ID NO: 13) en la que X₃ es A o V; X₄ se elige del grupo que consiste en D, W y E; X₅ se elige del grupo que consiste en Y, D y F y X₆ es A o V; y

15 - una región variable de cadena ligera que comprende

- una CDR1 (designada en lo sucesivo en el presente documento CDR1_L) que tiene la siguiente secuencia consenso: QX₇IVHSNGX₈TY (SEQ ID NO: 20), en la que X₇ es N o S y X₈ es N o Y;

20 - una CDR2 (designada en lo sucesivo en el presente documento CDR2_L) que tiene la siguiente secuencia consenso: KVX₉, en la que X₉ es S o F; y

- una CDR3 (designada en lo sucesivo en el presente documento CDR3_L) que tiene la siguiente secuencia consenso: FQGSHVPX₁₀T (SEQ ID NO: 25), en la que X₁₀ es W o L;

un fragmento o derivado del mismo,

25 en donde dicho anticuerpo y dicho fragmento o derivado del mismo son capaces de reconocer isómeros conformacionales particulares del receptor de endotelina subtipo B expresado en la superficie de las células de glioblastoma,

en donde dicho fragmento tiene al menos un sitio de unión a antígeno y

en donde dicho derivado es un Fv monocatenario.

30

2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende:

i₁) una región variable de cadena pesada que comprende:

35 - una CDR1_H cuya secuencia de aminoácidos es GYT_FISYW (SEQ ID NO: 5);

- una CDR2_H cuya secuencia de aminoácidos es IDPDSGGT (SEQ ID NO: 10); y

- una CDR3_H cuya secuencia de aminoácidos es AREGDYAWFAY (SEQ ID NO: 15);

o

40 ii₁) una región variable de cadena pesada que comprende:

- una CDR1_H cuya secuencia de aminoácidos es GYT_FT_SYW (SEQ ID NO: 7);

- una CDR2_H cuya secuencia de aminoácidos es IDPDSGGT (SEQ ID NO: 10); y

- una CDR3_H cuya secuencia de aminoácidos es VREGWDAWFVY (SEQ ID NO: 17);

45

o

iii₁) una región variable de cadena pesada que comprende:

- una CDR1_H cuya secuencia de aminoácidos es GYT_FT_SYW (SEQ ID NO: 7);

50 - una CDR2_H cuya secuencia de aminoácidos es IDPN_SGGT (SEQ ID NO: 12); y

- una CDR3_H cuya secuencia de aminoácidos es AREGEFAWFAY (SEQ ID NO: 19).

3. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos presenta al menos un 80 % de identidad con la siguiente secuencia:

55

QVQLQQPGAALVKPGASVKLSCKASGYTFISYWMLWVKQRPGRGLEWIGRIDPDSGG

TKYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREGDYAWFAYWGQGLVPSA (SEQ ID NO: 31).

4. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo comprende:

60 i₂) una región variable de cadena ligera que comprende:

- una CDR1_L cuya secuencia de aminoácidos es QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 22);
- una CDR2_L cuya secuencia de aminoácidos es KVS;
- una CDR3_L cuya secuencia de aminoácidos es FQGSHVPWT (SEQ ID NO: 27);

5 o
ii₂) una región variable de cadena ligera que comprende:

- una CDR1_L cuya secuencia de aminoácidos es QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 22);
- una CDR2_L cuya secuencia de aminoácidos es KVF;
- una CDR3_L cuya secuencia de aminoácidos es FQGSHVPLT (SEQ ID NO: 29);

10 o
iii₂) una región variable de cadena ligera que comprende:

- una CDR1_L cuya secuencia de aminoácidos es QNIVHSNGYTY (SEQ ID NO: 24);
- una CDR2_L cuya secuencia de aminoácidos es KVS;
- una CDR3_L cuya secuencia de aminoácidos es FQGSHVPLT (SEQ ID NO: 29).

15 5. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos presenta al menos un 80 % de identidad con la siguiente secuencia:

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS**QSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS**NRF

SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYY**CFQGS**HVPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 37).

25 6. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo es una inmunoglobulina de tipo IgG1/kappa o de tipo IgG3/kappa.

7. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo es monoclonal.

30 8. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo es el anticuerpo monoclonal murino obtenido de un hibridoma elegido del hibridoma depositado en la CNCM el 19 de mayo de 2016 con el número de acceso CNCM 1-5084, el hibridoma depositado en la CNCM el 7 de junio de 2016 con el número de acceso CNCM 1-5104 y el hibridoma depositado en la CNCM el 7 de junio de 2016 con el número de acceso CNCM I-5103.

9. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo quimerizado.

40 10. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

11. Un hibridoma elegido del hibridoma depositado en la CNCM el 19 de mayo de 2016 con el número de acceso CNCM 1-5084, el hibridoma depositado en la CNCM el 7 de junio de 2016 con el número de acceso CNCM 1-5104 y el hibridoma depositado en la CNCM el 7 de junio de 2016 con el número de acceso CNCM I-5103.

12. Un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

50 13. Un vector de clonación y/o de expresión que contiene al menos un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 12.

14. Un organismo huésped transformado por o que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 12 o un vector de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho organismo huésped se selecciona del grupo que consiste en un microorganismo, una célula animal, una célula vegetal, una célula de insecto o una planta.

55 15. Un compuesto que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 conjugado con un elemento elegido del grupo que consiste en un grupo citotóxico, un grupo fácilmente detectable o un grupo efector.

60 16. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 12 o el compuesto de acuerdo con la reivindicación 15, para su uso en medicina.

17. Una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, un anticuerpo de acuerdo con cualquiera

de las reivindicaciones 1 a 10, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 12 o un compuesto de acuerdo con la reivindicación 15 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

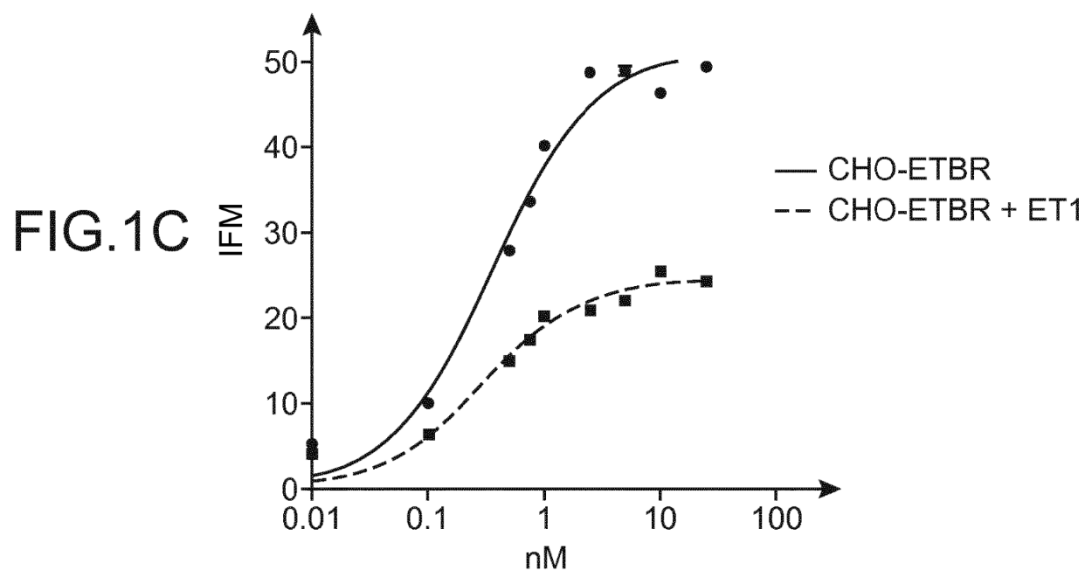
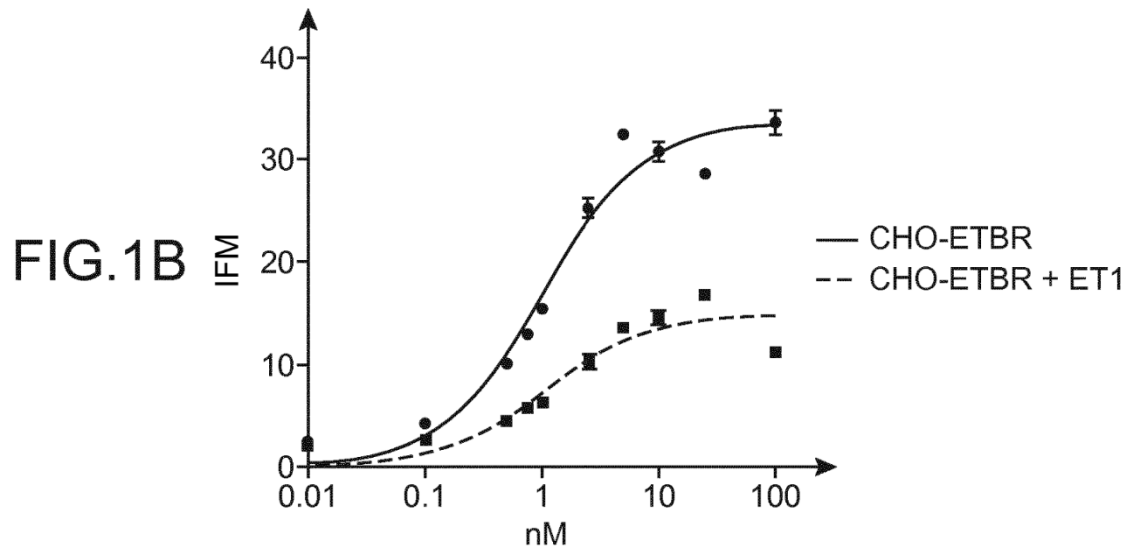
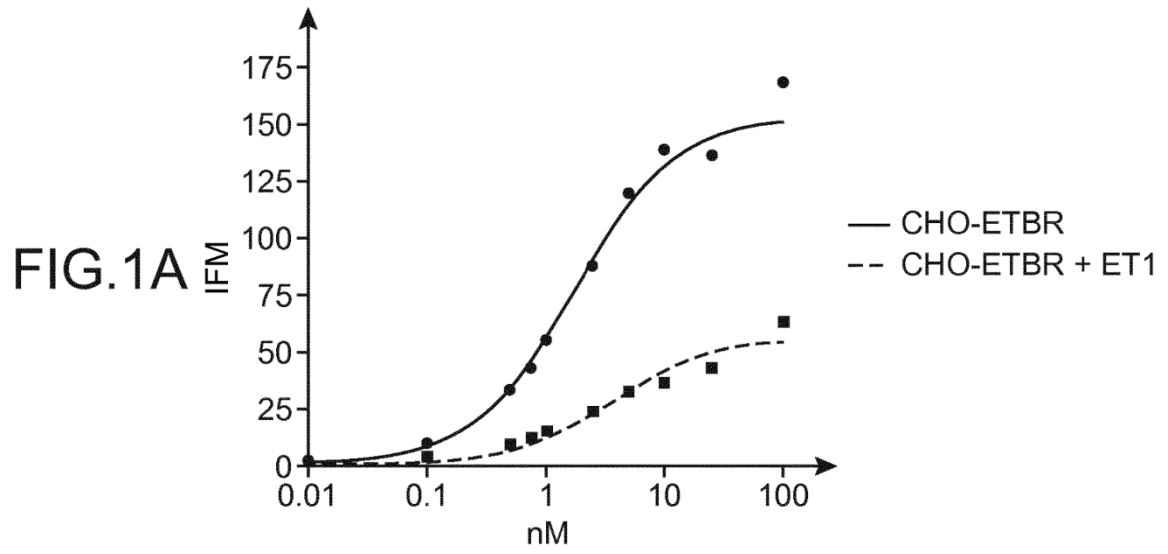
5 18. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 12, el compuesto de acuerdo con la reivindicación 15 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno o una afección que implica una disfunción, ya sea directa o en asociación con otra vía fisiológica, del eje que comprende una endotelina y al menos uno de sus receptores tal como, por ejemplo, el receptor de endotelina subtipo B, en donde dicho trastorno o dicha afección son un cáncer.

10 19. Un proceso para diagnosticar un cáncer *in vitro* que comprende las etapas de:

15 a₁') poner en contacto una muestra biológica tomada de un sujeto con un compuesto de acuerdo con la reivindicación 15;

b₁') detectar la señal emitida por el grupo fácilmente detectable y

c₁') determinar la presencia o la ausencia de un cáncer en dicho sujeto basándose en la señal detectada en la etapa (b₁').



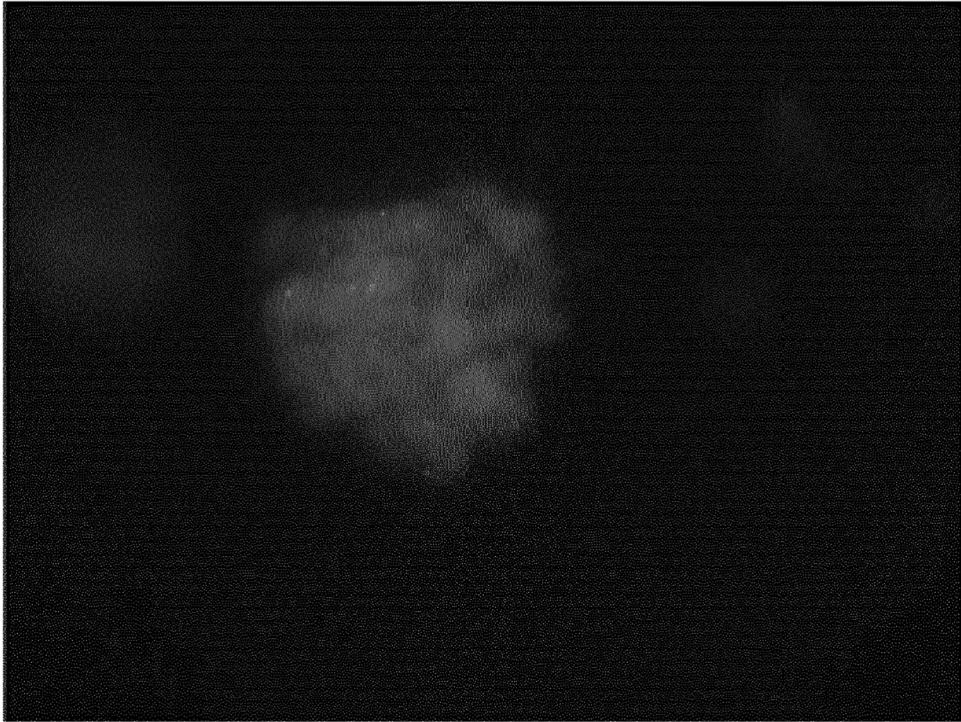


FIG.2A

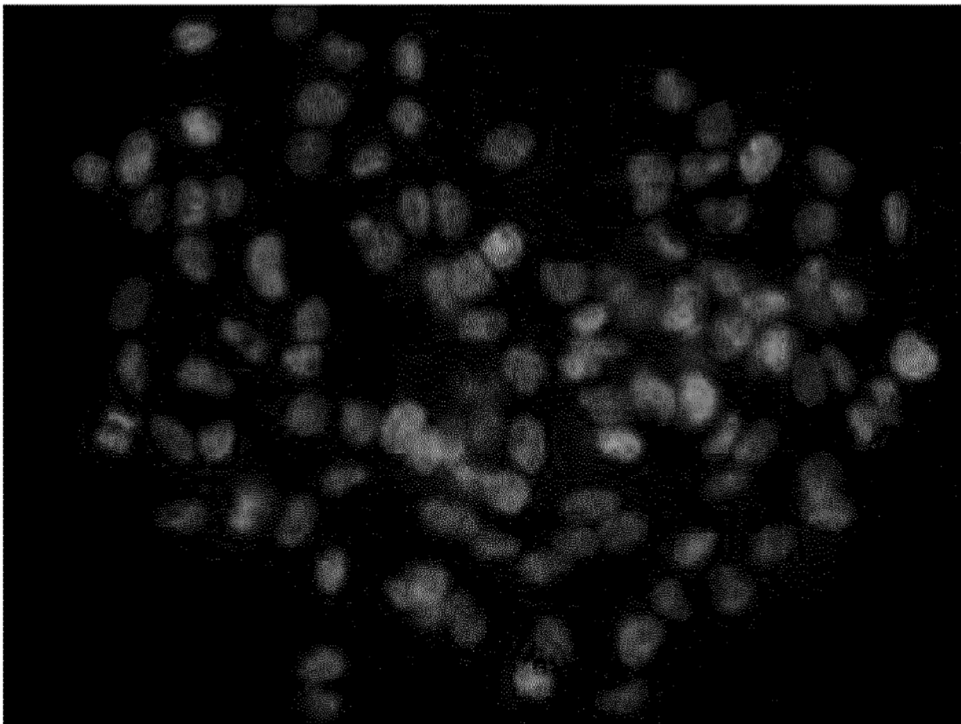


FIG.2B

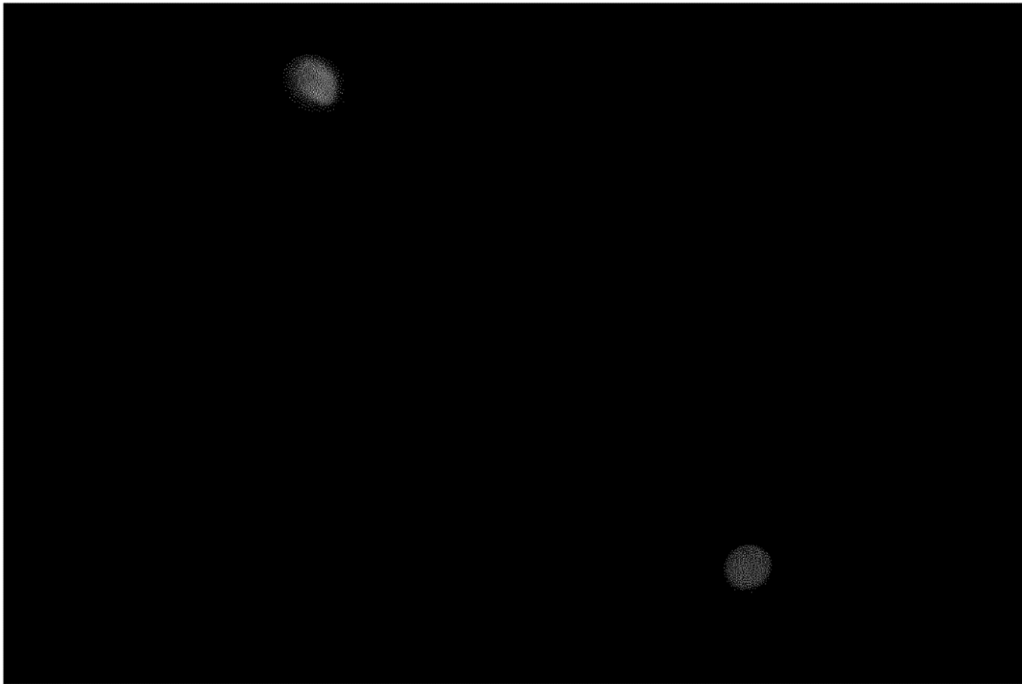


FIG.3A

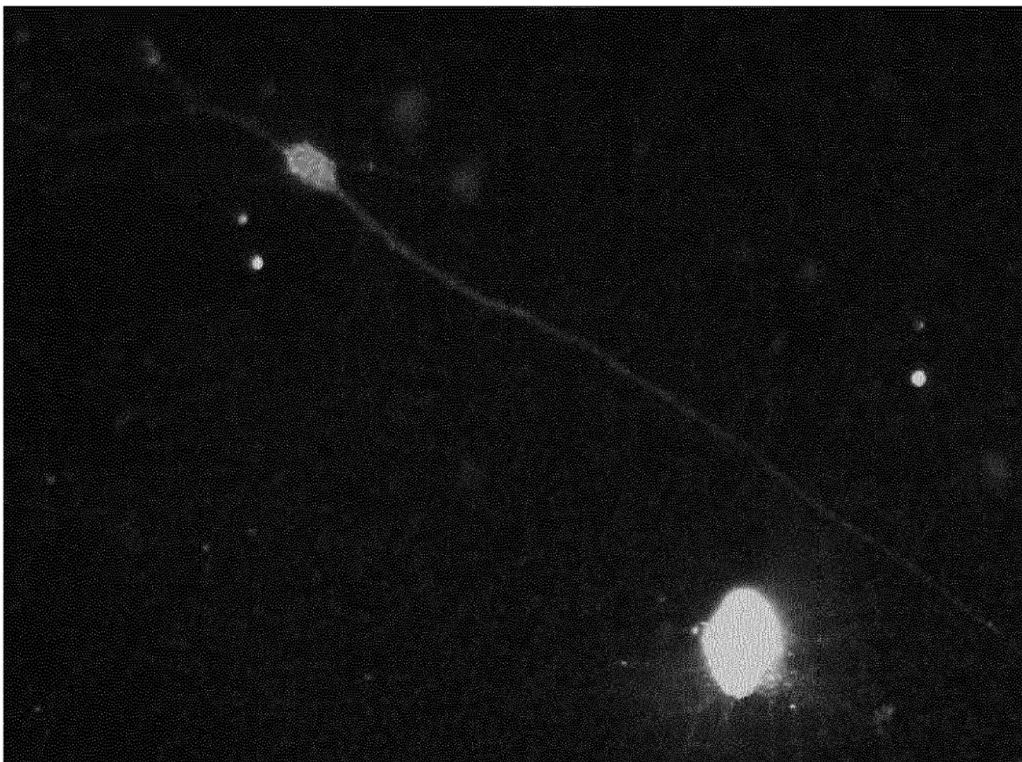


FIG.3B

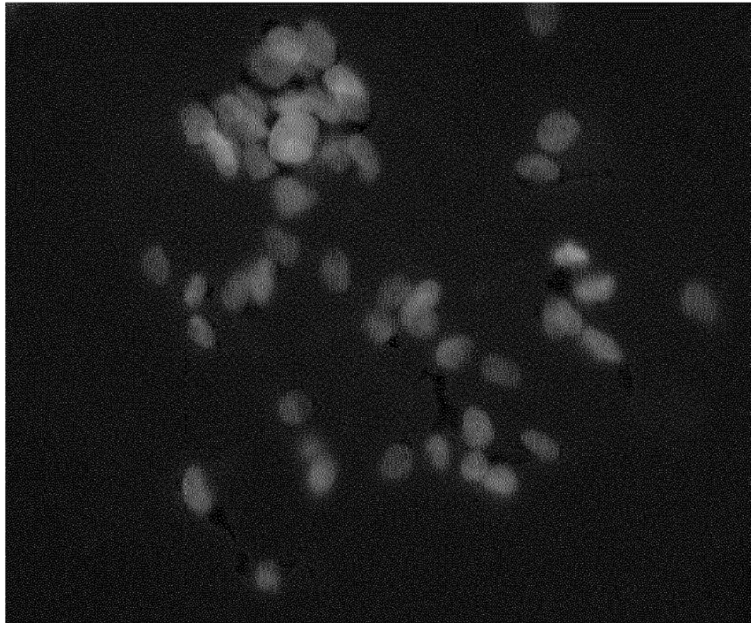


FIG.4

VLRendoMabB49

```
GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCT
AGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAG
CTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT
TTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCG
TGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA
```

VLRendoMabB49

```
DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTD
FTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKLEIK
```

FIG.5A

VHRendoMabB49

```
CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGCGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCT
GGCTACACCTTCATCAGCTACTGGATGCTCTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGG
ATTGATCCTGATAGCGGTGGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCC
TCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGAGAAGGG
GATTACGCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCCCTGTCTCTGCA
```

VHRendoMabB49

```
QVQLQQPGAALVKPGASVKLSCKASGYTFISYWMLVWKQRPGRGLEWIGRIDPDSGGTKYNEKFKSKATLTVDKS
SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREGDYAWFAYWGQGLVPSVA
```

FIG.5B

VL RendoMabB41

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCT
AGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACTTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAG
CTCCTGATCTACAAAGTTTTCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT
TTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCG
CTCACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

VL RendoMabB41

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVFNRFSGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELKR

FIG.6A

VH RendoMabB41

CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCT
GGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGG
ATTGATCCTGATAGTGGTGGTACTAAATACAATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAACCC
TCCAACACAGCCAACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAAGACTCTGCGGTCTATTATTGTGTAAGAGAAGGG
TGGGACGCCTGGTTTGTACTGGGGCCAAGGGACTCTGCTCACTGTCTCTGCA

VH RendoMabB41

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPRGLEWIGRIDPDSGGTKYNEKFKSKATLTVDKP
SNTANMQLSSLTSEDSAVYYCVREGWDAWFVYWGQGLLTVSA

FIG.6B

VL RendoMabB36

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCT
AGTCAGAACATTGTCCATAGTAATGGATACACCTATTTAGAATGGTACTTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAG
CTCCTGATCTACAAAGTTTTCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT
TTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTTCT
CTCACGTTCCGGTCTGGGGACAAAGTTGGAAATAAACGG

VL RendoMabB36

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVHSNGYTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTD
FTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGSGTKLEIKR

FIG.7A

VH RendoMabB36

CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCT
GGCTACACCTTACCAGCTACTGGATACACTGGGTAAATCAGAGGCCTGGACGAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGG
ATTGATCCTAATAGTGGTGGCACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGAGTAAGGCCACACTGACTGTAGACAAAACC
TCCAGCACAGCCTACATGCAGTTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGAGAGGGG
GAATTCGCTGGTTTGTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

VH RendoMabB36

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWIHWVNQRPRGLEWIGRIDPNSGGTKYNEKFKSKATLTVDKT
SSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCAREGEFAWFAYWGQGLTVSA

FIG.7B

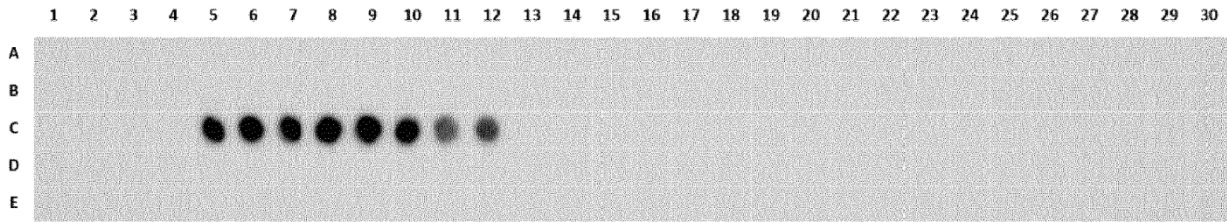


FIG.8A

Alineamiento de los péptidos reconocidos por Rendomab-B49 con alta intensidad

```

C5  SLAPAEVPKGDR
C6  LAPAEVPKGDRT
C7  APAEVPKGDRTA
C8  PAEVPKGDRTAG
C9  AEVPKGDRTAGS
C10 EVPKGDRTAGSP
Consenso  ...paEVPKGDRtag..
    
```

FIG.8B

La secuencia del receptor de endotelina humano subtipo B

MQPPPSLCGRALVALVLACGLSRIWGEERGFPPDRATPLLQTAEIMTPPTKTLWPKGSNASLARSSLAPAEV**PKGDR**
RTAGSPPRTISPPPCQGPIEIKETFKYINTVVSCLVFVLGIIGNSTLLRIIYKNKCMRNGPNILIASLALGDLLH
IVIDIPINVYKLIAEDWPFGAEMCKLVPFIQKASVGITVLSLCALSIDRYRAVASWSRIKGIGVPKWTAVEIVLI
WVSVVLAVPEAIGFDIITMDYKGSYLRICLLHPVQKTAFMQFYKTAKDWWLFSFYFCLPLAITAFFYTLMTCEM
LRKKSGMQIALNDHLKQRREVAKTVECLVLVFALCWLPLHLSRILKLTLYNQNDPNRCELLSFLLVLDYIGINMA
SLNSCINPIALYLVSKRFKNCFKSCLCCWCSFEEKQSLEEKQSCLKFKANDHGYDNFRSSNKYSS

MQPPPSLCGRALVALVLACGLSRIW
REGIONES TRANSMEMBRANA
REGIONES EXTRACELULARES
REGIONES INTRACELULARES
EV**PKGDR**

Péptido señal

Epítipo reconocido por Rendomab-B49

FIG.8C