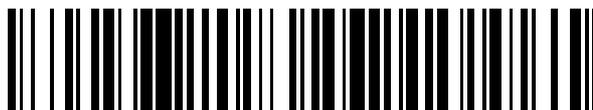


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 133**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)	C12P 21/08	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)	C07K 16/30	(2006.01)
A61P 7/02	(2006.01)	C12N 5/16	(2006.01)
A61P 9/00	(2006.01)		
A61P 9/10	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 35/04	(2006.01)		
A61P 43/00	(2006.01)		
C12N 5/10	(2006.01)		
C12N 15/09	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2012 E 12760065 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2690111**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales de ratón anti-Aggrus**

30 Prioridad:

22.03.2011 JP 2011062686

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

11.04.2016

73 Titular/es:

**JAPANESE FOUNDATION FOR CANCER
RESEARCH (50.0%)
3-8-31, Ariake Koto-ku
Tokyo 135-8550, JP y
LSIP, LLC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FUJITA, NAOYA;
NAKAZAWA, YUYA y
TAKAGI, SATOSHI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 566 133 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales de ratón anti-Aggrus

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales de ratón anti-Aggrus.

Antecedentes

10 Se ha demostrado que un factor de inducción de agregación plaquetaria Aggrus (también conocido como podoplanina, gp44, etc.), una sialoglicoproteína transmembrana de tipo I, está regulado positivamente en muchos cánceres tales como diferentes tipos de carcinomas de células escamosas, mesoteliomas, sarcoma de Kaposi, tumores de células germinales testiculares, y tumores cerebrales (documentos no de patente 1-9). En algunos
15 informes, la sobre-expresión de Aggrus se correlacionaba con un peor pronóstico, sugiriendo la importante contribución de Aggrus en la progresión del cáncer (Documentos no de patente 10, 11). La expresión de Aggrus inducía la agregación plaquetaria, y promovía metástasis pulmonar tanto experimental como espontánea en ratones (Documentos no de patente 11, 12). La actividad de inducción de agregación plaquetaria de Aggrus está directamente relacionada con la formación de metástasis ya que la introducción de una mutación puntual que suprimía la
20 agregación plaquetaria atenuaba la formación de metástasis pulmonar (Documentos no de patente 11, 12). Se cree que la agregación plaquetaria inducida por las células cancerosas forma un gran agregado de células cancerosas-plaquetas, da como resultado un aumento de embolización de células cancerosas en el sistema microvascular y protección contra el asalto inmunológico en la circulación. Se ha identificado recientemente al receptor 2 tipo lectina tipo C (CLEC-2) que se expresa en las plaquetas como uno de los contra receptores de Aggrus. Cuando el CLEC-2 se
25 une con Aggrus que se expresa en las células tumorales, se generan señales de activación en las plaquetas sin necesidad de componentes del plasma. Se han identificado los dominios críticos de la interacción de Aggrus con CLEC-2 (Documento no de patente 13).

30 Un anticuerpo monoclonal (mAb) puede unirse firme y específicamente a los antígenos de la superficie celular y puede inducir una respuesta inmunológica en la célula diana. Por lo tanto, se utilizan actualmente muchos mAb en terapia para el cáncer. Los mAb que se utilizan en terapia para el cáncer muestran un efecto anti-cáncer por medio de tres modos de acción representativos: neutralización, actividades citotóxica celular dependiente de anticuerpo (ADCC), y citotóxica dependiente de complemento (CDC). Los mAb, que incluyen bevacizumab y cetuximab, podrían neutralizar la activación de la rutas de señalización inhibiendo o la unión del ligando al receptor o la
35 oligomerización del receptor. Debido a que la proliferación del cáncer depende de la activación de las rutas de señalización, la neutralización de la ruta de señalización induce la muerte de células tumorales. Además, los mAb, que incluyen rituximab y trastuzumab, podrían también inducir una respuesta inmunitaria contra las células cancerosas diana por medio de su región del fragmento cristalizante (Fc). Los complementos y células efectoras tales como macrófagos, células citolíticas naturales (NK), y neutrófilos pueden destruir las células cancerosas diana reconociendo la región Fc de los mAb que se unen a antígenos específicos del cáncer. Estos tres modos de acción
40 se especifican por el isotipo, y subclase del anticuerpo, las características del antígeno, y el sitio de reconocimiento.

Se han establecido hasta ahora muchos mAb contra el Aggrus, pero la mayoría de ellos no interfiere en la interacción Aggrus-CLEC-2. Aunque un mAb de rata, denominado NZ-1, se conoce como el mAb contra Aggrus capaz de inhibir
45 la interacción Aggrus-CLEC-2 y la agregación plaquetaria (Documento no de patente 14), sin embargo es un anticuerpo de rata y no se puede examinar con precisión en el modelo de ratón que se utiliza universalmente debido a la barrera entre especies.

Ogasawara S. et al, Characterization of Anti-Podoplanin Monoclonal Antibodies: Critical Epitopes for Neutralizing the Interaction between Podoplanin and CLEC-2, Hybridoma Vol. 27, n. ° 4, 2008, páginas 259-267 enseña que la podoplanina (Aggrus) es una sialoglicoproteína tipo mucina que se sabe que es un marcador útil para el endotelio linfático y células de inicio tumoral (TIC). Se ha informado que la interacción entre la podoplanina y el receptor-2 tipo lectina tipo C (CLEC-2) es crítica para la agregación plaquetaria inducida por la podoplanina y la metástasis del cáncer. Recientemente, se han creado varios anticuerpos anti podoplanina humana; sin embargo, estos anticuerpos anti-podoplanina no están bien
50 caracterizados. Se investigaron cinco anticuerpos anti-podoplanina (NZ-1, D2-40, AB3, 18H5, y un anticuerpo policlonal de conejo) utilizando ELISA, transferencia Western, y citometría de flujo con péptidos de podoplanina sintéticos y mutantes de eliminación de podoplanina recombinante. El epitopo de NZ-1 es el dominio-2/3 de estimulación de la agregación plaquetaria (PLAG); el epitopo de D2-40, AB3, y 18H5 es PLAG1/2. Los epitopos de D2-40 y AB3 son bastante similares, aunque el de 18H5 es diferente del de D2-40 y AB3. Utilizando el análisis de citometría de flujo, el NZ-1 inhibía
55 parcialmente la interacción entre podoplanina y CLEC-2, mientras que los otros anticuerpos no. En conclusión, los dos anticuerpos anti-podoplanina que se utilizan más frecuentemente, D2-40 y AB3, tienen propiedades similares, aunque varios estudios han comunicado diferencias. El NZ-1 neutraliza la interacción entre la podoplanina y CLEC-2, lo cual puede dar lugar al desarrollo de anticuerpos terapéuticos contra la metástasis del cáncer dependiente de podoplanina.

65

Documentos de la técnica anterior

Documentos no de patente

5 [Documento no de patente 1] Kato Y, Kaneko M, Sata M, Fujita N, Tsuruo T, Osawa M. Enhanced expression of Aggrus (T1 α /podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma. *Tumor Biol* 2005; 26: 195-200.

10 [Documento no de patente 2] Martin-Villar E, Scholl FG, Gamallo C et al. Characterization of human PA2.26 antigen (T1 α -2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2005; 113: 899-910.

[Documento no de patente 3] Yuan P, Tenam S, El-Naggar A et al. Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer* 2006; 107: 563-569.

15 [Documento no de patente 4] Wicki A, Lehenbre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G. Tumor invasión in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 2006; 9: 261-272.

[Documento no de patente 5] Kimura N, Kimura I. Podoplanin as a marker for mesothelioma. *Pathol Int* 2005; 55: 83-86.

20 [Documento no de patente 6] Fukunaga M. Expression of D2-40 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumours. *Histopathology* 2005; 46: 396-402.

[Documento no de patente 7] Kato Y, Sasagawa I, Kaneko M, Osawa M, Fujita N, Tsuruo T. Aggrus: a diagnostic marker that distinguishes seminoma from embryonal carcinoma in testicular germ cell tumors. *Oncogene* 2004; 23: 8552-8556.

25 [Documento no de patente 8] Mishima K, Kato Y, Kaneko MK et al. Podoplanin expression in primary central nervous system germ cell tumors: a useful histological marker for the diagnosis of germinoma. *Acta Neuropathol* 2006; 111: 563-568.

[Documento no de patente 9] Mishima K, Kato Y, Kaneko MK, Nishikawa R, Hirose T, Matsutani M. Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression. *Acta Neuropathol* 2006; 111: 483-488.

30 [Documento no de patente 10] Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, Mao L. Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer* 2006; 107: 563-569.

[Documento no de patente 11] Kunita A, Kashima TG, Morishita Y, Fukayama M, Kato Y, Tsuruo T, Fujita N. The platelet aggregation-inducing factor aggrus/podoplanin promotes pulmonary metastasis. *Am J Pathol* 2007; 170: 1337-1347.

35 [Documento no de patente 12] Kato Y, Fujita N, Kunita A, Sato S, Kaneko M, Osawa M, Tsuruo T. Molecular identification of Aggrus/T1 α as a platelet aggregation-inducing factor expressed in colorectal tumors. *J Biol Chem.* 2003; 278: 51599-51605.

40 [Documento no de patente 13] Kato Y, Kaneko MK, Kunita A et al. Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Sci* 2008; 99: 54-61.

45 [Documento no de patente 14] Kato Y, Kaneko MK, Kuno A et al. Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation using a novel anti-podoplanin antibody reacting with its platelet-aggregation-stimulating domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 349: 1301-1307.

50 **Divulgación de la invención**

Problema que va a resolver la invención

55 La presente invención se ha hecho con el fin de proporcionar eficaces componentes de composiciones farmacéuticas que se dirigen contra Aggrus para la terapia del cáncer o la trombosis.

Medios para resolver el problema

60 Como resultado de profundos estudios, los inventores de la presente invención establecieron hibridomas que producen mAb que inhiben la interacción entre Aggrus-CLEC-2 y la agregación plaquetaria. Los inventores encontraron que los mAb producidos por estos hibridomas reconocen los epitopos de Aggrus de una secuencia de aminoácidos que se muestra en la ID de Secuencia 1 (Pro Gly Ala Asp Asp Val Val Thr), ID de Secuencia 3 (Pro Gly Thr Ser Glu Asp), o la ID de Secuencia 4 (Pro Gly Thr Ser Glu Asp Arg Tyr Lys), que los mAb inhiben la interacción Aggrus-CLEC-2 de una manera que depende de la concentración, y que los mAb muestran la capacidad de neutralizar la agregación plaquetaria y capacidad inhibidora de la metástasis pulmonar.

65

Por lo tanto, la presente invención proporciona mAb de ratón y fragmentos funcionales de los mismos (1) que reconocen epítomos de Aggrus representados por las ID de Secuencias 1, 3, o 4.

5 Además, la presente invención proporciona los mAb de acuerdo con (1) o los fragmentos funcionales de los mismos (2) producidos por los hibridomas depositados como FERM BP-11446, FERM BP-11447, PERM BP-11448, o FERM BP-11449.

10 Además, la presente invención proporciona mAb quiméricos murinos/humanos o sus fragmentos funcionales (3) de acuerdo con (1) o (2).

La presente invención proporciona hibridomas con una ID de depósito de FERM BP-11446, FERM BP-11447, FERM BP-11448, o FERM BP-11449 (4).

15 La presente invención proporciona inhibidores de la interacción Aggrus-CLEC-2 (5) que incluyen mAb o fragmentos funcionales de los mismos de acuerdo con (1)-(3).

20 La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas (6) que contienen mAb o los fragmentos funcionales de los mismos que se han descrito en (1)-(3) para su uso en la inhibición de la agregación plaquetaria, la inhibición de la metástasis del cáncer, o para su uso en el tratamiento de tumores o trombosis.

Además, la presente invención proporciona las composiciones farmacéuticas (7) para su uso de acuerdo con (6) en el que la trombosis es un infarto cerebral o un infarto de miocardio.

25 Además, la presente invención proporciona las composiciones farmacéuticas (8) para su uso de acuerdo con (6), en las que el cáncer o tumor es un carcinoma de células escamosas, fibrosarcoma, mesotelioma, sarcoma de Kaposi, tumor de células germinales testiculares, tumor cerebral, o cáncer de vejiga.

30 De manera deseable, la presente invención proporciona las composiciones farmacéuticas (9) para su uso de acuerdo con (8), en el que el cáncer o tumor es un carcinoma de células escamosas, mesotelioma, tumor de células germinales testiculares, o cáncer de vejiga.

Efectos de la invención

35 Los mAb de ratón, denominados P2-0, MS-1, MS-3 o MS-4, producidos por hibridomas establecidos por los presentes inventores reconocen los epítomos de Aggrus de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la ID de Secuencia 1, 3, o 4 cuando se analizan *in vivo* e *in vitro*, e inhiben la unión entre Aggrus-CLEC-2 de una manera que depende de la concentración. Además, los mAb de acuerdo con la presente invención muestran una actividad inhibidora de la agregación plaquetaria y actividad inhibidora de la metástasis pulmonar. Los anticuerpos humanizados (anticuerpos quiméricos murinos/humanos) de acuerdo con la presente invención mostraban actividad

40 inhibidora de la metástasis del cáncer contra las células cancerosas con menor expresión de Aggrus. Los mAb de acuerdo con la presente invención muestran diferente reactividad que un mAb de rata conocido contra una proteína Aggrus nativa, e inesperadamente inhiben la metástasis pulmonar dependiente de Aggrus a una concentración menor que el mAb de rata conocido. Debido a que cada mAb de la presente invención reconoce un epítipo diferente, la utilización de estos anticuerpos tiene una gran ventaja para superar la mutación de resistencia a fármacos que ocurre frecuentemente en el cáncer, utilizando otro anticuerpo. Además, no es necesario considerar la barrera entre especies durante el desarrollo como fármacos antitumorales que utilizan modelos de ratón en los que se implanta un cáncer humano (modelos de xenoinjerto en ratones) debido a que los mAb de la presente invención son mAb de ratón. Aunque se puede generar un anticuerpo quimérico rata/ratón por clonación y la unión de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo de rata con la región Fc del ratón, son

50 necesarios la transfección del vector que expresa el anticuerpo quimérico a células productoras de anticuerpos, tales como las células CHO, y un gran cultivo de transfectantes para la preparación de una gran cantidad de anticuerpo quimérico. En comparación con el caso de preparación de anticuerpo de ratón a partir de ascitis de ratón, el método para cultivar transfectantes en un medio selectivo tiene un coste elevado y puede no ser adecuado para su uso práctico. Por lo tanto, los mAb establecidos por la presente invención tienen especiales beneficios, por ejemplo, para

55 generar composiciones farmacéuticas para el cáncer humano utilizando modelos de xenoinjerto de ratón.

Breve descripción de los dibujos

60 [Figura 1A-1B] La Figura 1 es una representación esquemática que muestra el refinamiento del epítipo reconocido utilizando péptidos sintéticos del mAb P2-0.

[Figura 2] La Figura 2 muestra que el mAb P2-0 inhibe la interacción entre Aggrus-CLEC-2 de una manera que depende de la concentración.

[Figura 3] La Figura 3 muestra que el mAb P2-0 muestra una actividad inhibidora de la agregación plaquetaria.

[Figura 4] La Figura 4 muestra que el mAb P2-0 muestra una actividad inhibidora de la metástasis del cáncer.

65 [Figura 5] La Figura 5 muestra que el mAb P2-0 humanizado (mAb P2-0 quimérico murino/humano) muestra una actividad inhibidora de la agregación plaquetaria.

[Figura 6] La Figura 6 muestra que el mAb P2-0 humanizado (mAb P2-0 quimérico murino/humano) muestra una actividad inhibidora de la metástasis del cáncer.

[Figura 7] La Figura 7 muestra que el mAb P2-0 humanizado (mAb P2-0 quimérico murino/humano) también muestra una actividad anti-metastática contra las células que expresan menos Aggrus (HT1080).

[Figura 8] La Figura 8 muestra que el mAb P2-0 reconoce la proteína Aggrus endógena que se expresa en las líneas celulares de cáncer de vejiga.

[Figura 9] La Figura 9 muestra la diferencia de capacidad de reconocimiento entre el mAb NZ-1 y el mAb P2-0 en un análisis de transferencia Western.

[Figura 10A] La Figura 10A muestra un resultado del análisis del mAb NZ-1 en el análisis FACS que indica una diferencia en la capacidad de reconocimiento entre el mAb NZ-1 (Figura 10A) y el mAb P2-0 (Figura 10B).

[Figura 10B] La Figura 10B muestra un resultado del análisis del mAb P2-0 en el análisis FACS que indica una diferencia en la capacidad de reconocimiento de Aggrus entre el mAb NZ-1 (Figura 10A) y el mAb P2-0 (Figura 10B).

[Figura 11] La Figura 11 muestra la diferencia en la actividad inhibidora de la metástasis pulmonar entre el mAb NZ-1 y el mAb P2-0.

[Figura 12A-12C] La Figura 12 muestra que los mAb MS-1 (Figura 12A), MS-3 (Figura 12B), y MS-4 (Figura 12C) reconocen el Aggrus humano en células CHO a las que se han introducido genes Aggrus humanos por un análisis de citometría de flujo.

[Figura 13A-13B] La Figura 13 muestra un refinamiento del reconocimiento del epítipo de los mAb MS-1, MS-3, o MS-4 utilizando proteínas Aggrus que albergan mutaciones Ala.

[Figura 14A-14D] La Figura 14 muestra la unión entre una proteína recombinante Aggrus humana y P2-0 (Figura 14A), MS-1 (Figura 14B), MS-3 (Figura 14C), o MS-4 (Figura 14D) utilizando resonancia de plasmones superficiales.

[Figura 15A-15B] La Figura 15 muestra que el mAb P2-0, MS-1, MS-3, o MS-4 inhibe la interacción entre Aggrus-CLEC-2.

[Figura 16A-16C] La Figura 16 muestra que el mAb P2-0, MS-1, MS-3, o MS-4 posee una actividad inhibidora de la agregación plaquetaria.

[Figura 17A-17B] La Figura 17 muestra que el mAb MS-1 muestra actividad anti-tumoral contra las células que expresan Aggrus.

[Figura 18A-18B] La Figura 18 muestra que el mAb MS-1 inhibe la metástasis pulmonar espontánea de células que expresan Aggrus humano.

[Figura 19] La Figura 19 muestra que los mAb MS-1 y MS-3 poseen actividad inhibidora de la metástasis pulmonar.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Aggrus se conoce también como gp44, podoplanina y similares.

Un "anticuerpo monoclonal anti-Aggrus" se refiere a un anticuerpo monoclonal o derivado que se une específicamente a Aggrus, e incluye fragmentos del anticuerpo (en la presente memoria descriptiva, denominado "fragmento funcional") que muestra virtualmente la misma especificidad antigénica que el anticuerpo original. El fragmento funcional de anticuerpo incluye los fragmentos funcionales de anticuerpos tales como Fab, Fab', F(ab')₂, un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), un fragmento de la región V estabilizado con disulfuro (dsFv), o un péptido que incluye CDR. El anticuerpo de la presente invención se puede preparar por un método convencional, incluyendo la inmunización de un animal, preferentemente ratones y recolectando las células esplénicas para preparar un hibridoma fusionándolas con células apropiadas, como se explicará posteriormente.

Como ejemplo adecuado del anticuerpo monoclonal de ratón contra Aggrus, se puede dar el anticuerpo monoclonal producido a partir del hibridoma depositado en el Organismo Depositario de Patentes Internacionales del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE-IPOD; Centro N.º 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Saitama 305-8566 Japón) con el ID de depósito FERM BP-11446 de 18 de febrero de 2011, y los hibridomas depositados en el IPOD con los ID de depósito FERM BP-11447, FERM BP-11448 y FERM BP-11449 de 28 de diciembre de 2011. Además, se prefieren otros anticuerpos que tengan características de unión similares como anticuerpos monoclonales anti-Aggrus de la presente invención.

Se puede utilizar favorablemente en la presente invención un anticuerpo humanizado en el cual los anticuerpos de animales no humanos se convierten en un anticuerpo quimérico humano o un anticuerpo humano trasplantado con una CDR utilizando tecnología de recombinación genética. El anticuerpo quimérico humano es un anticuerpo en el que una región variable del anticuerpo (denominada región V de aquí en adelante) es de un anticuerpo de un animal no humano, y una región constante (denominada región C de aquí en adelante) es de un anticuerpo de un ser humano (Morrisson S.L. et al., Proc Natl Acad Sci USA. 81 (21), 6851-6855, 1984), y el anticuerpo con una CDR trasplantada es un anticuerpo en el que la secuencia de aminoácidos de la CDR de la región V del anticuerpo de un animal no humano es trasplantada a una posición apropiada de un anticuerpo humano (Jones P.T. et al., Nature, 321 (6069), 522-525, 1986). El anticuerpo humanizado tiene menos efectos secundarios que los anticuerpos de animales no humanos, cuando se administran a seres humanos, y el efecto del tratamiento con los mismos continúa durante mucho tiempo. Además, el anticuerpo humanizado puede producirse como moléculas de varias maneras

utilizando la tecnología de recombinación genética.

La presente invención proporciona, como otra realización, un inhibidor de la unión Aggrus-CLEC-2 y una composición farmacéutica para la inhibición de la agregación plaquetaria, prevención de la metástasis del cáncer, o tratamiento del tumor o cáncer, que comprende el anticuerpo monoclonal o el fragmento que comprende un fragmento funcional del mismo. La trombosis es preferentemente un infarto cerebral o un infarto de miocardio. El cáncer o tumor es preferentemente un carcinoma de células escamosas, fibrosarcoma, mesotelioma, sarcoma de Kaposi, tumor de células germinales testiculares, tumor cerebral, o cáncer de vejiga. En la memoria descriptiva de la presente invención, el término "cáncer" y "tumor" se utilizan como un término que tiene el mismo significado.

Como tipos de formas de composición farmacéutica se pueden dar, por ejemplo, preparaciones orales tales como píldoras, polvos, bolos, medicinas en polvo, agentes en gránulo fino, cápsulas duras o blandas, revestimientos en película, aglomerados, formulaciones sublinguales y pastas, agentes parenterales tales como fármacos inyectables, supositorios, fármacos transdérmicos, ungüentos, emplastes, y líquidos para uso externo y el experto en la técnica puede seleccionar la forma más adecuada de acuerdo con una vía de administración o una administración dirigida y similares. El anticuerpo monoclonal anti-Aggrus como principio activo puede estar contenido desde un 0,1 a un 99,9 por ciento en peso en la formulación.

La cantidad de administración del principio activo puede ser diferente según dónde se dirija la administración, un órgano diana, una sintomatología, un método de administración y similares, pero en el caso de una administración oral, generalmente a un paciente (60 kg) por día es de aproximadamente 0,1 mg a 1000 mg, preferentemente aproximadamente de 1,0 mg a 100 mg, y más preferentemente de aproximadamente 1,0 mg a 50 mg. En caso de administración parenteral, una única cantidad de administración puede ser diferente según a dónde se dirija la administración, el órgano diana, la sintomatología, el método de administración y similares, pero es preferible administrar, por día, aproximadamente de 0,01 a 30 mg, preferentemente aproximadamente de 0,1 a 20 mg, y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a 10 mg por inyección intravenosa. Sin embargo, la cantidad puede determinarse finalmente de forma arbitraria, por la determinación de un médico o veterinario, que tiene en consideración el tipo de forma, el método de administración, la edad y peso del paciente, la sintomatología del paciente y similares.

En lo sucesivo, la presente invención se explicará en detalle con realizaciones.

Realización 1

Inmunógeno para establecer hibridomas que producen mAb de ratón anti-Aggrus humano

Se clonó una región de ADNc *aggrus* que codificaba el antígeno TT679 (de 14 a.a. localizados en 38-51 de la proteína Aggrus, ID de Secuencia 2: Glu Gly Gly Val Ala Met Pro Gly Ala Glu Asp Asp Val Val) y se conectó repetidamente 8 veces (repetición TT679) en un vector pGEX-6P-3 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Se transformó una *Escherichia coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) con estos vectores y se purificaron las proteínas recombinantes marcadas con GST utilizando Sefarosa Glutión (GE Healthcare).

Sensibilización

Se inmunizaron ratones BALB/c hembra de seis semanas de edad (que se compraron en Charles River Laboratories Japón, Inc., criados de acuerdo con el procedimiento común) por medio de inyecciones subcutáneas en el cuello con el inmunógeno que se obtuvo anteriormente con adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI). Cada dos semanas se llevó a cabo la inmunización intraperitoneal.

Establecimiento de hibridomas

Las células esplénicas recolectadas de acuerdo con el procedimiento común se fusionaron con células P3U1 de mieloma de ratón utilizando polietilenglicol 4000 (Merck, NJ). Las células de hibridoma se cultivaron y se seleccionaron en RPMI 1640 (Sigma) que contenía hipoxantina, aminopterina y timidina. Como resultado se establecieron 15 hibridomas clónicos.

Realización 2

Análisis de los mAb de ratón anti-Aggrus humano

Verificación por transferencia Western

Entre los hibridomas productores de mAb anti-Aggrus, se depositó un hibridoma que producía el mAb P2-0 en el Organismo Depositario de Patentes Internacionales del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación el 18 de febrero de 2011, y se le asignó un ID de depósito FERM BP-11446 (idéntico al ID de depósito FERM P-22069). Se confirmó que el mAb P2-0 reconocía el Aggrus humano por análisis de citometría de flujo y transferencia western.

Además, cuando se llevó a cabo la transferencia western utilizando mutantes de Aggrus preparados con una ID de secuencia de aminoácidos 2 deficiente, el mAb P2-0 no podía reconocer a los mismos.

Realización 3

5

Exploración del epítipo

Como se muestra en la Figura 1, se examinó la reactividad del mAb P2-0 con varios péptidos por síntesis química por el método ELISA. Como resultado, el mAb P2-0 mostraba una alta reactividad contra un péptido que contenía una secuencia de 44-52 aminoácidos (ID de Secuencia 1).

10

Realización 4

Ensayo de inhibición de la interacción entre Aggrus-CLEC-2

15

Utilizando proteínas Aggrus y CLEC-2 recombinantes preparadas a partir de células de mamífero, se detectó la interacción entre Aggrus-CLEC-2 por el método de ELISA. Los efectos de la interacción entre Aggrus-CLEC-2 se examinaron bajo la presencia de mAb contra Aggrus. Como se muestra en la Figura 2, el mAb P2-0 inhibía la interacción Aggrus-CLEC-2 de una manera que dependía de la concentración.

20

Realización 5

Ensayo de inhibición de la agregación plaquetaria

25

Aunque se sabía que las células CHO parentales y CHO/falsas eran incapaces de inducir agregación plaquetaria, las células CHO que sobre-expresan Aggrus (CHO/Aggrus) inducían agregación plaquetaria. En un análisis de agregación plaquetaria *in vitro* controlando la transmitancia lumínica, se comparó el tiempo desde el punto de inicio de la reacción hasta alcanzar la mitad del punto del valor máximo. Como se muestra en la Figura 3, la agregación plaquetaria inducida por Aggrus se atenuó con la adición del anticuerpo P2-0 de una manera que dependía de la concentración.

30

Realización 6

Ensayo de inhibición de la metástasis pulmonar

35

Se examinaron los efectos de los mAb sobre la metástasis pulmonar experimental *in vivo* de células CHO inyectadas por vía intravenosa a las que se había introducido un gen Aggrus humano. Se sabe que las células CHO muestran la capacidad de metástasis a partir de la expresión forzada de Aggrus. Como se muestra en la Figura 4, el mAb P2-0 muestra una actividad inhibitoria de la metástasis pulmonar extremadamente alta con la administración concurrente de cantidades extremadamente pequeñas tales como de 0,1 mg/ratón, lo que indica que el mAb P2-0 poseía una actividad inhibitoria de metástasis hematogena dependiente de Aggrus así como una capacidad de neutralizar a Aggrus.

40

Realización 7

45

Generación y verificación del anticuerpo humanizado (quimérico murino/humano)

Con el fin de poner en uso práctico, se generó un anticuerpo P2-0 humanizado (anticuerpo P2-0 quimérico murino/humano) clonando la región variable de P2-0 y uniendo la misma según el procedimiento común con la región constante de una IgG1 humana. Se confirmó que el anticuerpo P2-0 humanizado (anticuerpo P2-0 quimérico murino/humano) reconocía el Aggrus de simio. Al igual que el anticuerpo P2-0 original, el anticuerpo P2-0 humanizado (anticuerpo P2-0 quimérico murino/humano) mostraba inhibición de la agregación plaquetaria (Fig. 5) y actividad inhibitoria de la metástasis (Fig. 6). Como se muestra en la Figura 7, el anticuerpo P2-0 humanizado (anticuerpo P2-0 quimérico murino/humano) también muestra actividad inhibitoria de metástasis en células que expresan poco Aggrus (células HT1080).

50

55

Realización 8

Exploración de un cáncer que expresa Aggrus y comparación del mAb anti-Aggrus de rata (anticuerpo NZ-1)

60

Por el método de PCR en tiempo real utilizando moldes de ADNc (Panel TissueScan cDNA disponible en el comercio en OriGene) que se prepararon a partir de muestras clínicas de cáncer de vejiga, frecuentemente se identificó la regulación positiva de la expresión de Aggrus en el cáncer de vejiga.

65

Por lo tanto, se examinó por transferencia western el reconocimiento del mAb P2-0 contra la proteína Aggrus que se expresa en las células de cáncer de vejiga humano. Como se muestra en la Figura 8, el mAb P2-0 reconocía la

proteína Aggrus (carril 2-5) que se expresaba en la superficie de la membrana de cada tipo de célula de cáncer de vejiga humano. Por otro lado, el anticuerpo D2-40 adquirido (mAb de ratón anti-Aggrus humano) solo reconocía las células CHO a las que se había introducido genes de Aggrus humano (carril 1), pero no el Aggrus que se expresaba en la superficie de la membrana de las células de cáncer de vejiga humano. Además, se recolectaron células CHO en las que se habían introducido los genes de Aggrus humano y varias líneas celulares de cáncer de vejiga humano con tripsinización que es con una proteinasa (Figura 9; carril 7-9) o sin tripsinización (Figura 9, carril 12-15), se llevó a cabo la SDS-PAGE de cada lisado celular, y se llevó a cabo la transferencia western con el anticuerpo P2-0, anticuerpo NZ-1 y anticuerpo de actina para confirmar la cantidad de proteína. Como se muestra en la Figura 9, el mAb P2-0 reconocía la proteína Aggrus que se expresa en la superficie de la membrana de las células de cáncer de vejiga humano, pero el mAb NZ-1 solo podía reconocer el Aggrus que se expresaba en las células CHO en las que se había introducido el Aggrus humano (Fig. 9: carril 6), de esta manera es evidente que el mAb NZ-1 no reconoce el Aggrus nativo que se expresa en la superficie de la membrana de las células de cáncer de vejiga humano.

En este estudio, se demostró que la reactividad del mAb P2-0 contra la proteína Aggrus nativa que se expresa en el cuerpo vivo era mayor, comparada con la de cualquier mAb anti-Aggrus humano (incluyendo el NZ-1) que se conociera hasta ahora, lo que indica que el mAb P2-0 es un anticuerpo que podría reconocer el Aggrus que se expresa en múltiples tipos de cáncer. Por lo tanto, el mAb P2-0 tendría efectos muy superiores en un uso dirigido contra Aggrus.

Además, los resultados de la transferencia western mencionada anteriormente se confirmaron por análisis FACS. Las células T24 de cáncer de vejiga humano se recolectaron sin tripsina, que es una proteinasa, y las células se incubaron con el anticuerpo NZ-1 o anticuerpo de rata que es un anticuerpo de control del mismo durante 1 hora a 4°C. Tras el lavado del exceso de anticuerpos con PBS, se incubaron las células con anti-IgG de rata marcado con Alexa flúor 488 como anticuerpo secundario durante 1 hora a 4 °C. Tras el lavado del exceso de anticuerpos de nuevo con PBS, se analizaron las células con el sistema de citometría de flujo FC500 Cytomics (Beckman-Coulter). Los resultados se muestran en la Figura 10A.

Por otro lado, las células T24 recolectadas que se mencionaron anteriormente se incubaron con mAb P2-0 o anticuerpo de ratón como anticuerpo de control del mismo durante 1 hora a 4 °C. Tras el lavado del exceso de anticuerpos con PBS, las células se incubaron con anti-IgG de ratón marcado con Alexa flúor 488 durante 1 hora a 4 °C. Tras el lavado con PBS de nuevo, las células se analizaron en el sistema de citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 10B. Como se muestra en las Figuras 10A y 10B, el mAb NZ-1 no reconocía el Aggrus que se expresaba en las células T24 de cáncer de vejiga humano, pero el mAb P2-0 reconocía al mismo.

Se examinaron *in vivo* los efectos de los mAb P2-0 y NZ-1 sobre la metástasis pulmonar experimental de las células CHO en las que se ha introducido genes de Aggrus humano. Como se muestra en la Figura 11, la administración del mAb P2-0 muestra un efecto inhibitorio de la metástasis pulmonar en comparación con el grupo de administración del anticuerpo de control con una cantidad extremadamente pequeña de 0,01 o 0,001 mg/ratón. Es evidente que, aunque la administración de 0,1 mg/ratón del mAb NZ-1 inhibía la metástasis pulmonar, la administración de una pequeña cantidad de 0,01 o 0,001 mg/ratón podía no mostrar actividad inhibitoria comparada significativamente con el anticuerpo de control. Estos resultados indicaban que el mAb P2-0 es superior en el reconocimiento y en la inhibición funcional del Aggrus y que el mAb P2-0 posee una ventaja en su uso experimental y clínico.

Realización 9

Inmunógeno para establecer hibridomas que producen mAb de ratón anti-Aggrus humano

Se clonó una región de ADNc de *aggrus* que codificaba el antígeno PP4626 (21 a.a. localizados en 42-62, ID de Secuencia 5: Ala Met Pro Gly Ala Glu Asp Asp Val Val Thr Pro Gly Thr Ser Glu Asp Arg Tyr Lys Ser) y se conectó repetidamente dieciocho veces en un vector pGEX-6P-3 (GE Healthcare). Se transformó *Escherichia coli* BL21 (Invitrogen) con estos vectores, y las proteínas recombinantes marcadas con GST se purificaron utilizando Sefarosa Glutatión (GE Healthcare).

Sensibilización

Se inmunizaron ratones BALB/c hembras de seis semanas de edad (que se compraron en Charles River Laboratories Japan, Inc., y criados de acuerdo con el procedimiento común) mediante inyecciones subcutáneas en el cuello con el inmunógeno obtenido anteriormente con TiterMax Gold (TiterMax USA, Inc). Cada dos semanas, se llevó a cabo la inmunización intraperitoneal.

Establecimiento de hibridomas

Se obtuvieron las células esplénicas de acuerdo con el procedimiento común, y se fusionaron con las células P3U1 de mieloma de ratón utilizando polietilenglicol 4000 (Merck). Las células de hibridoma se cultivaron y seleccionaron en medio de clonación S-Clone (Eidia Co., Ltd.) que contenía hipoxantina, aminopterina y timidina. Como resultado, se establecieron una pluralidad de hibridomas.

Realización 10

Análisis de mAb de ratón anti-Aggrus humano. Verificación por citometría de flujo

- 5 Entre los anticuerpos que se obtuvieron a partir de los hibridomas mencionados anteriormente, se depositaron los hibridomas que producían el mAb MS-1, MS-3, o MS-4 en el Organismo Depositario de Patentes Internacionales del Instituto Nacional del Tecnología y Evaluación el 28 de diciembre de 2011 (con los ID de depósito asignados FERM BP-11447, FERM BP-11448, y FERM BP-11449 respectivamente). Se confirmó que MS-1, MS-3 y MS-4 reconocían el Aggrus humano por análisis de citometría de flujo utilizando células CHO en las que se había introducido un gen
- 10 Aggrus humano. Específicamente, las células CHO transfectadas establemente con un gen Aggrus humano se recolectaron del recipiente de cultivo, y tras un lavado con PBS y el ajuste a una concentración celular de 2×10^6 células/ml, se incubaron con los mAb MS-1, MS-3 y MS-4 durante 30 min en hielo. Tras el lavado de las células con PBS, las células se incubaron con anti-IgG de ratón marcado con Alexa flúor 488 y se dejaron reaccionar durante 30 min en hielo. Tras lavar las células tres veces con PBS, se llevó a cabo el análisis en un Cytomics FC500 (Beckman Coulter). Los resultados se muestran en la Figura 12.

Realización 11

Análisis del epítipo

- 20 Clonando el ADNc de Aggrus humano al que se había retirado el codón correspondiente al péptido de señal en el vector pGEX-6P3, y reemplazando uno a uno el codón correspondiente a los aminoácidos 37 a 62 con el codón correspondiente de alanina utilizando el kit de mutagénesis de sitio dirigido QuickChange (Stratagene), se prepararon distintos vectores que expresaban variantes de alanina de Aggrus. Se transfectaron *E. coli* TOP 10F' con cada vector, y se preparó la muestra homogeneizada tras el cultivo utilizando estas muestras, se llevó a cabo la transferencia western y se analizó la reactividad de la proteína Aggrus recombinante para P2-0, MS-1, MS-3, y MS-4,
- 25 respectivamente. Como resultado, como se muestra en el panel superior de la Figura 13, el mAb P2-0 mostraba una alta reactividad contra Gly⁴⁵, Asp⁴⁸, y Asp⁴⁹ de la proteína Aggrus humana, lo que indica que el mAb P2-0 reconoce la secuencia de aminoácidos que se muestra en la ID de Secuencia 1. El mAb MS-1 mostraba una alta reactividad contra Gly⁴⁵ y Asp⁴⁸ de la proteína Aggrus humana, lo que indica que el mAb MS-1 reconoce la secuencia de aminoácidos que se muestra en la ID de Secuencia 1. El mAb MS-3 mostraba una alta reactividad a Gly⁵⁴, Thr⁵⁵, y Asp⁵⁸ de la proteína Aggrus humana, lo que indica que el mAb MS-3 reconoce la secuencia de aminoácidos que se muestra en la ID de Secuencia 3. El mAb MS-4 mostraba una alta reactividad contra Pro⁵³, Thr⁵⁵, Glu⁵⁷, Asp⁵⁸, y Lys⁶¹ de la proteína Aggrus humana, lo que indica que el mAb MS-4 reconoce la secuencia de aminoácidos que se muestra en la ID de Secuencia 4.
- 30 Se muestra una vista esquemática del reconocimiento del epítipo de los anticuerpos P2-0, MS-1, MS-3, y MS-4 en el panel inferior de la Figura 13. En el reconocimiento del epítipo de la secuencia primaria de Aggrus humana, los aminoácidos que se muestran en letra negrita blanca son los sitios de reconocimiento de los mAb. Los sitios solapados por elipses muestran las regiones críticas de reconocimiento por los anticuerpos de la Aggrus humana.

40 Realización 12

Afinidad de unión de los anticuerpos a la proteína Aggrus recombinante humana utilizando resonancia de plasmón superficial

- 45 Se llevó a cabo la medición de la afinidad de unión a la proteína Aggrus recombinante humana de P2-0, MS-1, MS-3 y MS-4 utilizando el analizador de resonancia de plasmones superficiales sistema Biacore X100 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). La proteína Aggrus recombinante se unió covalentemente a un chip sensor CM5 revestido con carboximetil dextrano por el método de acoplamiento de amina. Los niveles finales de inmovilización eran aproximadamente de 2000 unidades de respuesta. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C con un caudal constante de 30 µl/min, con tampón HBS-EP+ (10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,05 % v/v de Tensioactivo P20). Los anticuerpos P2-0, MS-1, MS-3, y MS-4 se diluyeron utilizando el tampón HBS-EP+ a 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM y 6,25 nM, respectivamente, se pasaron sobre el chip sensor CM5 con la proteína Aggrus recombinante humana inmovilizada durante 60 segundos, para observar la reacción de unión, y se pasó el tampón HBS-EP+ solo durante 120 segundos para observar la reacción de disociación. Se analizaron los sensorgramas que se obtuvieron de las mediciones utilizando el software de evaluación Biacore X100 de modelos de analitos bivalentes, y se determinó la constante de disociación (K_D). Como se muestra en la Figura 14, la constante de disociación de P2-0 con la proteína Aggrus recombinante humana era de $9,3 \times 10^{-9}$ M, la constante de disociación de MS-1 era de $9,0 \times 10^{-9}$, la constante de disociación de MS-3 era de $6,3 \times 10^{-9}$ M, y la constante de disociación del mAb MS-4 era de $2,0 \times 10^{-6}$ M, respectivamente.

60 Realización 13

Ensayo de inhibición de la interacción entre Aggrus-CLEC-2

- 65 Utilizando proteínas Aggrus y CLEC-2 recombinantes preparadas a partir de células de mamífero, se detectó la interacción entre Aggrus-CLEC-2 por el método ELISA. Se examinaron los efectos de los mAb anti-Aggrus contra la

interacción Aggrus-CLEC-2. Como se muestra en el panel superior de la Figura 15, los mAb P2-0 y MS-1 inhibían la interacción entre Aggrus-CLEC-2 de una manera que dependía de la concentración. Además, como se muestra en el panel inferior de la Figura 15, los mAb MS-3 y MS-4 inhibían la interacción entre Aggrus-CLEC-2 a altas concentraciones de 40 µg/ml u 80 µg/ml, respectivamente.

5 Realización 14

Ensayo de inhibición de la agregación plaquetaria

10 Se sabe que cuando se introduce en una célula CHO que es incapaz de producir agregación plaquetaria un gen Aggrus humano, el mismo induce la agregación plaquetaria. Se llevó a cabo el análisis de agregación plaquetaria *in vitro* con control de la transmitancia lumínica con un MCM HEMA TRACER 313M (MC Medical), y se comparó el tiempo desde el punto de inicio de la reacción hasta que se alcanzaba el 50 % de la tasa de agregación máxima. Como se muestra en la Figura 16, la agregación inducida por las células CHO en las que se introdujo el Aggrus humano alcanzaba la tasa del 50 % de agregación tras 2 a 3,5 minutos desde el punto de inicio de la reacción en presencia del anticuerpo de control (IgG de ratón (dializada con PBS con el N.º de catálogo I5381 de Sigma)), mientras que la misma se atenuaba hasta 11 a 19 minutos tras el punto de inicio de la reacción en presencia del anticuerpo P2-0. Además, la misma se atenuaba hasta 9 minutos tras el punto de inicio de la reacción en presencia de MS-2, se atenuaba hasta 14,5 minutos tras el punto de inicio de la reacción en presencia de MS-3, y 10 minutos tras el punto de inicio de la reacción en presencia de anticuerpos MS-4. Por lo tanto, se demuestra que los mAb P2-0, MS-1, MS-3, y MS-4 tienen una actividad de inhibición de la agregación plaquetaria dependiente de Aggrus.

Realización 15

25 Ensayo de actividad antitumoral

Se inocularon por vía subcutánea células CHO en las que se había introducido un gen Aggrus humano en la espalda de doce ratones BALB/C-*nu/nu* desnudos con un número de células de 1×10^5 células por ratón, y los doce ratones se separaron en dos grupos de seis ratones cada uno. Fijando el día del trasplante celular como Día 0, se aplicaron tres veces a cada grupo el anticuerpo de control (IgG2a de ratón (dializada con PBS con el N.º de catálogo M9144 de Sigma)) y el anticuerpo MS-1 el Día 1, Día 5 y Día 9. La cantidad de administración del anticuerpo era de 30 µg/ratón, y se seleccionó la vena caudal lateral como vía de administración. El volumen tumoral se midió dos veces por semana, y se determinó el efecto anti-tumoral del anticuerpo MS-1 midiendo el mismo hasta 30 días tras la inoculación subcutánea. Como se muestra en la Figura 17, el crecimiento tumoral se observó en cinco de los seis ratones del grupo tratado con el anticuerpo de control, y con un volumen tumoral medio a día 30 que era de aproximadamente 1.200 mm³. Por otro lado, los tumores en dos de los seis ratones habían desaparecido y los tumores se habían reducido en tres ratones del grupo tratado con el anticuerpo MS-1, y el volumen tumoral medio a día 30 era de 400 mm³. Estos resultados indicaban que el mAb MS-1 ejerce una actividad anti-tumoral contra las células que expresan Aggrus humano. Se muestran fotografías representativas de los ratones y tumores a Día 18 en el panel derecho de la Figura 17. Los números 1 a 6 representan los ratones que se corresponden con los de cada gráfico.

Realización 16

45 Ensayo de inhibición de la metástasis espontánea

Cuando se inoculaban por vía subcutánea células CHO en las que se había introducido Aggrus humano, se sabe que las mismas muestran metástasis pulmonar espontánea tras 30 días del trasplante. Por lo tanto, se extrajeron los pulmones de los ratones inoculados con el tumor que se utilizaron en el ensayo de actividad antitumoral a los 30 días del trasplante, se lavaron con PBS, se tiñeron con una solución saturada de ácido picrico, y se hizo un recuento de los focos metastáticos de la superficie pulmonar. Se muestra un gráfico del número de focos metastáticos en la superficie pulmonar en el panel superior de la Figura 18. Se muestran fotografías representativas de los pulmones de los ratones teñidos con ácido picrico en el panel inferior de la Figura 18. Mientras que se observaba una media de aproximadamente 30 focos metastáticos en la superficie pulmonar en el grupo tratado con el anticuerpo de control (IgG2a de ratón (dializada con PBS con el N.º de catálogo M9144 de Sigma)), el grupo tratado con el mAb MS-1 inhibía completamente la formación de focos de metástasis en cinco de los 6 ratones. Estos resultados indican que el mAb MS-1 es un mAb anti-Aggrus que inhibe la metástasis pulmonar espontánea dependiente de Aggrus.

Realización 17

60 Ensayo de inhibición de metástasis pulmonar

Se sabe que cuando se inyectan células CHO en las que se ha introducido Aggrus humano, en la vena caudal lateral de ratones BALB/c *nu/nu* desnudos, se forman focos metastáticos en pulmón aproximadamente a los 20 días de la inyección. Como tal, un día antes de la inyección celular, se administraron el anticuerpo de control (IgG2a de ratón (dializada con PBS con el N.º de catálogo M9144 de Sigma)), el anticuerpo MS-1 y el anticuerpo MS-3 por medio de

la vena caudal lateral a cada uno de ocho ratones desnudos y se examinó la influencia sobre la metástasis pulmonar experimental dependiente de Aggrus. Como se muestra en la Figura 19, la metástasis pulmonar de células CHO con Aggrus introducido se suprimía significativamente con la administración anterior de mAb MS-1 o MS-3 de una manera que dependía de la concentración. Estos resultados indicaban que los mAb MS-1 y MS-3 poseen una actividad inhibidora de la metástasis pulmonar dependiente de Aggrus así como una capacidad de neutralizar al Aggrus.

ID de depósito

10 FERM BP-11446
FERM BP-11447
FERM BP-11448
FERM BP-11449

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> JAPANESE FOUNDATION FOR CANCER RESEARCH

20 <120> Un anticuerpo monoclonal anti aggrus

<130> FP3425PCT

<150> JP2011-062686

<151> 22-03-2011

25 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.1

30 <210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> péptido diseñado

<400> 1

Pro Gly Ala Glu Asp Asp Val Val Thr
1 5

40 <210> 2

<211> 14

<212> PRT

45 <213> Artificial

<220>

<223> péptido diseñado

50 <400> 2

Glu Gly Gly Val Ala Met Pro Gly Ala Glu Asp Asp Val Val
1 5 10

55 <210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

60 <220>

<223> péptido diseñado

<400> 3

Pro Gly Thr Ser Glu Asp
1 5

5
<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

10
<220>
<223> péptido diseñado
<400> 4

Pro Gly Thr Ser Glu Asp Arg Tyr Lys
1 5

15
<210> 5
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

20
<220>
<223> péptido diseñado
<400> 5

Ala Met Pro Gly Ala Glu Asp Asp Val Val Thr Pro Gly Thr Ser Glu
1 5 10 15

25
Asp Arg Tyr Lys Ser
20

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal de ratón o un fragmento funcional del mismo, que reconoce un epítipo de Aggrus que comprende una secuencia de aminoácidos representada por una ID de Secuencia 1, 3 o 4.
- 5
2. El anticuerpo monoclonal o el fragmento funcional del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento se producen a partir de hibridomas con un ID de depósito FERM BP-11446, FERM BP-11447, FERM BP-11448 o FERM BP-11449.
- 10
3. El anticuerpo monoclonal o el fragmento funcional del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento están humanizados.
4. Un hibridoma con ID de depósito FERM BP-11446, FERM BP-11447, FERM BP-11448 o FERM BP-11449.
- 15
5. Un inhibidor de la unión Aggrus-CLEC-2 que comprende el anticuerpo monoclonal o el fragmento funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20
6. Una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo monoclonal o el fragmento funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en la prevención de la agregación plaquetaria, la inhibición de metástasis del cáncer o para su uso en el tratamiento de tumores o trombosis.
7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la trombosis es un infarto cerebral o un infarto de miocardio.
- 25
8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el cáncer o el tumor son carcinoma de células escamosas, fibrosarcoma, mesotelioma, sarcoma de Kaposi, tumor de células germinales testiculares, tumor cerebral o cáncer de vejiga.
- 30
9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el cáncer o el tumor son carcinoma de células escamosas, mesotelioma, tumor de células germinales testiculares o cáncer de vejiga.

FIG.1A

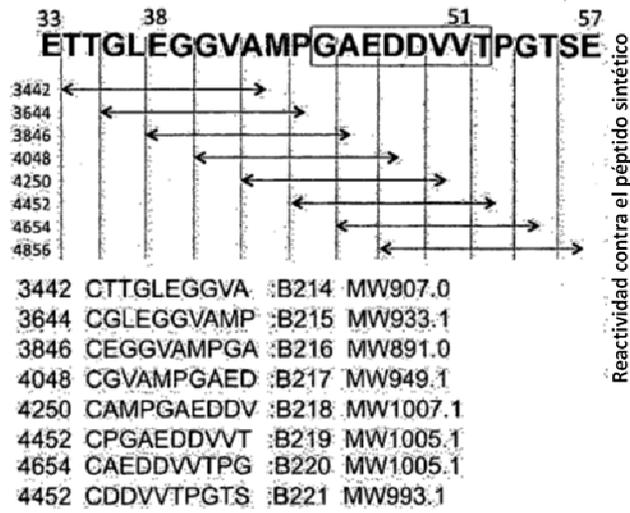


FIG.1B

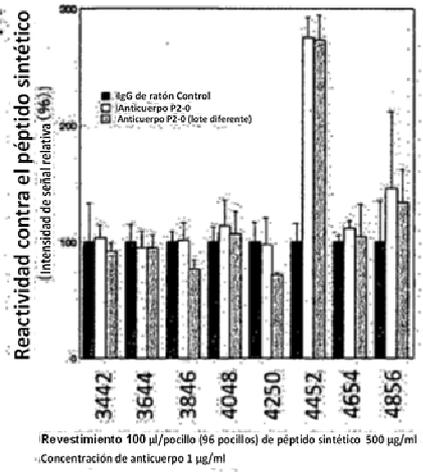


FIG. 2

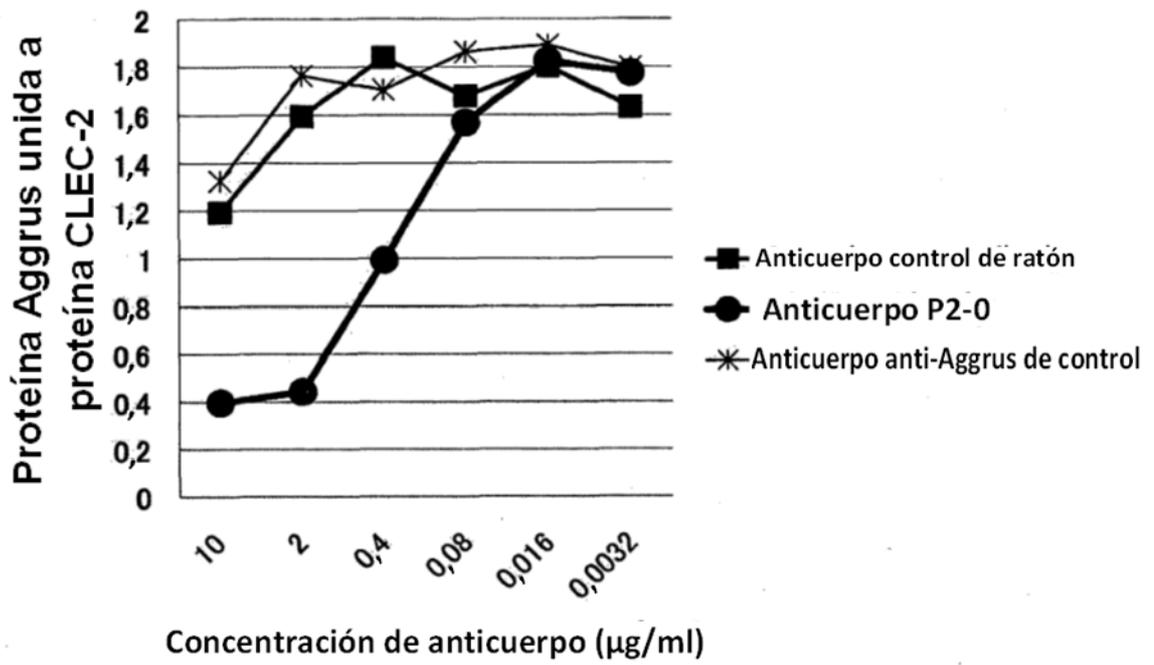


FIG. 3

	Tiempo desde el punto de inicio de la reacción hasta la mitad del punto de valor máximo
Anticuerpo de control 10 μ g/ml	2,5 min
Anticuerpo P2-0 10 μ g/ml	9 min
Anticuerpo P2-0 1 μ g/ml	5 min
Anticuerpo anti-Aggrus de control 10 μ g/ml	4 min
Anticuerpo anti-Aggrus de control 1 μ g/ml	4 min

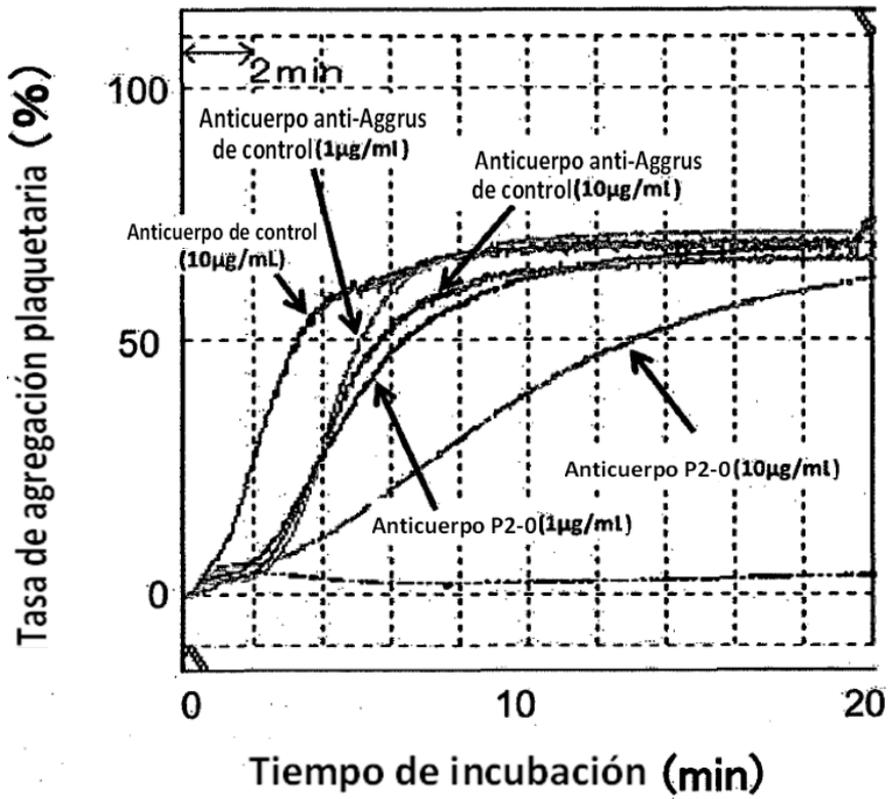


FIG. 4

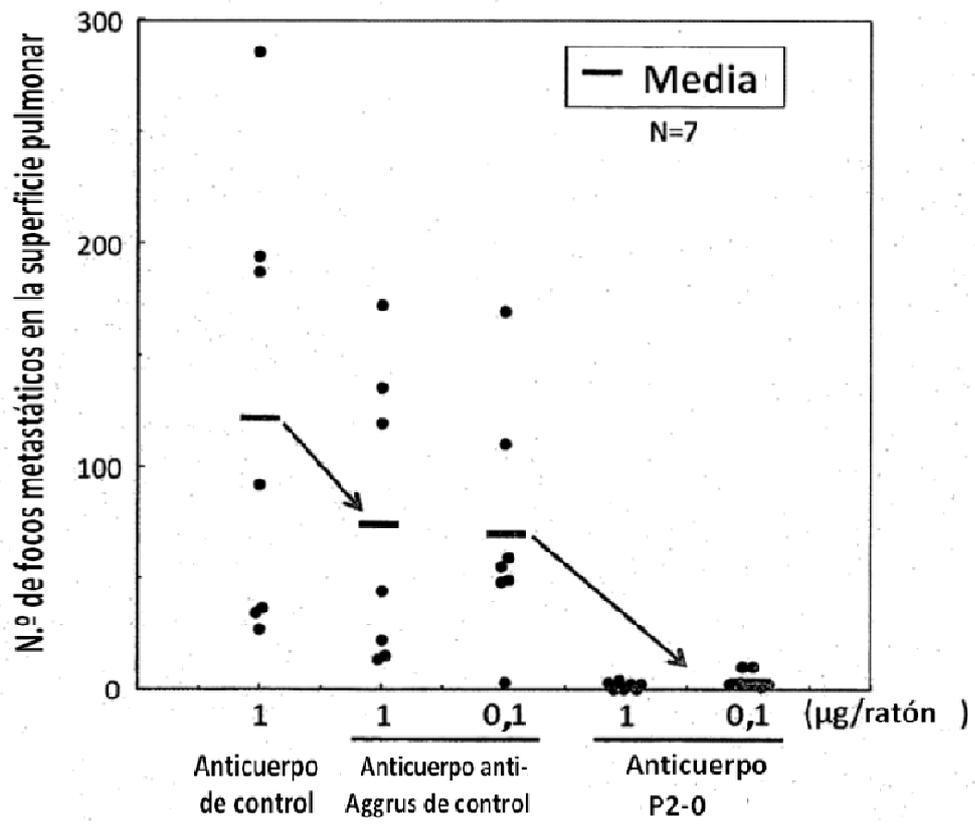


FIG. 5

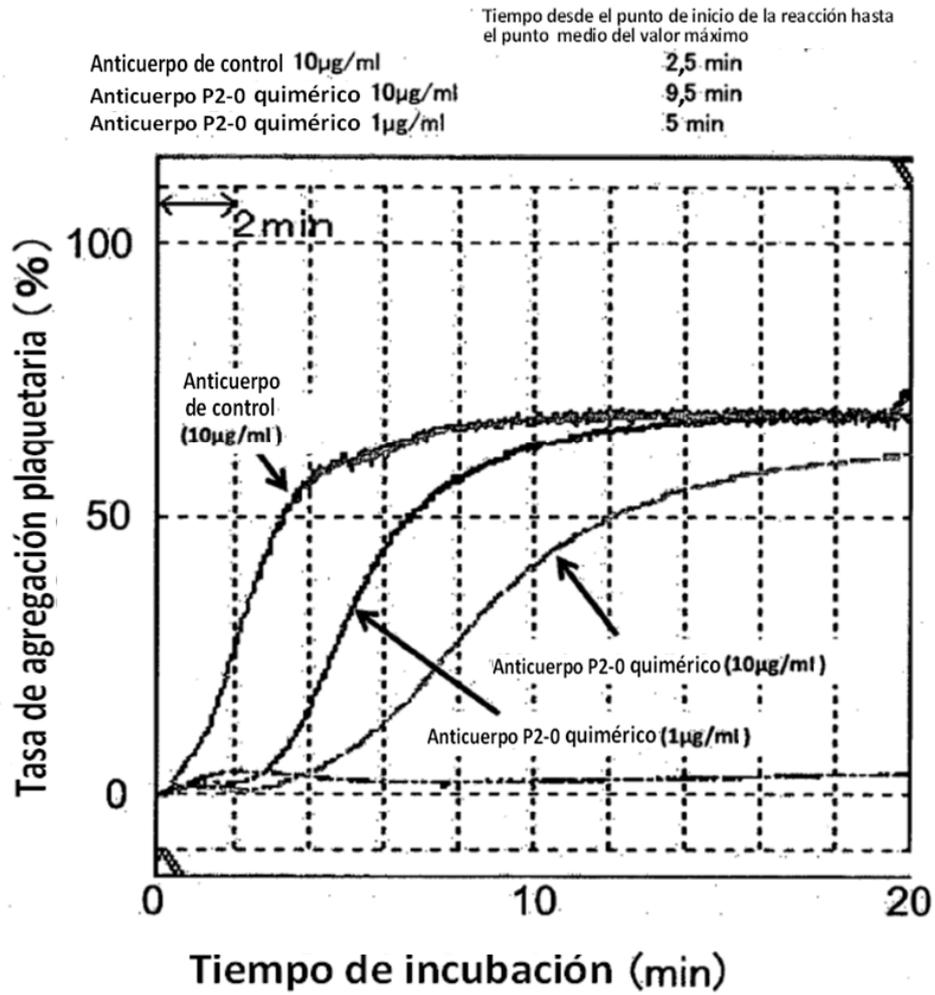


FIG. 6

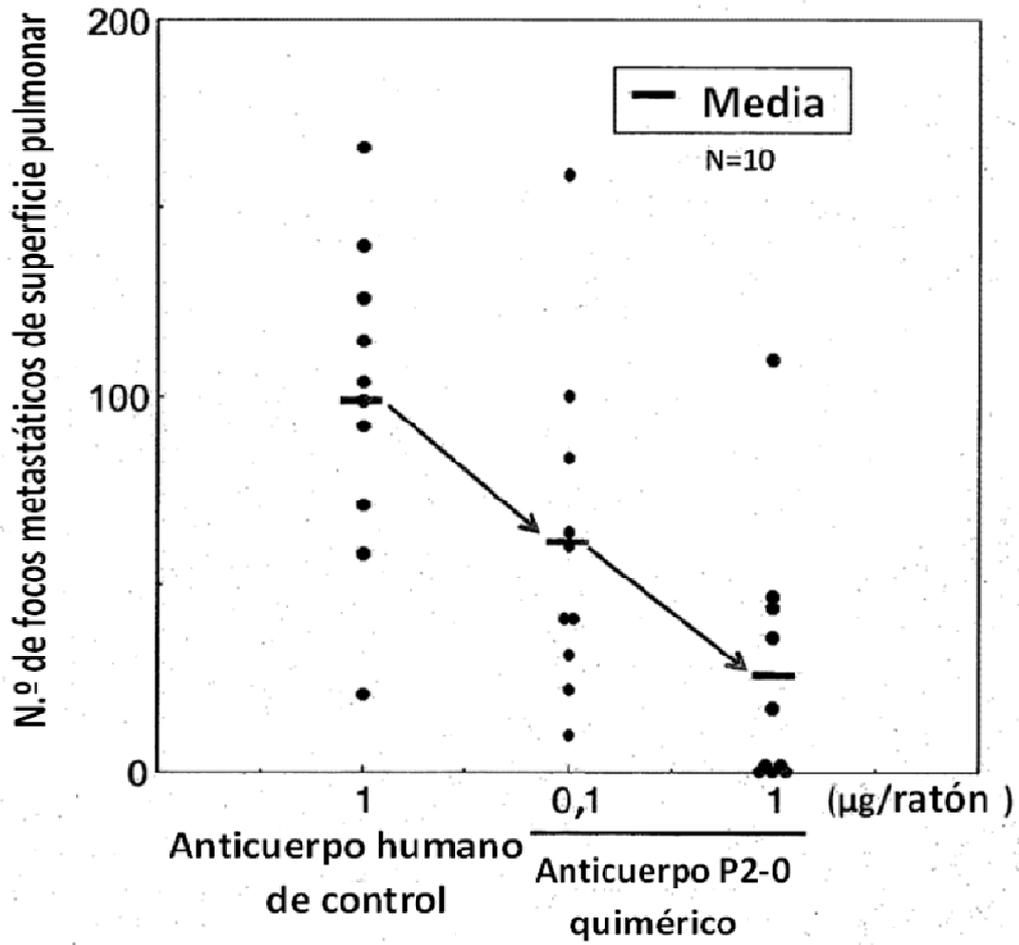


FIG. 7

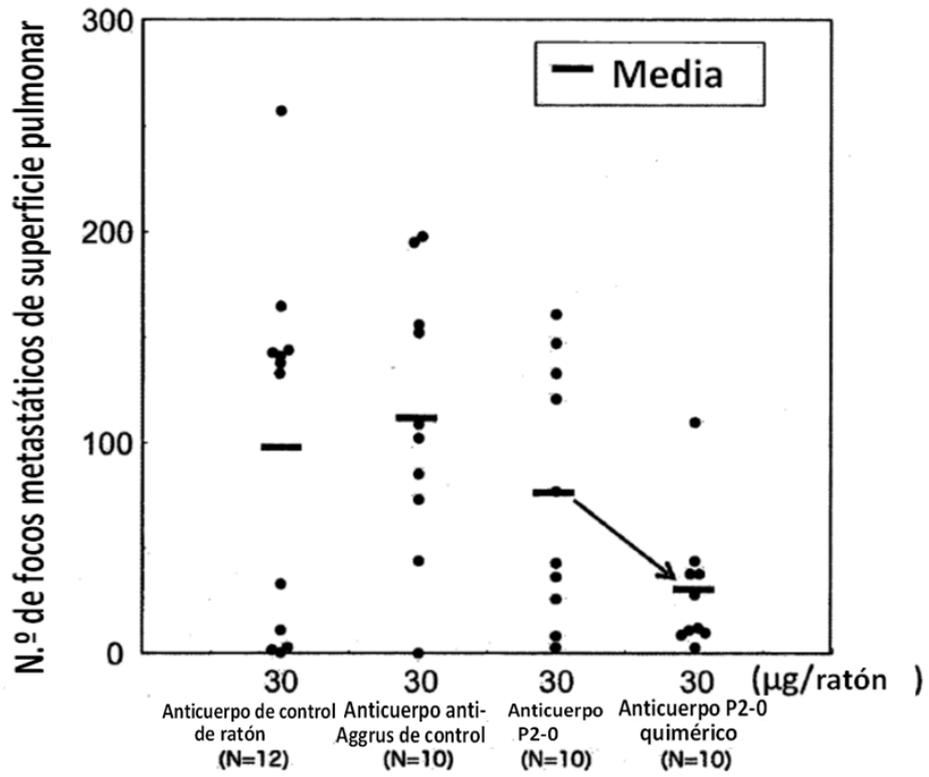


FIG. 8

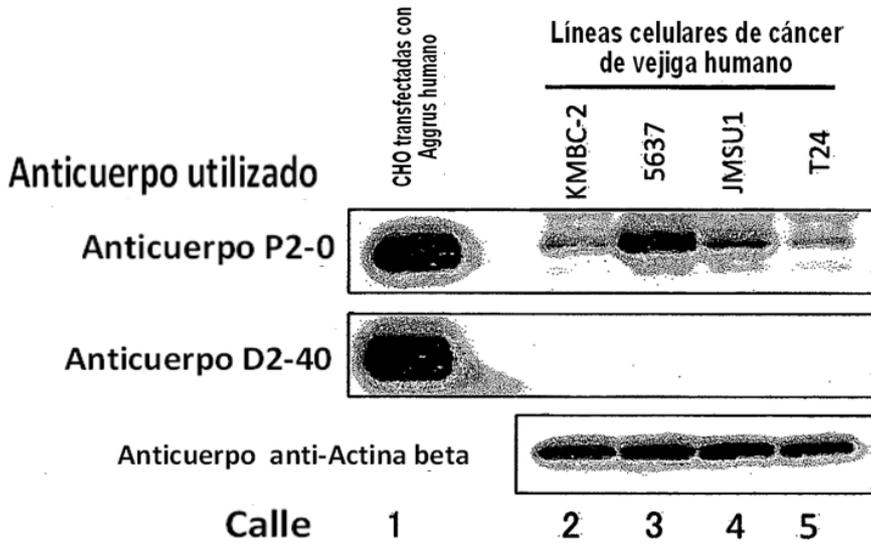


FIG. 9

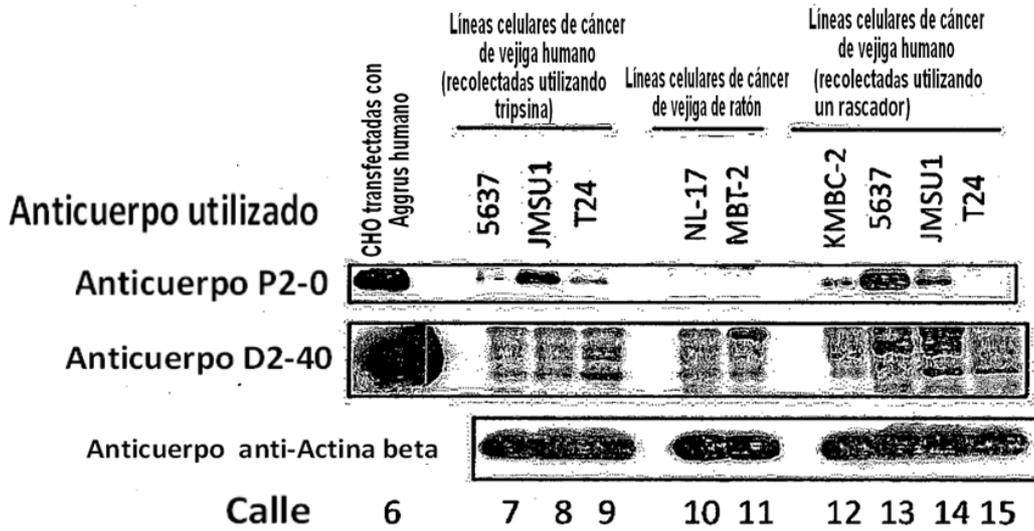


FIG. 10A

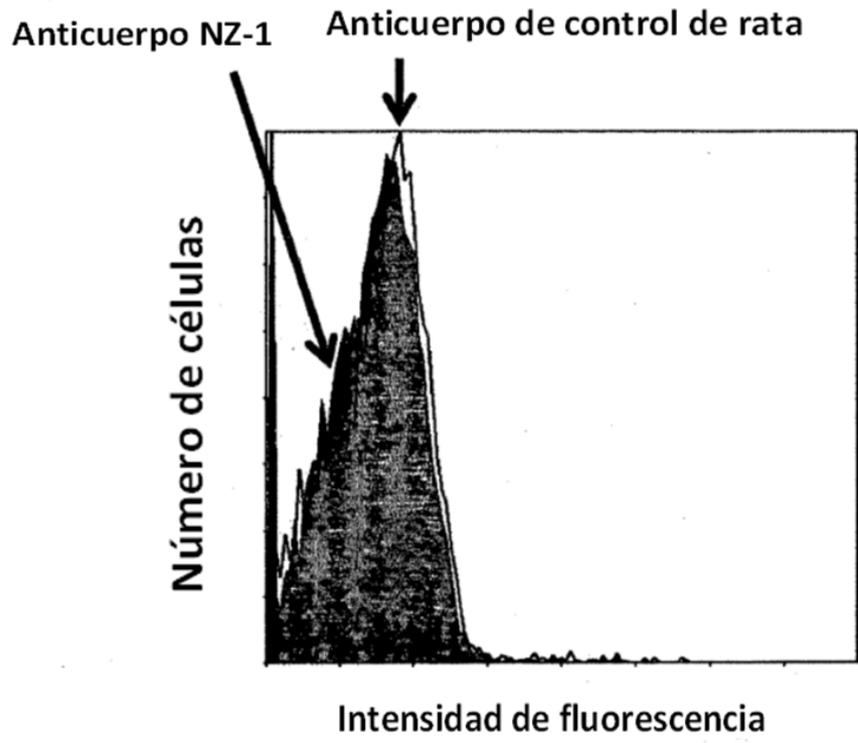


FIG. 10B

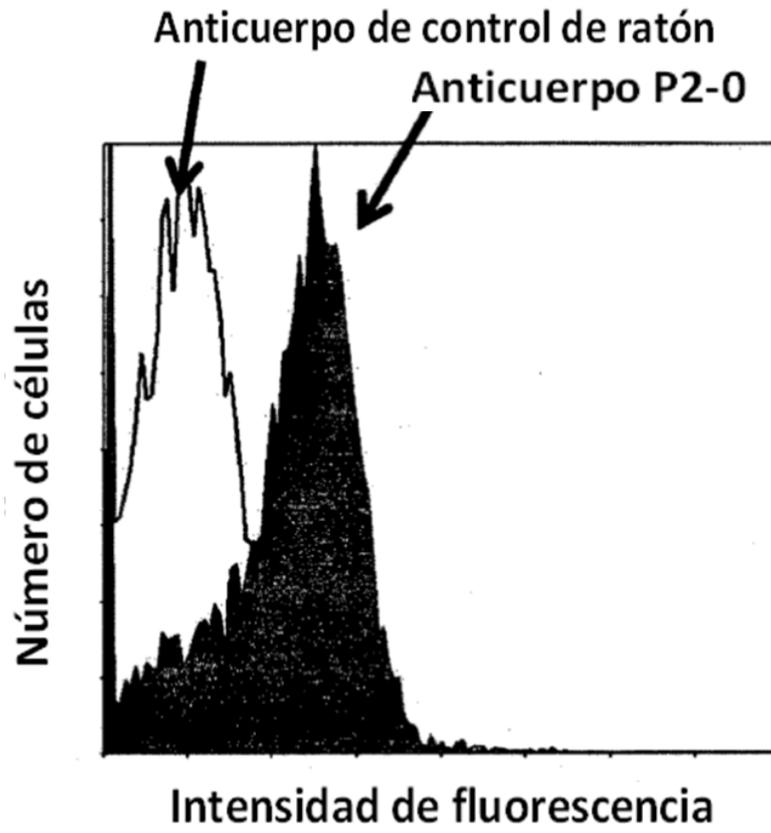
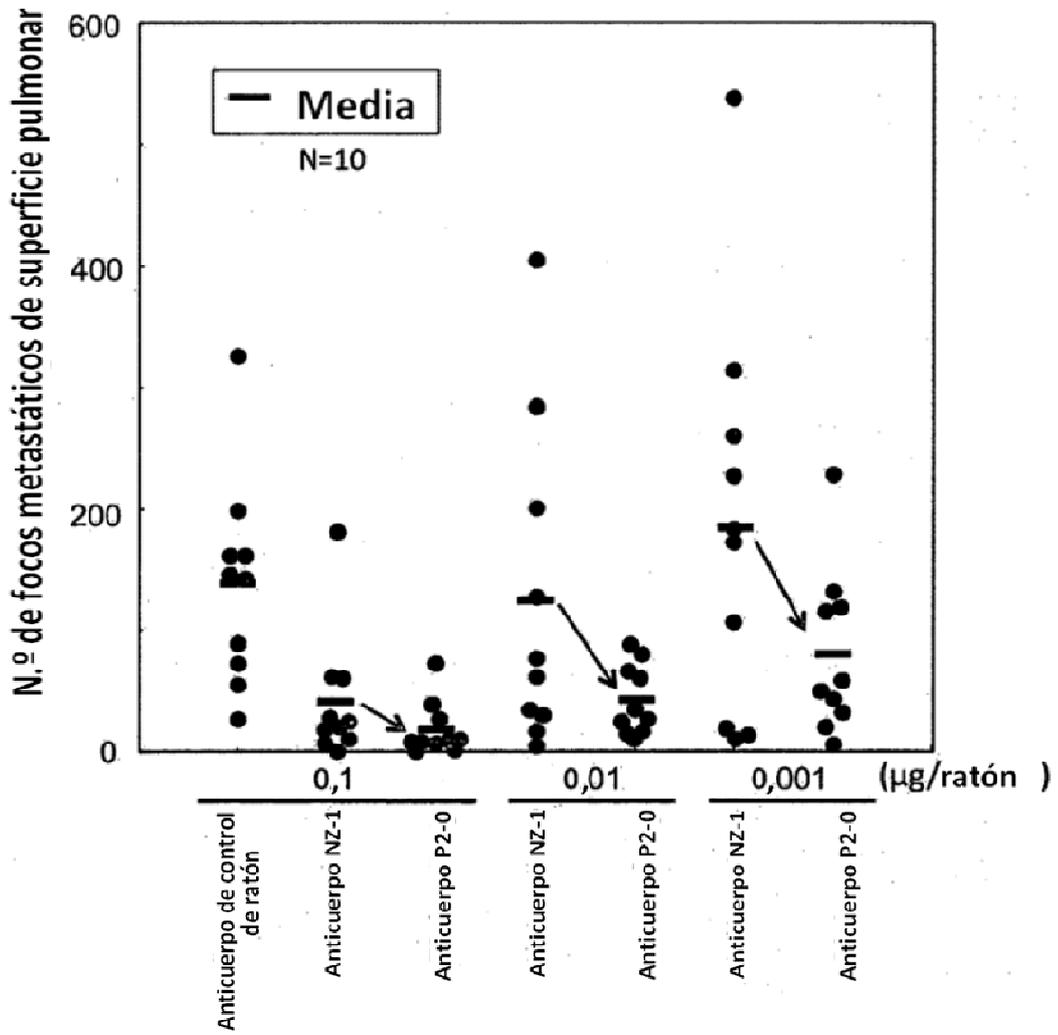


FIG. 11



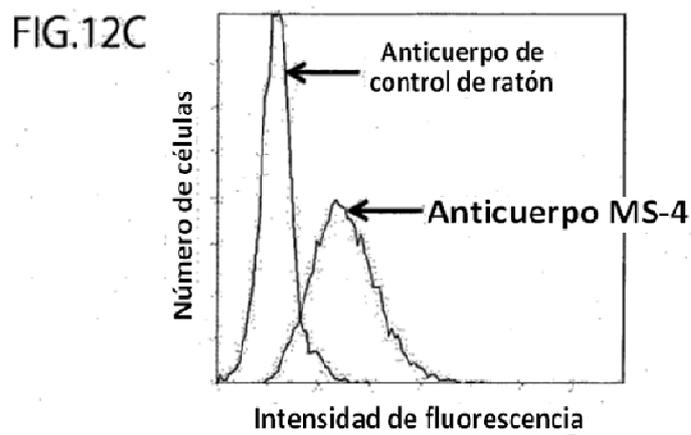
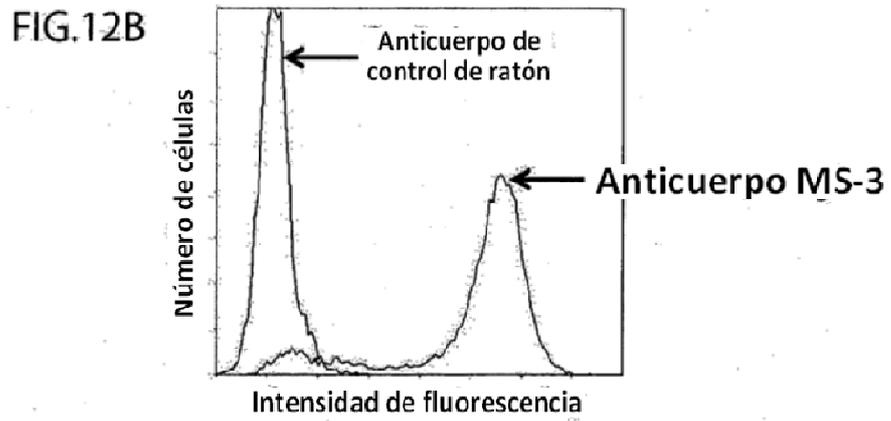
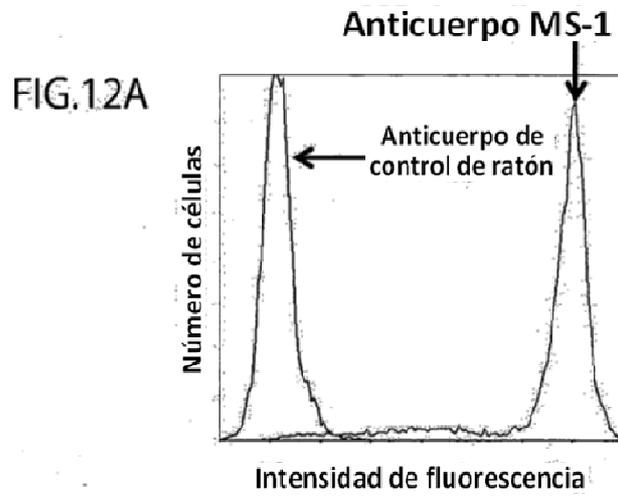


FIG.13A

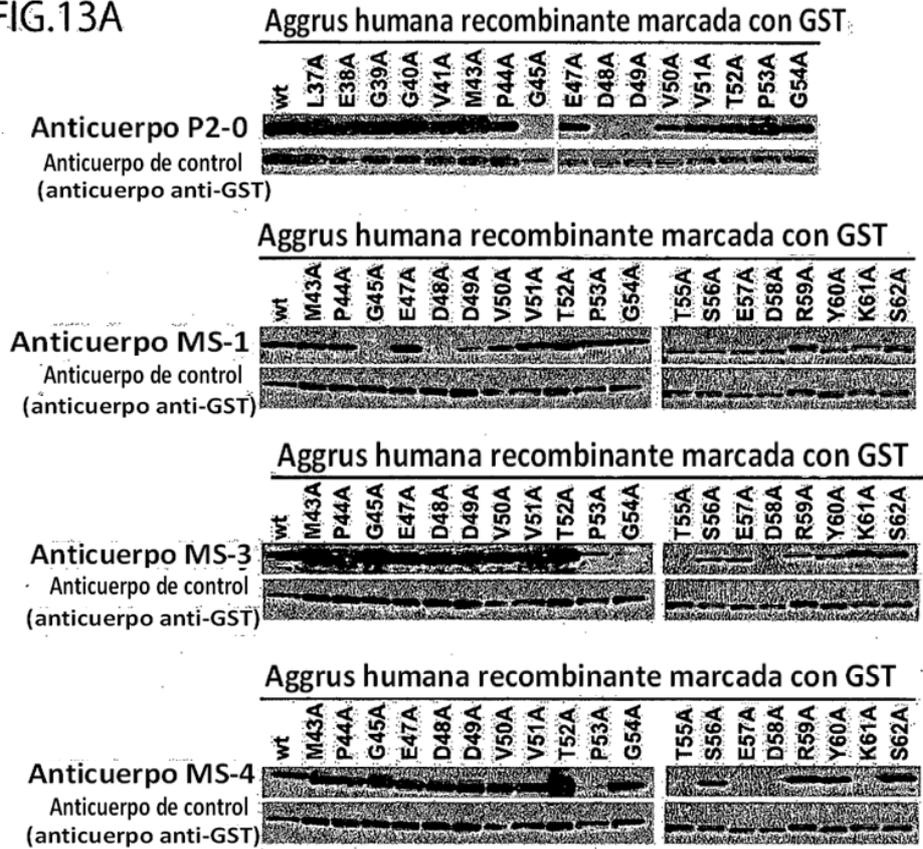
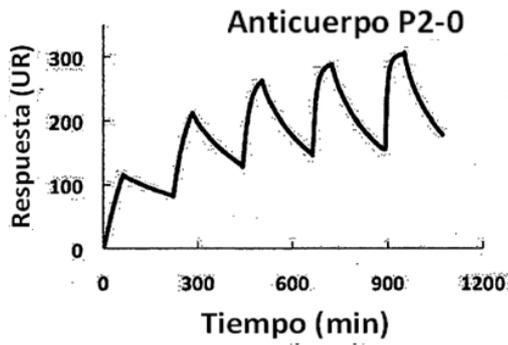


FIG.13B

Nombre del anticuerpo	Reconocimiento del epitopo en la proteina Aggrus humana	Isotipo; Reconocimiento de aminoácidos
P2-0	34 38 51 54 TTGLEGGVAMPGAEDDVVTPGTSED ⁵¹ RYK ⁵⁴ SGLTT	IgG1/Kappa Gly45, Asp48, Asp49
MS-1	34 42 62 66 TTGLEGGVAMPGAEDDVVTPGTSED ⁴² RYK ⁶² SGLTT	IgG2a/Kappa Gly45, Asp48
MS-3	34 42 62 66 TTGLEGGVAMPGAEDDVVTPGT ⁴² SED ⁶² RYK ⁶⁶ SGLTT	IgG1/Kappa Gly54, Thr55, Asp58
MS-4	34 42 62 66 TTGLEGGVAMPGAEDDVVTPGT ⁴² SED ⁶² RYK ⁶⁶ SGLTT	IgG2b/Kappa Pro53, Thr55, Glu57, Asp58, Lys61

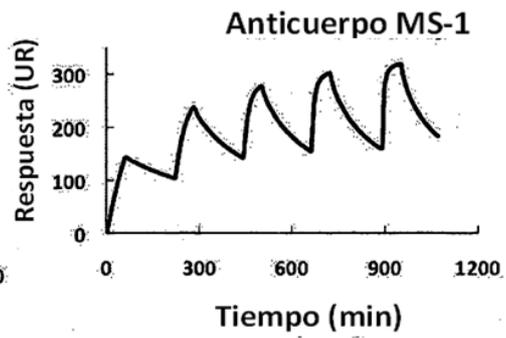
Reactividad contra Aggrus marcada con Fc recombinante

FIG.14A



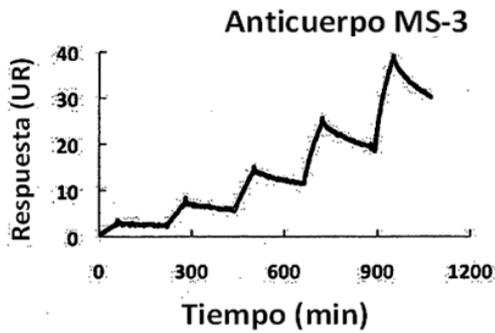
Constante de disociación en equilibrio (K_D) de Anticuerpo P2-0
 $9,3 \times 10^{-9}$ M

FIG.14B



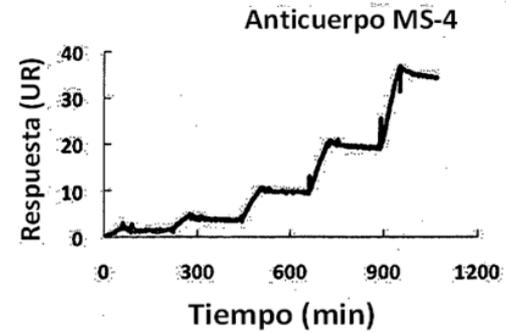
Constante de disociación en equilibrio (K_D) de Anticuerpo MS-1
 $9,0 \times 10^{-9}$ M

FIG.14C



Constante de disociación en equilibrio (K_D) de Anticuerpo MS-3
 $6,3 \times 10^{-8}$ M

FIG.14D



Constante de disociación en equilibrio (K_D) de Anticuerpo MS-4
 $2,0 \times 10^{-6}$ M

FIG.15A

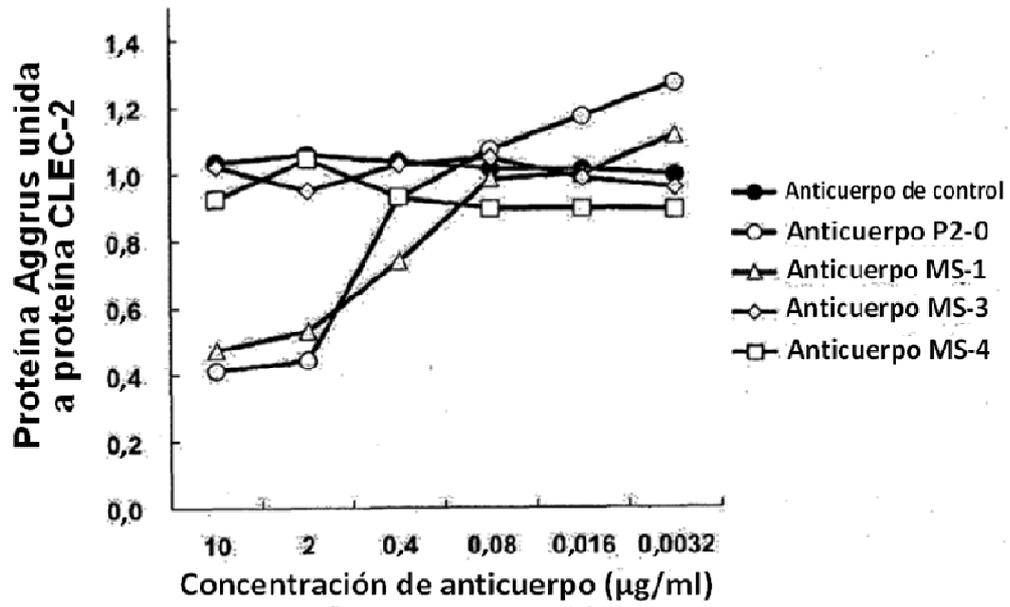


FIG.15B

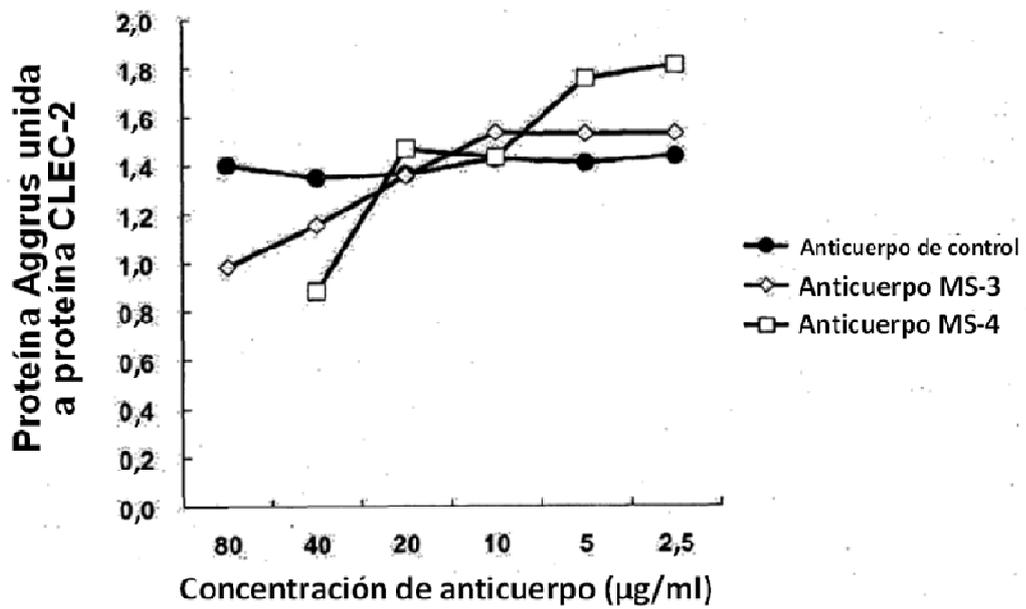
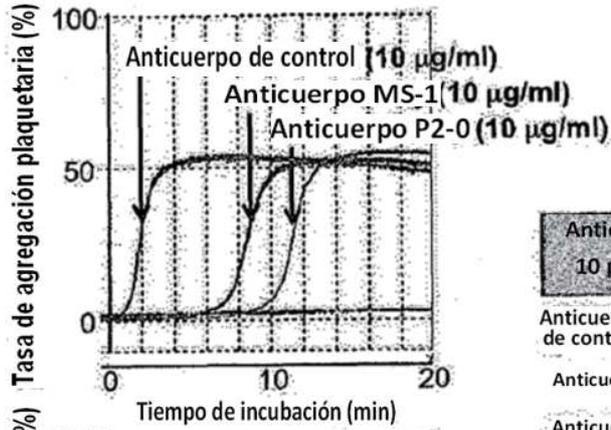
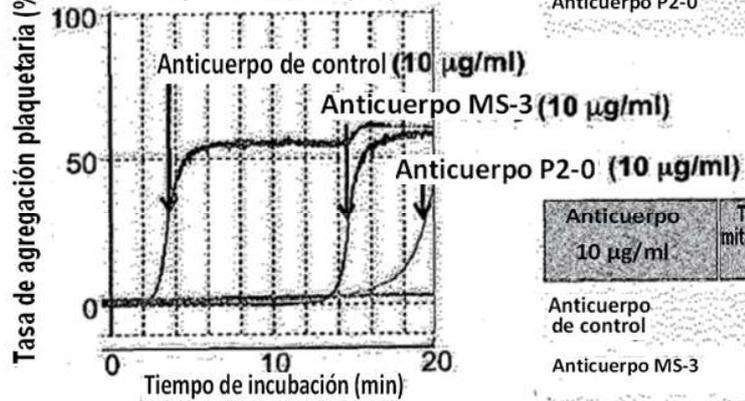


FIG.16A



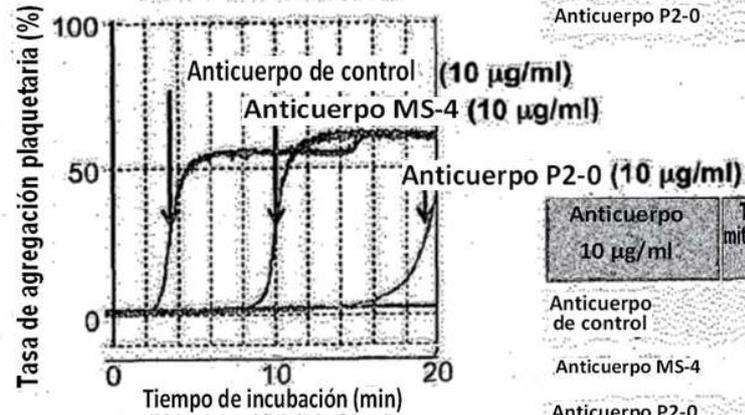
Anticuerpo 10 µg/ml	Tiempo hasta la mitad de agregación máxima
Anticuerpo de control	2 min
Anticuerpo MS-1	9 min
Anticuerpo P2-0	11 min

FIG.16B



Anticuerpo 10 µg/ml	Tiempo hasta la mitad de agregación máxima
Anticuerpo de control	3,5 min
Anticuerpo MS-3	14,5 min
Anticuerpo P2-0	19 min

FIG.16C



Anticuerpo 10 µg/ml	Tiempo hasta la mitad de agregación máxima
Anticuerpo de control	3,5 min
Anticuerpo MS-4	10 min
Anticuerpo P2-0	19 min

FIG.17A

Actividad antitumoral del Anticuerpo de control



Ratones tratados con el anticuerpo de control (18 días tras la inoculación del tumor)

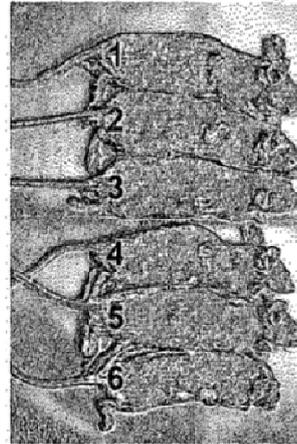
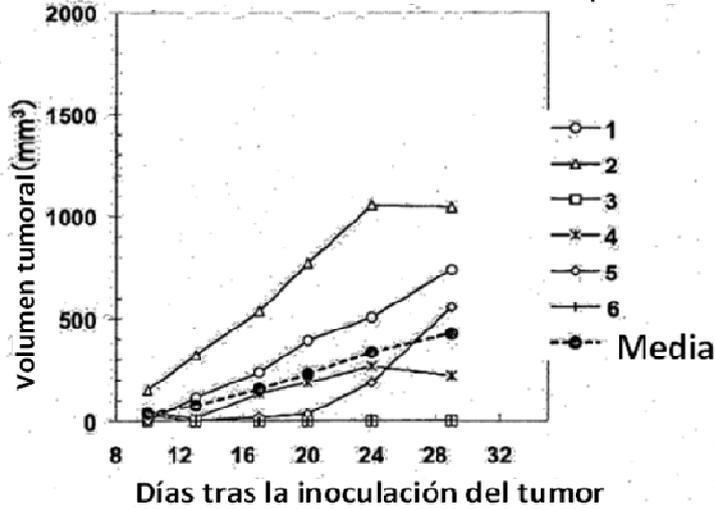


FIG.17B

Actividad antitumoral del Anticuerpo MS-1



Ratones tratados con el anticuerpo MS-1 (18 días tras la inoculación del tumor)

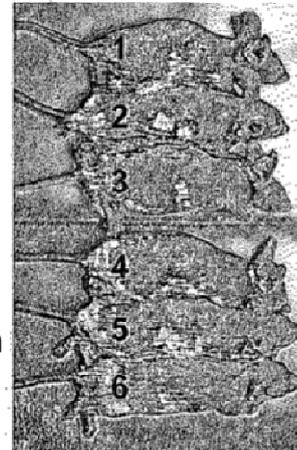


FIG.18A

El anticuerpo MS-1 suprimía la metástasis espontánea de las células CHO transfectadas con Aggrus

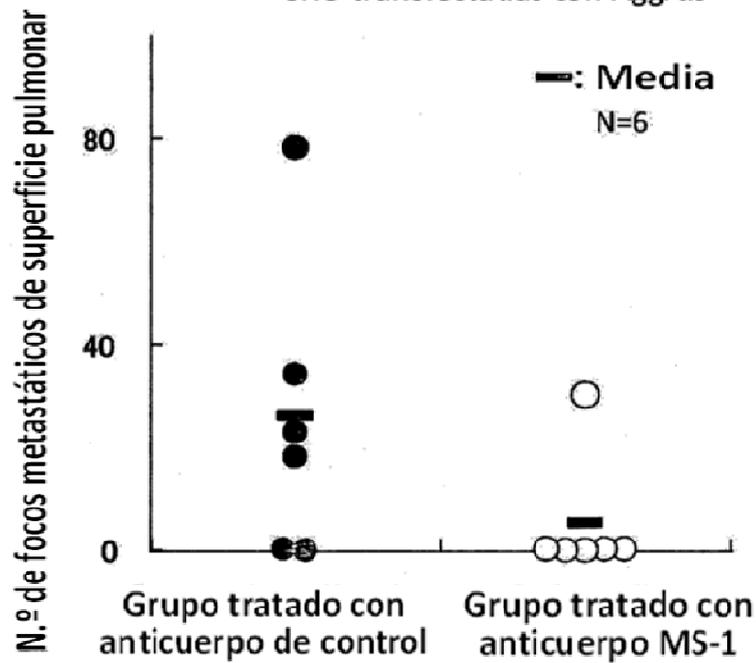


FIG.18B



Ratones tratados con el anticuerpo de control (30 días tras la inoculación del tumor)



Ratones tratados con el anticuerpo MS-1 (30 días tras la inoculación del tumor)

FIG. 19

