

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 471**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/08** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**C12N 1/15** (2006.01)  
**C12N 1/19** (2006.01)  
**C12N 1/21** (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: **26.09.2008 E 08834671 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **16.06.2010 EP 2196541**

54 Título: **Anticuerpo Anti-Glipicano 3 que tiene una cinética mejorada en plasma**

30 Prioridad:

**28.09.2007 JP 2007256063**

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

**01.02.2013**

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)  
5-1 UKIMA 5-CHOME KITA-KU  
TOKYO 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

**IGAWA, TOMOYUKI;  
KURAMOCHI, TAICHI;  
SHIRAIWA, HIROTAKE;  
TSUNODA, HIROYUKI;  
TACHIBANA, TATSUHIKO y  
ISHIGURO, TAKAHIRO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 394 471 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 Anti-Glipicano 3 que tiene una cinética mejorada en plasma.

### Antecedentes de la Invención

#### Campo de la Invención

La presente invención hace referencia a un método para mejorar la cinética en plasma (sangre) de anticuerpos anti-glipicano 3, a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-glipicano 3 que tiene una cinética en plasma mejorada como ingrediente activo, y a un método para preparar el mismo.

#### Descripción de la Técnica Relacionada

Los anticuerpos son estables en el plasma y muestran pocos efectos secundarios y por estas razones se ha prestado atención a su uso como fármacos. Entre los numerosos isotipos de anticuerpos, se encuentran en el mercado un gran número de anticuerpos terapéuticos de isotipo IgG y en la actualidad también se está desarrollando un gran número de anticuerpos terapéuticos (Janice M. Reichert, Clark J. Rosensweig, Laura B. Faden, y Matthew C. Dewitz, Monoclonal antibody successes in the clinic, *Nature Biotechnology* (2005) 23, 1073-8; Pavlou A. K. y Belsey M. J., The therapeutic antibodies market to 2008, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2005) 59(3), 389-96; y Janice M. Reichert y Viiia E. Valge-Archer, Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics, *Nat. Rev. Drug Disc.* (2007) 6, 349-356). Se sabe que los anticuerpos anti-glipicano 3 muestran actividad anti-tumoral ejerciendo citotoxicidad contra, por ejemplo, células de cáncer de hígado y células de cáncer de pulmón (documento WO 2003/000883). También se sabe que los productos conjugados anticuerpo-fármaco que comprenden un anticuerpo anti-glipicano 3 unido a una sustancia citotóxica muestran actividad anti-tumoral contra el cáncer de hígado, el cáncer de ovario, el melanoma, etcétera (Albina Nesterova, Paul J. Carter, y Leia M. Smith, Glypican 3 as a Novel Target for an Antibody-Drug Conjugate, *AACR Abstract Núm. 656* (2007), Los Angeles, CA, Abril, 4-18).

Además, se están desarrollando tecnologías para intensificar las funciones efectoras para producir anticuerpos terapéuticos de segunda generación. Por ejemplo, se sabe que la actividad citotóxica dependiente de anticuerpos (ADCC) y la actividad citotóxica dependiente del complemento (CDC) son intensificadas por medio de una sustitución de aminoácido en la cual los aminoácidos que constituyen la región Fc de los anticuerpos de isotipo IgG (referidos como anticuerpos IgG) son remplazados por diferentes aminoácidos (Kim S. J., Park Y., y Hong H. J., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies, *Mol. Cells* (2005) 20(1), 17-29). Cuando un anticuerpo anti-glipicano 3 es producido en células CHO con el transportador de fucosa suprimido, la fucosa no se une a las cadenas de azúcar ramificadas unidas al anticuerpo anti-glipicano 3. Dicho anticuerpo anti-glipicano 3 tiene una actividad ADCC significativamente más alta que el anticuerpo anti-glipicano 3 que contiene fucosa en la cadena ramificada de la cadena de azúcar, y se piensa que muestra una mayor actividad anti-tumoral como anticuerpo terapéutico (documento WO 2006/067913).

Además de tales tecnologías para potenciar las funciones efectoras, también se conocen otras tecnologías en las cuales la vida media en plasma de un anticuerpo se incrementa o disminuye por una sustitución de aminoácido en los aminoácidos que constituyen la región Fc del anticuerpo (Hinton P. R., Xiong J. M., Johlfs M. G., Tang M. T., Keller S., y Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life, *J. Immunol.* (2006) 176(1), 346-56; y Ghetie V., Popov S., Borvak J., Radu C., Matesoi D., Medesan C., Ober R. J., y Ward E. S., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis, *Nat. Biotechnol.* (1997) 15(7), 637-90). Si se aplica una tecnología que prolonga la vida media en plasma de los anticuerpos a anticuerpos terapéuticos, se espera que la dosis del anticuerpo administrado terapéuticamente se reduzca y se amplíe su intervalo de administración, lo que permitirá la provisión de anticuerpos terapéuticos menos costosos con un elevado factor de conveniencia.

En términos específicos, la vida media en plasma se puede prolongar sustituyendo un aminoácido de la región Fc de un anticuerpo IgG por otro aminoácido dando como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo IgG por el receptor de Fc neonatal, que se sabe que es un receptor de recuperación para el anticuerpo IgG. Además, también se sabe que la vida media en plasma se incrementa mediante barajado de los dominios individuales (CH1, CH2, CH3) que constituyen la región constante del anticuerpo (Zuckier L. S., Chang C. J., Scharff M. D., y Morrison S. L., Chimeric human-mouse IgG antibodies with shuffled constant region exons demonstrate that multiple domains contribute to in vivo half-life, *Cancer Res.* (1998) 58(17), 3905-8). No obstante, puesto que la secuencia de aminoácidos de la región constante del anticuerpo IgG está conservada en los seres humanos, un anticuerpo que tiene una sustitución de aminoácido artificial como se describe más arriba en los aminoácidos que constituyen la región constante puede causar efectos secundarios mostrando inmunogenicidad en el organismo humano. Por lo tanto se prefiere sustituir solamente un pequeño número de aminoácidos.

Las tecnologías que implican sustitución de aminoácidos en la región variable (también referida como región V) de

los anticuerpos IgG referidas hasta la fecha incluyen la tecnología de humanización (Tsurushita N., Hinton P. R., y Kumar S., Design of humanized antibodies: from anti-Tac to Zenapax, *Methods* (2005) 36(1), 69-83), la maduración de la afinidad donde los aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR) se sustituyen con el fin de incrementar la actividad de unión (Rajpal A., Beyaz N., Haber L., Cappuccilli G., Yee H., Bhatt R. R., Takeuchi T., Lerner R. A., y Crea R., A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2005) 102(24), 8466-71) y la sustitución de aminoácidos en los aminoácidos que constituyen la región marco (FR) para mejorar la estabilidad fisicoquímica (Ewert S., Honegger A., y Pluckthun A., Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering, *Methods* (2004) 34(2), 184-99). A diferencia del caso con una sustitución de aminoácidos en la región constante (también referida como región C), la sustitución de aminoácidos en la región variable se utiliza generalmente para mejorar las características (p. ej., estabilidad) y potenciar la función (p. ej., actividad de unión al antígeno) de los anticuerpos. Puesto que la secuencia de aminoácidos que constituye la CDR de los anticuerpos humanizados se obtiene de la secuencia de aminoácidos de una especie animal no humana, se piensa que el riesgo de generar inmunogenicidad introduciendo una sustitución de aminoácidos artificial en esta secuencia es menor que en las sustituciones de aminoácidos en una secuencia en otras regiones. Por otra parte, con respecto a una sustitución de aminoácidos artificial en la secuencia de que constituye la FR de los anticuerpos humanizados, se piensa que dicha sustitución posee poco riesgo de generar inmunogenicidad si la secuencia de aminoácidos de FR obtenida como consecuencia de la sustitución es la misma que cualquiera de la pluralidad de secuencias de aminoácidos de FR de anticuerpos humanos que están publicadas, por ejemplo, en la base de datos de Kabat (<http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>), la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr/>), etcétera. Además, la inmunogenicidad se puede reducir volviendo a seleccionar una secuencia de anticuerpo humano que sea muy similar a la secuencia de aminoácidos de FR obtenida como consecuencia de la sustitución, entre la pluralidad de secuencias amino de FR de un anticuerpo humano que están publicadas en la base de datos de Kabat, la base de datos IMGT, etcétera (documento WO 1999/018212).

En contraste, los únicos métodos conocidos para mejorar la vida media en plasma de los anticuerpos IgG son, como se ha descrito más arriba, la sustitución de aminoácidos de los aminoácidos que constituyen la región Fc, que es una parte de la región constante, y no se ha informado hasta la fecha sobre métodos que ocasionen una mejora en la vida media en plasma de los anticuerpos IgG por medio de la sustitución de aminoácidos de los aminoácidos que constituyen la región variable, que se cree que conlleva poco riesgo de invocar inmunogenicidad. La razón de esto es, en parte, que se cree que la vida media en plasma de los anticuerpos IgG depende en gran manera del agotamiento dependiente de antígenos y de la unión al receptor Fc neonatal, un receptor de recuperación para los anticuerpos IgG (Lobo E. D., Hansen R. J., y Balthasar J. P., Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics, *J. Pharm. Sci.* (2004) 93(11), 2645-68), y que las funciones y propiedades de la región variable pueden no tener una influencia significativa sobre vida media en plasma.

También se ha referido que el punto isoeléctrico (pI) del anticuerpo IgG disminuye por la anionización del anticuerpo IgG mediante succinilación (Yamasaki Y., Sumimoto K., Nishikawa M., Yamashita F., Yamaoka K., Hashida M., y Takakura Y., Pharmacokinetic analysis of in vivo disposition of succinylated proteins targeted to liver nonparenchymal cells via scavenger receptors: importance of molecular size and negative charge density for in vivo recognition by receptors, *Pharmacol. Exp. Ther.* (2002) 301(2), 467-77); y que el pI del anticuerpo IgG se eleva por cationización del anticuerpo IgG mediante modificación con poliamina (Poduslo J. F. y Curran G. L., Polyamine modification increases the permeability of proteins at the blood-nerve and blood-brain barriers, *Neurochem.* (1996) 66(4), 1599-609). No obstante, en ambos casos no hubo incremento en la vida media en plasma del anticuerpo IgG modificado, si no que en vez de eso la vida media en plasma disminuyó. De este modo, no se puede conseguir un incremento en la vida media en plasma de los anticuerpos IgG por medio de la modificación del pI del anticuerpo IgG mediante la modificación química anteriormente descrita del anticuerpo IgG.

En el documento WO 2007/114319 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]), se describe por primera vez que la vida media in vivo de un anticuerpo se puede incrementar reduciendo el punto isoeléctrico a través de sustituciones de aminoácidos específicos en los dominios variables.

### **Compendio de la Invención**

La presente invención se llevó a cabo la vista de las circunstancias descritas más arriba. Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo anti-glipicano 3 como se define en las reivindicaciones que tiene una vida media en plasma incrementada y una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo como ingrediente activo, así como un método para preparar el anticuerpo anti-glipicano 3 y la composición farmacéutica. Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método para modular la citotoxicidad de un anticuerpo modulando la vida media en plasma del anticuerpo que tiene citotoxicidad, un anticuerpo con citotoxicidad modulada y una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo, así como un método para preparar el anticuerpo y la composición farmacéutica.

Los autores de la presente invención llevaron a cabo investigaciones centradas en los métodos para modular la vida media en plasma de un anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3). Como resultado, los autores de la presente invención descubrieron que la vida media en plasma de un anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) se puede

modular modificando – entre los residuos de aminoácido que constituyen la región variable y la región constante de un anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) – los residuos de aminoácido expuestos sobre la superficie de esta molécula de anticuerpo y controlando de ese modo la carga superficial de la molécula de anticuerpo. Específicamente, entre los residuos de aminoácido de la secuencia de aminoácidos que constituye la región variable y la región constante de un anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3), se identificaron residuos de aminoácido concretos que podían modular la vida media en plasma del anticuerpo anti-glipicano 3 a través de la modificación de la carga superficial sobre la molécula de anticuerpo sin afectar a la estructura o la función del anticuerpo, p. ej., la actividad de unión al antígeno. Los autores de la presente invención también confirmaron que el anticuerpo anti-glipicano 3 que tenía una vida media modulada de esta manera conservaba de hecho su actividad de unión al antígeno. Los autores de la presente invención también encontraron que la modulación de la vida media en plasma del anticuerpo anti-glipicano 3 incrementa la actividad inhibitoria de la proliferación tumoral sobre células cancerosas mostrada por los anticuerpos citotóxicos, tales como el anticuerpo anti-glipicano 3.

La presente descripción hace referencia a un método para modular la vida media en plasma de un anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) modificando un residuo de aminoácido que está expuesto sobre la superficie del anticuerpo, a un anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) que tiene una vida media en plasma modulada por la modificación de un residuo de aminoácido, a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo como ingrediente activo, y a un método para preparar dicha composición farmacéutica. Más específicamente, la presente descripción proporciona lo siguiente:

1. [1] Un método para preparar un anticuerpo anti-glipicano 3 con una cinética en plasma modulada, comprendiendo dicho método las etapas de:
  1. (a) cultivar una célula anfitriona que porta un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-glipicano 3 en condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico, donde el anticuerpo anti-glipicano 3 tiene una secuencia de aminoácidos alterada para producir una modificación en la carga de al menos un residuo de aminoácido que puede estar expuesto sobre la superficie del anticuerpo; y
  2. (b) recuperar el anticuerpo anti-glipicano 3 del cultivo de células anfitrionas;
2. [2] El método de acuerdo con el apartado [1], donde la modulación de la cinética en plasma es un incremento o un descenso en un parámetro seleccionado entre la vida media en plasma, el tiempo medio de residencia en plasma, y el aclaramiento en plasma;
3. [3] El método de acuerdo con el apartado [1], donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra por medio de una sustitución de aminoácido;
4. [4] El método de acuerdo con el apartado [1], donde el residuo de aminoácido que puede estar expuesto sobre la superficie del anticuerpo anti-glipicano 3 está localizado en una región del anticuerpo anti-glipicano 3 distinta de la región de unión FcRn;
5. [5] El método de acuerdo con el apartado [4], donde la región de unión FcRn comprende la región Fc;
6. [6] El método de acuerdo con el apartado [4], donde la región de unión FcRn comprende los residuos de aminoácido de los números EU 250, 253, 310, 311, 314, 428, 435, 436 de acuerdo con la numeración de Kabat;
7. [7] El método de acuerdo con el apartado [1], donde el anticuerpo anti-glipicano 3 es un anticuerpo IgG;
8. [8] El método de acuerdo con los apartados [1]-[7], donde el residuo de aminoácido cuya carga es modificada es un residuo de aminoácido presente en la región variable de la cadena pesada o la región variable de la cadena ligera;
9. [9] El método de acuerdo con el apartado [8], donde el anticuerpo anti-glipicano 3 comprende una región determinante de la complementariedad (CDR) derivada de un animal no humano, una región marco (FR) obtenida de ser humano, y una región constante obtenida de ser humano, y donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante sustitución de al menos un residuo de aminoácido que puede estar expuesto sobre la superficie del anticuerpo en la CDR o la FR del anticuerpo con un residuo de aminoácido que tiene una carga diferente de la del residuo de aminoácido;
10. [10] El método de acuerdo con el apartado [9], donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante:
  - (1) al menos una sustitución en la región variable de la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 1 seleccionada entre:
    1. (a) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 43<sup>o</sup> por K,
    2. (b) la sustitución de D que es residuo de aminoácido 52<sup>o</sup> por N, y
    3. (c) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 107<sup>o</sup> por R;
 y/o
  - (2) al menos una sustitución en la región variable de la cadena ligera mostrada en el SEQ ID NO: 7 seleccionada entre:
    - (d) la sustitución de E que es el residuo de aminoácido 17<sup>o</sup> por Q,
    - (e) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 27<sup>o</sup> por R, y
    - (f) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 105<sup>o</sup> por R;
11. [11] El método de acuerdo con el apartado [9], donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante:
  - (1) al menos una sustitución en la región variable de la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 1 seleccionada entre:
    - (a) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 19<sup>o</sup> por T,

- (b) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 43<sup>o</sup> por E,  
(c) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 62<sup>o</sup> por E,  
(d) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 63<sup>o</sup> por S,  
(e) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 65<sup>o</sup> por Q, y  
(f) la sustitución de G que es el residuo de aminoácido 66<sup>o</sup> por D;  
y/o  
(2) al menos una sustitución en la región variable de la cadena ligera mostrada en el SEQ ID NO: 7  
seleccionada entre:  
(g) la sustitución de R que es el residuo de aminoácido 24<sup>o</sup> por Q,  
(h) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 27<sup>o</sup> por E,  
(i) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 79<sup>o</sup> por T,  
(j) la sustitución de R que es el residuo de aminoácido 82<sup>o</sup> por S, y  
(k) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 112 por E;
12. [12] El método de acuerdo con el apartado [11], que comprende adicionalmente al menos una modificación  
en la región constante de la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 31 seleccionada entre:  
(a) la sustitución de H que es el residuo de aminoácido 151<sup>o</sup> por Q,  
(b) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 157<sup>o</sup> por Q,  
(c) la sustitución de R que es el residuo de aminoácido 238<sup>o</sup> por Q,  
(d) la sustitución de D que es el residuo de aminoácido 239<sup>o</sup> por E,  
(e) la sustitución de L que es el residuo de aminoácido 241<sup>o</sup> por M, y  
(f) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 302<sup>o</sup> por E;
13. [13] El método de acuerdo con los apartados [9]-[12], donde el anticuerpo anti-glicano 3 tiene un contenido  
reducido de fucosa unida a la región Fc del anticuerpo;
14. [14] Un anticuerpo anti-glicano 3 preparado mediante el método de acuerdo con los apartados [1]-[13];
15. [15] Un método para preparar un anticuerpo con una cinética en plasma modulada, comprendiendo dicho  
método las etapas de:  
1. (a) cultivar una célula anfitriona que porta un ácido nucleico que codifica el anticuerpo en condiciones  
que permiten la expresión del ácido nucleico, donde el anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos  
alterada para ocasionar una modificación en la carga de al menos un residuo de aminoácido en la región  
constante del anticuerpo distinta de la región de unión FcRn; y  
2. (b) recuperar el anticuerpo del cultivo de células anfitrionas;
16. [16] El método de acuerdo con el apartado [15], donde la modulación de la cinética en plasma es un  
incremento o un descenso en un parámetro seleccionado entre la vida media en plasma, el tiempo medio de  
residencia en plasma, y el aclaramiento en plasma;
17. [17] El método de acuerdo con el apartado [15], donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido  
se logra mediante la sustitución de aminoácidos;
18. [18] El método de acuerdo con el apartado [17], donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG;
19. [19] El método de acuerdo con el apartado [18], donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1;
20. [20] El método de acuerdo con el apartado [17], donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido  
se logra mediante la sustitución de al menos un residuo de aminoácido de un anticuerpo IgG1 por un residuo  
de aminoácido correspondiente de un anticuerpo IgG4;
21. [21] El método de acuerdo con el apartado [15]-[20], donde la región de unión FcRn comprende los residuos  
de aminoácido de los números EU 250, 253, 310, 311, 314, 428, 435, y 436 de acuerdo con la numeración  
de Kabat;
22. [22] El método de acuerdo con el apartado [20], donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido  
se logra mediante al menos una sustitución en la región constante de la cadena pesada mostrada en el SEQ  
ID NO: 31 seleccionada entre:  
(a) la sustitución de H que es el residuo de aminoácido 151<sup>o</sup> por Q,  
(b) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 157<sup>o</sup> por Q,  
(c) la sustitución de R que es el residuo de aminoácido 238<sup>o</sup> por Q,  
(d) la sustitución de D que es el residuo de aminoácido 239<sup>o</sup> por E,  
(e) la sustitución de L que es el residuo de aminoácido 241<sup>o</sup> por M, y  
(f) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 302 por E;
23. [23] El método de acuerdo con los apartados [15]-[22], donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-glicano 3;
24. [24] Un método de estabilización de un anticuerpo anti-glicano 3 que comprende una región determinante  
de la complementariedad (CDR) obtenida de un animal no humano, una región marco (FR) obtenida de un  
ser humano, y una región constante obtenida de un ser humano, comprendiendo dicho método las etapas  
de:  
1. (a) cultivar una célula anfitriona que porta un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-glicano 3 en  
condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico, donde el anticuerpo anti-glicano 3 tiene una  
secuencia de aminoácidos alterada para incrementar el valor Tm del anticuerpo mediante una  
modificación de al menos un residuo de aminoácido; y  
2. (b) recuperar el anticuerpo del cultivo de células anfitrionas;
25. [25] El método de acuerdo con el apartado [24], donde el residuo de aminoácido está presente en la región  
FR1 y/o la región FR2 de la cadena pesada o la cadena ligera;
26. [26] El método de acuerdo con el apartado [25], donde un residuo de aminoácido de la región FR2 de la

- cadena pesada está sustituido por un residuo de aminoácido de la región FR2 de la subclase VH4;
27. [27] El método de acuerdo con el apartado [25], donde un residuo de aminoácido de la región FR2 de la cadena ligera está sustituido por un residuo de aminoácido de la región FR2 de la subclase VK3;
- 5 28. [28] El método de acuerdo con el apartado [24]-[27], donde la sustitución del residuo de aminoácido se logra mediante:
- (1) al menos una sustitución en la región variable de la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 1 seleccionada entre:
- (a) la sustitución de V que es el residuo de aminoácido 37<sup>o</sup> por I,  
 (b) la sustitución de A que es el residuo de aminoácido 40<sup>o</sup> por P,  
 10 (c) la sustitución de M que es el residuo de aminoácido 48<sup>o</sup> por I, y  
 (d) la sustitución de L que es el residuo de aminoácido 51<sup>o</sup> por I;
- y/o
- (2) al menos una sustitución en la región variable de la cadena ligera mostrada en el SEQ ID NO: 7 seleccionada entre:
- (e) la sustitución de L que es el residuo de aminoácido 42<sup>o</sup> por Q,  
 15 (f) la sustitución de S que es el residuo de aminoácido 48<sup>o</sup> por A, y  
 (g) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 50<sup>o</sup> por R;
29. [29] Un método para preparar un anticuerpo con citotoxicidad modulada, que comprende las etapas de:
- (a) cultivar una célula anfitriona que porta un ácido nucleico que codifica el anticuerpo en condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico, donde el anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos alterada para causar una modificación en la carga de al menos un residuo de aminoácido que puede estar expuesto sobre la superficie del anticuerpo citotóxico; y  
 20 (b) recuperar el anticuerpo del cultivo de células anfitrionas;
30. [30] El método de acuerdo con el apartado [29], donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante sustitución de aminoácido;
31. [31] El método de acuerdo con el apartado [29], donde el residuo de aminoácido que puede estar expuesto sobre la superficie del anticuerpo está localizado en una región del anticuerpo distinta de la región de unión FcRn;
32. [32] El método de acuerdo con el apartado [31], donde la región de unión FcRn comprende la región Fc;
- 30 33. [33] El método de acuerdo con el apartado [31], donde la región de unión FcRn comprende los residuos de aminoácido de los números EU 250, 253, 310, 311, 314, 428, 435, 436 de acuerdo con la numeración de Kabat;
34. [34] El método de acuerdo con el apartado [29], donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG;
- 35 35. [35] El método de acuerdo con el apartado [29]-[34], donde el residuo de aminoácido cuya carga está modificada es un residuo de aminoácido presente en la región constante del anticuerpo;
36. [36] El método de acuerdo con los apartados [29]-[34], donde el residuo de aminoácido cuya carga está modificada es un residuo de aminoácido presente en la región variable de la cadena pesada o la región variable de la cadena ligera del anticuerpo;
- 40 37. [37] El método de acuerdo con el apartado [36], donde el anticuerpo es un anticuerpo que comprende una región determinante de la complementariedad (CDR) obtenida de un animal no humano, una región marco (FR) obtenida de un ser humano, y una región constante obtenida de un ser humano, y donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante sustitución de al menos un residuo de aminoácido que puede estar expuesto sobre la superficie del anticuerpo en la CDR o la FR del anticuerpo por un residuo de aminoácido que tiene una carga diferente de la del residuo de aminoácido;
- 45 38. [38] El método de acuerdo con el apartado [37], donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante:
- (1) al menos una sustitución en la región variable de la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 1 seleccionada entre:
- (a) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 19<sup>o</sup> por T,  
 50 (b) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 43<sup>o</sup> por E,  
 (c) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 62<sup>o</sup> por E,  
 (d) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 63<sup>o</sup> por S,  
 (e) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 65<sup>o</sup> por Q, y  
 (f) la sustitución de G que es el residuo de aminoácido 66<sup>o</sup> por D;
- 55 y/o,
- (2) al menos una sustitución en la región variable de la cadena ligera mostrada en el SEQ ID NO: 7 seleccionada entre:
- (g) la sustitución de R que es el residuo de aminoácido 24<sup>o</sup> por Q,  
 (h) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 27<sup>o</sup> por E,  
 60 (i) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 79<sup>o</sup> por T,  
 (j) la sustitución de R que es el residuo de aminoácido 82<sup>o</sup> por S, y  
 (k) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 112<sup>o</sup> por E;
39. [39] El método de acuerdo con el apartado [38], que comprende adicionalmente al menos una sustitución en la región constante de la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 31 seleccionada entre:
- 65 (a) la sustitución de H que es el residuo de aminoácido 151<sup>o</sup> por Q,  
 (b) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 157<sup>o</sup> por Q,

- (c) la sustitución de R que es el residuo de aminoácido 238<sup>o</sup> por Q,  
 (d) la sustitución de D que es el residuo de aminoácido 239<sup>o</sup> por E,  
 (e) la sustitución de L que es el residuo de aminoácido 241<sup>o</sup> por M, y  
 (f) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 302<sup>o</sup> por E;
- 5 40. [40] El método de acuerdo con el apartado [36], donde el anticuerpo comprende una región determinante de la complementariedad (CDR) obtenida de un animal no humano, una región marco (FR) obtenida de un ser humano, y una región constante obtenida de un ser humano, y donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante sustitución de al menos un residuo de aminoácido que puede estar expuesto sobre la superficie del anticuerpo en la región constante del anticuerpo por un residuo de aminoácido que tiene una carga diferente de la del residuo de aminoácido;
- 10 41. [41] El método de acuerdo con el apartado [40], donde la sustitución es al menos una sustitución en la región constante de la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 31 seleccionada entre:
- 15 (a) la sustitución de H que es el 151st residuo de aminoácido por Q,  
 (b) la sustitución de K que es el 157th residuo de aminoácido por Q,  
 (c) la sustitución de R que es el 238th residuo de aminoácido por Q,  
 (d) la sustitución de D que es el 239th residuo de aminoácido por E,  
 (e) la sustitución de L que es el 241st residuo de aminoácido por M, y  
 (f) la sustitución de Q que es el 302nd residuo de aminoácido por E;
- 20 42. [42] El método de acuerdo con el apartado [37]-[41], donde el anticuerpo tiene un contenido reducido de fucosa anclado a la región Fc del anticuerpo;
43. [43] Un anticuerpo preparado mediante el método de acuerdo con los apartados [29]-[42];
44. [44] El anticuerpo de acuerdo con el apartado [43], donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-glicoproteico 3;
45. [45] Un anticuerpo que comprende:
- 25 (1) una región variable de la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 1 en la que la secuencia de aminoácidos comprende al menos una sustitución seleccionada entre:
- 30 (a) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 19<sup>o</sup> por T,  
 (b) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 43<sup>o</sup> por E,  
 (c) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 62<sup>o</sup> por E,  
 (d) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 63<sup>o</sup> por S,  
 (e) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 65<sup>o</sup> por Q, y  
 (f) la sustitución de G que es el residuo de aminoácido 66<sup>o</sup> por D;
- y/o
- (2) una región variable de la cadena ligera mostrada en el SEQ ID NO: 7 en la que la secuencia de aminoácidos comprende al menos una sustitución seleccionada entre:
- 35 (g) la sustitución de R que es el residuo de aminoácido 24<sup>o</sup> por Q,  
 (h) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 27<sup>o</sup> por E,  
 (i) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 79<sup>o</sup> por T,  
 (j) la sustitución de R que es el residuo de aminoácido 82<sup>o</sup> por S, y  
 (k) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 112<sup>o</sup> por E;
- 40 46. [46] El anticuerpo de acuerdo con el apartado [45], que comprende la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 3 y la cadena ligera mostrada en el SEQ ID NO: 9;
47. [47] El anticuerpo de acuerdo con el apartado [45], que comprende la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 5 y la cadena ligera mostrada en el SEQ ID NO: 11;
48. [48] El anticuerpo de acuerdo con el apartado [45] que comprende una región variable de la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 27 y una región variable de la cadena ligera mostrada en el SEQ ID NO: 28;
- 45 49. [49] El anticuerpo de acuerdo con el apartado [45] que comprende una región variable de la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 27 y una región variable de la cadena ligera mostrada en el SEQ ID NO: 29;
50. [50] El anticuerpo de acuerdo con el apartado [45]-[49] que comprenden una región constante de un anticuerpo humano;
- 50 51. [51] El anticuerpo de acuerdo con el apartado [50], donde la región constante comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 32 o el SEQ ID NO: 33;
52. [52] Un anticuerpo que comprende:
- 55 (1) una región variable de la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 1 en la que la secuencia de aminoácidos comprende al menos una sustitución seleccionada entre:
- (a) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 43<sup>o</sup> por K,  
 (b) la sustitución de D que es el residuo de aminoácido 52<sup>o</sup> por N, y  
 (c) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 107 por R;
- y
- (2) una región variable de la cadena ligera mostrada en el SEQ ID NO: 7 en la que la secuencia de aminoácidos comprende al menos una sustitución seleccionada entre:
- 60 (d) la sustitución de E que es el residuo de aminoácido 17<sup>o</sup> por Q,  
 (e) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 27<sup>o</sup> por R, y  
 (f) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 105 por R;
53. [53] El anticuerpo de acuerdo con el apartado [52], que comprende la región variable de la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 4 y la región variable de la cadena ligera mostrada en el SEQ ID NO: 10;
- 65 54. [54] El anticuerpo de acuerdo con el apartado [52], que comprenden la región variable de la cadena pesada

mostrada en el SEQ ID NO: 6 y la región variable de la cadena ligera mostrada en el SEQ ID NO: 12;

55. [55] El anticuerpo de acuerdo con el apartado [52]-[54] que comprende una región constante de un anticuerpo humano;
56. [56] Un anticuerpo que comprende al menos una sustitución en la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 31 seleccionada entre:
  - (a) la sustitución de H que es el residuo de aminoácido 151<sup>a</sup> por Q,
  - (b) la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 157<sup>a</sup> por Q,
  - (c) la sustitución de R que es el residuo de aminoácido 238<sup>a</sup> por Q,
  - (d) la sustitución de D que es el residuo de aminoácido 239<sup>a</sup> por E,
  - (e) la sustitución de L que es el residuo de aminoácido 241<sup>a</sup> por M, y
  - (f) la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 302<sup>a</sup> por E;
57. [57] Un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 33;
58. [58] El anticuerpo de acuerdo con el apartado [45]-[57], donde el anticuerpo tiene un contenido reducido de fucosa unida a la región Fc del anticuerpo;
59. [59] Una composición que comprende el anticuerpo de acuerdo con los apartados [45]-[58] y un portador farmacéuticamente aceptable.
60. [60] Un agente anticanceroso que comprende como ingrediente activo el anticuerpo de acuerdo con los apartados [45]-[58];
61. [61] El agente anticanceroso de acuerdo con el apartado [60], donde el cáncer es cáncer de hígado;
62. [62] Un ácido nucleico que codifica un polipéptido del anticuerpo de acuerdo con los apartados [45]-[58];
63. [63] Una célula anfitriona que comprende el ácido nucleico de acuerdo con el apartado [62];
64. [64] la célula anfitriona de acuerdo con el apartado [63], donde la célula anfitriona es una célula animal carente de transportador de fucosa, una célula animal con la fucosiltransferasa suprimida, o una célula animal en la que se modifica una modificación de la cadena de azúcar ramificada compleja;
65. [65] Un método para preparar un anticuerpo que comprende cultivar la célula anfitriona de acuerdo con los apartados [63] o [64] y recuperar un polipéptido del cultivo celular.

#### Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 es un diagrama obtenido de la medición calorimétrica de barrido diferencial (DSC) del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2);

La Figura 2 es un electroforetograma del anticuerpo H0L0 y el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) en una electroforesis isoelectrica de elevado pI, donde las calles 1 y 4 muestran los marcadores de pI, la calle 2 muestra el anticuerpo H0L0, y la calle 3 muestra el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), donde los valores numéricos muestran los valores de pI de las moléculas de marcador de pI y las flechas muestran las movilidades electroforéticas de las correspondientes moléculas de marcadores de pI;

La Figura 3 es un electroforetograma del anticuerpo H0L0 y el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) en una electroforesis isoelectrica de bajo pI, donde las calles 1 y 4 muestran los marcadores de pI, la calle 2 muestra el anticuerpo H0L0, y la calle 3 muestra el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6), donde los valores numéricos muestran los valores de pI de las moléculas de marcador de pI y las flechas muestran las movilidades electroforéticas de las correspondientes moléculas de marcadores de pI;

La Figura 4 es un diagrama que muestra la afinidad de unión del anticuerpo H15L4 y el anticuerpo H0L0 para el antígeno glicicano 3 en un ELISA competitivo, donde el rombo negro hace referencia a la afinidad de unión del anticuerpo H0L0 y el cuadrado gris hace referencia a la afinidad de unión del anticuerpo H15L4;

La Figura 5 es un diagrama que muestra la afinidad de unión del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) y el anticuerpo H0L0 para el antígeno glicicano 3 en un ELISA competitivo ELISA, donde el rombo negro hace referencia a la afinidad de unión del anticuerpo H0L0 y el cuadrado gris hace referencia a la afinidad de unión del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2);

La Figura 6 es un diagrama que muestra la afinidad de unión del anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) y el anticuerpo H0L0 para el antígeno glicicano 3 en un ELISA competitivo, donde el rombo negro hace referencia a la afinidad de unión del anticuerpo H0L0 y el cuadrado gris hace referencia a la afinidad de unión del anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6);

La Figura 7 muestra la actividad anti-tumoral del anticuerpo H0L0, el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), y el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) en un modelo de ratón de cáncer de hígado humano transplantado;

La Figura 7A muestra la actividad anti-tumoral del anticuerpo H0L0, el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), y el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) en un modelo de ratón de cáncer de hígado humano transplantado cuando se administró cada compuesto al modelo a una dosis de 5 mg/kg, donde el rombo negro muestra la actividad para la administración de vehículo, el triángulo negro muestra el efecto de la administración del anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6), el círculo blanco muestra el efecto de la administración del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), y el cuadrado negro muestra el efecto de la administración del anticuerpo H0L0;

La Figura 7B muestra la actividad anti-tumoral del anticuerpo H0L0, el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), y el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) en un modelo de ratón de cáncer de hígado

humano transplantado cuando se administró cada anticuerpo de ensayo al modelo a una dosis de 1 mg/kg, donde el rombo negro muestra la actividad para la administración de vehículo, el triángulo negro muestra el efecto de la administración del anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6), el círculo blanco muestra el efecto de la administración del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), y el cuadrado negro muestra el efecto de la administración del anticuerpo H0L0;

la Figura 8 muestra las concentraciones en plasma para el anticuerpo H0L0, el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), y el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) en un modelo de ratón de cáncer de hígado humano transplantado;

La Figura 8A muestra la concentración en plasma para el anticuerpo H0L0, el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), y el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) administrado a un modelo de ratón de cáncer de hígado humano transplantado cuando se administró cada anticuerpo de ensayo al modelo a una dosis de 5 mg/kg, donde el triángulo negro muestra la concentración en plasma del anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6), el círculo blanco muestra la concentración en plasma del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), y el cuadrado negro muestra la concentración en plasma del anticuerpo H0L0;

La Figura 8B muestra la concentración en plasma para el anticuerpo H0L0, el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), y el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) en un modelo de ratón de cáncer de hígado humano transplantado cuando se administró cada anticuerpo de ensayo al modelo a una dosis de 1 mg/kg, donde el triángulo negro muestra la concentración en plasma del anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6), el círculo blanco muestra la concentración en plasma del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), y el cuadrado negro muestra la concentración en plasma del anticuerpo H0L0; y

La Figura 9 muestra la actividad ADCC de los anticuerpos de ensayo contra las células HepG2, una línea celular de cáncer de hígado humano, donde el triángulo negro muestra la actividad ADCC por el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6), el círculo blanco muestra la actividad ADCC por el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), y el cuadrado negro muestra la actividad ADCC por el anticuerpo H0L0.

La Figura 10 muestra la afinidad de unión del anticuerpo H0L0, el anticuerpo Hd1.8Ld1.6, el anticuerpo pH7pL14 y el anticuerpo pH7pL16 para el antígeno glipicano 3 medida por medio de un ELISA competitivo, donde el círculo negro muestra la actividad de unión del anticuerpo H0L0, el círculo blanco muestra la actividad de unión del anticuerpo Hd1.8Ld1.6, el cuadrado negro muestra la actividad de unión del anticuerpo pH7pL14, y el cuadrado blanco muestra la actividad de unión del anticuerpo pH7pL16.

La Figura 11 muestra la actividad anti-tumoral del anticuerpo H0L0, el anticuerpo pH7pL14 y el anticuerpo pH7pL16 en un modelo de ratón de cáncer hepático humano implantado, donde \* muestra la actividad anti-tumoral del anticuerpo H0L0, el círculo blanco muestra la actividad anti-tumoral del anticuerpo Hd1.8Ld1.6, el cuadrado negro muestra la actividad anti-tumoral del anticuerpo pH7pL14, y el cuadrado blanco muestra la actividad anti-tumoral del anticuerpo pH7pL16.

La Figura 12 muestra la concentración en plasma para el anticuerpo H0L0, el anticuerpo Hd1.8Ld1.6, el anticuerpo pH7pL14, el anticuerpo pH7pL16 y el anticuerpo pH7M85pL16 en ratones, donde \* muestra la concentración en plasma del anticuerpo del anticuerpo H0L0, el círculo blanco muestra la concentración en plasma del anticuerpo Hd1.8Ld1.6, el cuadrado negro muestra la concentración en plasma del anticuerpo pH7pL14, el cuadrado blanco muestra la concentración en plasma del anticuerpo pH7pL16, el triángulo negro muestra la concentración en plasma del anticuerpo pH7M85pL16 en ratón.

La Figura 13 muestra la actividad ADCC por el anticuerpo H0L0, el anticuerpo Hd1.8Ld1.6, el anticuerpo pH7pL14, y el anticuerpo pH7pL16 contra células HepG2, una línea celular de cáncer de hígado humano, donde el círculo negro muestra la actividad ADCC por el anticuerpo H0L0, el círculo blanco muestra la actividad ADCC por el anticuerpo Hd1.8Ld1.6, el cuadrado negro muestra la actividad ADCC por el anticuerpo pH7pL14, y el cuadrado blanco muestra la actividad ADCC por el anticuerpo pH7pL16.

La Figura 14 muestra la afinidad de unión del anticuerpo H0L0, el anticuerpo H0M85L0, el anticuerpo pH7pL16 y el anticuerpo pH7M85pL16 para el antígeno glipicano 3 medida por medio de un ELISA competitivo, donde el triángulo negro muestra la actividad de unión del anticuerpo H0L0, el cuadrado negro muestra la actividad de unión del anticuerpo H0M85L0, \* muestra la actividad de unión del anticuerpo pH7pL16, y el rombo blanco muestra la actividad de unión del anticuerpo pH7M85pL16.

La Figura 15 muestra la actividad ADCC por el anticuerpo pH7pL16 y el anticuerpo pH7M85pL16 contra células HepG2, una línea celular de cáncer de hígado humano, donde el cuadrado blanco muestra la actividad ADCC por el anticuerpo pH7pL16, y el triángulo negro muestra la actividad ADCC por el anticuerpo pH7M85pL16.

### Descripción Detallada de las Realizaciones Preferidas

La presente descripción proporciona un método para modular la cinética en plasma de un anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3). El método comprende la modificación en la carga de al menos un residuo de aminoácido que puede estar expuesto sobre la superficie del anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3). Esto es, la cinética en plasma de un anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) puede ser modulada modificando la carga de un residuo de aminoácido del anticuerpo para ocasionar un cambio en el punto isoeléctrico (pI) del mismo. El anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) que tiene una cinética en plasma modulada es capaz de mostrar una actividad anti-tumoral sobre las células cancerosas que es superior a la del anticuerpo no modulada.

Entre los diversos isotipos de anticuerpos, las rutas metabólicas principales del anticuerpo IgG no se desarrollan vía

excreción renal debido al peso molecular suficientemente elevado del anticuerpo IgG. Se sabe que el anticuerpo IgG, que contiene la región Fc como parte de su molécula, tiene una vida media in vivo prolongada debido al reciclaje por medio de una ruta de recuperación mediada por el receptor Fc neonatal (FcRn), que es expresado por las células endoteliales, por ejemplo, en el sistema vascular. Se piensa que el anticuerpo IgG es metabolizado principalmente por las rutas metabólicas en las células endoteliales (He X. Y., Xu Z., Melrose J., Mullowney A., Vasquez M., Queen C., Vexler V., Klingbeil C., Co M. S., y Berg E. L., Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin, *J. Immunol.* (1998), 160(2), 1029-35). Esto es, se piensa que el anticuerpo IgG es reciclado por medio de la unión al FcRn de un anticuerpo IgG absorbido de manera no específica por la célula endotelial, mientras el anticuerpo IgG que no puede ser unido es metabolizado. El anticuerpo IgG que tiene la región Fc modificada para disminuir la actividad de unión a FcRn muestra una vida media en el plasma más corta. En contraste, la vida media en plasma del anticuerpo IgG se puede incrementar modificando los residuos de aminoácido que constituyen la región Fc del anticuerpo IgG para incrementar la actividad de unión a FcRn (He X. Y., Xu Z., Melrose J., Mullowney A., Vasquez M., Queen C., Vexler V., Klingbeil C., Co M. S., y Berg E. L., Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin, *J. Immunol.* (1998), 160(2), 1029-35; y LinksOber RJ, Radu CG, Ghetie V, Ward ES. Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int Immunol.* (2001) 13(12), 1551-9). Como se ha descrito antes, los métodos conocidos para modular la cinética en plasma del anticuerpo IgG implicaban la modificación de la actividad de unión a FcRn por medio de la modificación de los residuos de aminoácido que constituyen la región Fc. Los ejemplos específicos de los residuos de aminoácido anteriores incluyen los residuos de aminoácido H250, H253, H310, H311, H314, H428, H435 y H436, de acuerdo con la numeración de Kabat. Por añadidura, se pensó que los residuos de aminoácido H254, H255, H257, H288, H296, H307, H309, H315, H415, H433, que implican indirectamente la interacción entre los anticuerpo IgG y FcRn, eran la diana para la modificación. Estos residuos de aminoácido corresponden, por ejemplo, a los residuos de aminoácido 130, 133, 190, 191, 194, 308, 315 y 316<sup>o</sup>, y los residuos de aminoácido 134, 135, 137, 168, 176, 187, 189, 195, 295 y 313<sup>o</sup> en el SEQ ID NO: 30, así como los residuos de aminoácido 133, 136, 193, 194, 197, 311, 318 y 319<sup>o</sup> y los residuos de aminoácido 137, 138, 140, 171, 179, 190, 192, 198, 298 y 316<sup>o</sup> en el SEQ ID NO: 31, respectivamente. No obstante, como se muestra en los ejemplos proporcionados más abajo, se ha descubierto ahora mediante la presente invención que la vida media en plasma de un anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) depende del pl con una alta correlación. De este modo, ahora se demuestra que la vida media en plasma para el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) puede ser modulada sin modificar los residuos de aminoácido que constituyen la región de unión a FcRn, cuya modificación podría invocar la inmunogenicidad, en particular los residuos de aminoácido H250, H253, H310, H311, H314, H428, H435 y H436, así como H254, H255, H257, H288, H296, H307, H309, H315, H415 y H433 de acuerdo con la numeración de Kabat. También fue un resultado sorprendente que la modificación de los residuos de aminoácido distintos de H250, H253, H310, H311, H314, H428, H435 y H436, así como H254, H255, H257, H288, H296, H307, H309, H315, H415 y H433 mostrara un descenso en el valor de pl y un cambio en la actividad de unión a FcRn.

Si bien no desean estar vinculados a ninguna teoría concreta, los autores de la presente invención mantienen la siguiente visión en el momento presente. Se piensa que la tasa de absorción no específica del anticuerpo IgG por las células endoteliales depende de la interacción Colúmbica fisicoquímica entre el anticuerpo IgG y la superficie celular cargada negativamente. Por lo tanto se piensa que la disminución (aumento) en la interacción Colúmbica reduciendo (elevando) el pl del anticuerpo IgG puede ocasionar un descenso (aumento) en la absorción no específica por la célula endotelial, que a su vez ocasiona un descenso (aumento) en el metabolismo en la célula endotelial producido en la modulación de la cinética del plasma. Según se utiliza en la presente memoria, "disminuir la interacción Colúmbica" significa un incremento en la fuerza Colúmbica expresada en una fuerza repulsiva. Puesto que la interacción Colúmbica entre el anticuerpo y la carga negativa de la superficie de la célula de la célula endotelial es una interacción fisicoquímica, se cree que esta interacción no depende principalmente de la secuencia de aminoácidos per se que constituye el anticuerpo. Por lo tanto, el método de modulación de la cinética en plasma descrito en la presente invención puede ser aplicado ampliamente a cualquier anticuerpo o anticuerpo anti-glipicano 3, pero no se limita solamente a un anticuerpo específico o a un anticuerpo anti-glipicano 3.

Cuando se utiliza un anticuerpo IgG como anticuerpo (p. ej. anticuerpo anti-glipicano 3) de la presente invención, se puede utilizar cualquier subtipo siempre que éste sea una molécula de anticuerpo de tipo IgG. También se puede utilizar un anticuerpo IgG biespecífico. Cuando el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) de la presente invención es un anticuerpo biespecífico, el anticuerpo también se puede unir específicamente tanto al antígeno correspondiente (molécula de glipicano 3 en el caso del anticuerpo anti-glipicano 3) como a un epítipo distinto de ese antígeno. Por ejemplo, para reclutar células NK, células T citotóxicas, células LAK, etcétera, se puede utilizar adecuadamente como otro antígeno un antígeno de superficie que se una específicamente a estas células. Se ha demostrado que la citotoxicidad por células LAK se manifiesta frente al cáncer del conducto biliar utilizando un anticuerpo biespecífico producido a partir del anticuerpo MUSE11 que reconoce MUC1 (un antígeno relacionado con el adenocarcinoma), y un anticuerpo OKT3 que reconoce el antígeno de superficie de células IAK (Katayose Y., Kudo T., Suzuki M., Shinoda M., Saijyo S., Sakurai N., Saeki H., Fukuhara K., Imai K., y Matsuno S., MUC1-specific targeting immunotherapy with bispecific antibodies: inhibition of xenografted human bile duct carcinoma growth, *Cancer Res.* (1996) 56(18), 4205-12). El anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) que tiene una cinética en plasma mejorada de la presente invención se puede utilizar adecuadamente en lugar del anticuerpo MUSE11 que reconoce MUC1. Además, el anticuerpo que reconoce diferentes epítopos del antígeno al cual se une el anticuerpo

- (la molécula de glipicano 3 en el caso del anticuerpo anti-glipicano 3) también se puede utilizar adecuadamente como anticuerpo biespecífico (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) de la presente invención. En el caso de anticuerpos de bajo peso molecular para los cuales la excreción renal es la principal ruta metabólica, tales como scFv y Fab, la cinética en plasma de tales anticuerpos no puede ser modulada por el pl como se ha descrito antes.
- 5 Sin embargo, el método se puede aplicar a cualquier tipo de molécula de anticuerpo si éste es una proteína acoplada a Fc para la cual la excreción renal no es la ruta metabólica principal. Los ejemplos de tales moléculas incluyen scFv-Fc, dAb-Fc y las proteínas de fusión con Fc. Puesto que la principal ruta metabólica de estas moléculas no es a través del metabolismo por excreción renal, la cinética en plasma de estas moléculas puede ser modulada cambiando el pl de acuerdo con el método. Las moléculas de tipo anticuerpo están incluidas en las
- 10 moléculas de anticuerpo concebidas por la invención. Las moléculas de tipo anticuerpo son moléculas que funcionan uniéndose a una molécula diana (Binz H. K., Amstutz P., y Pluckthun A., Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains, Nat. Biotechnol. (2005) 23(10), 1257-68); y los ejemplos incluyen DARPs, Affibody, y Avimer.
- 15 El término "cinética en plasma modulada" según se utiliza en la presente memoria significa que las cinética en plasma se modifican en la dirección deseada cuando se comparan las cinéticas en plasma para el anticuerpo después de la modificación de los aminoácidos que constituyen el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) con las cinéticas en plasma para el anticuerpo antes de la modificación. De este modo, cuando se desea incrementar la vida media en plasma para el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3), la "modulación de la
- 20 cinética en plasma" hace referencia a un incremento en la vida media en plasma para el anticuerpo. Cuando se desea disminuir la vida media en plasma para el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3), la "modulación de la cinética en plasma" hace referencia a una disminución de la vida media en plasma para el anticuerpo.
- Si la cinética en plasma para el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) de la presente invención ha sido
- 25 modificada en la dirección deseada, esto es, si la cinética en plasma ha sido modulada a voluntad, se puede evaluar apropiadamente por medio de ensayos farmacocinéticos utilizando, por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, mono, etcétera. Además, una "prolongación de la vida media en plasma" o un "disminución de la vida media en plasma" según se utiliza en la presente memoria también pueden ser concebidas a través de parámetros distintos del
- 30 parámetro de la vida media en plasma, tales como el tiempo medio de residencia en plasma y el aclaramiento en plasma (*Pharmacokinetics Analysis by Practice*, (Nanzando)). Por ejemplo, la "modulación de la cinética en plasma" de acuerdo con la presente invención se puede evaluar adecuadamente con estos parámetros llevando a cabo un análisis no compartimental de acuerdo con las instrucciones que acompañan al soporte lógico de análisis farmacocinético in vivo WinNonlin (Pharsight).
- 35 La expresión "residuo de aminoácido que puede estar expuesto sobre la superficie" según se utiliza en la presente memoria indica generalmente un residuo de aminoácido que reside sobre la superficie del polipéptido que constituye el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3). La expresión "residuo de aminoácido que reside sobre la superficie del polipéptido" hace referencia a un residuo de aminoácido cuya cadena lateral puede entrar en contacto con moléculas disolventes (típicamente moléculas de agua). No es necesario que toda su cadena lateral entre en
- 40 contacto con las moléculas disolventes. Incluso si una porción de la cadena lateral de un residuo de aminoácido entra en contacto con moléculas disolventes, se considera que dicho residuo de aminoácido es un residuo de aminoácido que reside sobre la superficie. Los expertos en la técnica pueden construir un modelo de homología del polipéptido o anticuerpo utilizando el soporte lógico de modelado de homología disponible en el mercado. Basándose en este modelo de homología, los residuos de aminoácido de la superficie del polipéptido que constituye
- 45 el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) se pueden seleccionar apropiadamente como "residuos de aminoácido que residen sobre la superficie del polipéptido".
- El "residuo de aminoácido que puede estar expuesto sobre la superficie" no está particularmente limitado, pero es preferiblemente un residuo de aminoácido que reside fuera de la región de unión FcRn para el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3). La región de unión FcRn es preferiblemente la región Fc, pero también puede incluir, por
- 50 ejemplo, una región que consiste en uno o más residuos de aminoácido H250, H253, H310, H311, H314, H428, H435 y H436 de acuerdo con la numeración de Kabat. Además, se pensaba que los residuos de aminoácido H254, H255, H257, H288, H296, H307, H309, H315, H415, H433, que implican indirectamente a la interacción entre anticuerpos IgG y FcRn, eran la diana para la modificación. Estos residuos de aminoácido corresponden, por
- 55 ejemplo, a los residuos de aminoácido 130, 133, 190, 191, 194, 308, 315 y 316<sup>o</sup>, y a los residuos de aminoácido 134, 135, 137, 168, 176, 187, 189, 195, 295 y 313<sup>o</sup> del SEQ ID NO: 30, así como a los residuos de aminoácido 133, 136, 193, 194, 197, 311, 318 y 319<sup>o</sup> y a los residuos de aminoácido 137, 138, 140, 171, 179, 190, 192, 198, 298 y 316<sup>o</sup> del SEQ ID NO: 31, respectivamente.
- 60 El residuo de aminoácido que se va a someter a una modificación de la carga en el anticuerpo anti-glipicano 3 es preferiblemente un residuo de aminoácido que constituye región variable de la cadena pesada (cadena H) o la región variable de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo. Los ejemplos específicos preferidos de estas regiones variables son la región determinante de la complementariedad (CDR) y la región marco (FR).
- 65 Los expertos en la técnica pueden seleccionar apropiadamente residuo de aminoácido de la superficie de la región variable del anticuerpo basándose en un modelo de homología construido mediante modelado por homología. De

este modo, un residuo de aminoácido de la superficie de la región variable del anticuerpo se puede seleccionar adecuadamente entre H1, H3, H5, H8, H10, H12, H13, H15, H16, H19, H23, H25, H26, H39, H42, H43, H44, H46, H68, H71, H72, H73, H75, H76, H81, H82b, H83, H85, H86, H105, H108, H110, y H112, que son residuos de aminoácido de acuerdo con la numeración de Kabat. Por ejemplo, en la FR de la cadena pesada del anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado mostrada en el SEQ ID NO: 1, los residuos de aminoácido de la superficie pueden incluir, pero no están limitados a, los residuos de aminoácido de las posiciones 1, 3, 5, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 19, 23, 25, 26, 39, 42, 43, 44, 46, 69, 72, 73, 74, 76, 77, 82, 85, 87, 89, 90, 107, 110, 112, y 114. También se puede seleccionar un residuo de aminoácido de la superficie en la CDR de la cadena pesada utilizando el mismo modelo de homología. De este modo, H97, un residuo de aminoácido de acuerdo con la numeración de Kabat, está expuesto en la superficie para casi todos los anticuerpos. Por ejemplo, la serina de la posición 101 de la CDR de la cadena pesada del anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado mostrada en el SEQ ID NO: 1 corresponde a ese residuo de aminoácido. Los ejemplos adecuados de otros residuos de aminoácido de la CDR de la cadena pesada del anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado mostrada en el SEQ ID NO: 1 son los residuos de aminoácido de las posiciones 52, 54, 62, 63, 65, y 66.

Con respecto a FR de la cadena ligera, los residuos de aminoácido de la superficie de la región variable del anticuerpo se pueden seleccionar adecuadamente entre L1, L3, L7, L8, L9, L11, L12, L16, L17, L18, L20, L22, L38, L39, L41, L42, L43, L45, L46, L49, L57, L60, L63, L65, L66, L68, L69, L70, L74, L76, L77, L79, L80, L81, L85, L100, L103, L105, L106, y L107 de los residuos de aminoácido de acuerdo con la numeración de Kabat. Por ejemplo, los aminoácidos superficiales pueden incluir, pero no están limitados a, 1, 3, 7, 8, 9, 11, 12, 16, 17, 18, 20, 22, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 54, 62, 65, 68, 70, 71, 73, 74, 75, 79, 81, 82, 84, 85, 86, 90, 105, 108, 110, 111, y 112 del anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado mostrado en el SEQ ID NO: 7. Los residuos de aminoácido de la superficie en la CDR de la cadena ligera se pueden seleccionar utilizando el mismo modelo de homología con el cual se determinaron los residuos de aminoácido superficiales de la CDR de la cadena pesada. Los ejemplos adecuados de los residuos de aminoácido en la CDR de la cadena ligera del anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado mostrada en el SEQ ID NO: 7 son los residuos de aminoácido de las posiciones 24, 27, 33, 55, y 59.

El término "modificación" en un residuo de aminoácido en el método de la presente invención indica específicamente, entre otros, la sustitución de un residuo de aminoácido original por otro residuo de aminoácido, la delección de un residuo de aminoácido original, y la adición de un nuevo residuo de aminoácido, e indica preferiblemente la sustitución de residuo de aminoácido original por otro residuo de aminoácido. De este modo, la "modificación en la carga de un residuo de aminoácido" en la presente invención es preferiblemente una sustitución de aminoácido.

Con el fin de llevar a cabo una "modificación en la carga de un residuo de aminoácido" en el anticuerpo anti-glipicano 3 de la presente invención, por ejemplo, la carga se modifica preferiblemente para al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre los residuos de aminoácido de las posiciones 19, 43, 52, 54, 62, 63, 65, 66, y 107 en la región variable de la cadena pesada que constituye el anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado mostrado en el SEQ ID NO: 1. Además, la carga se modifica preferiblemente, por ejemplo, para al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre los residuos de aminoácido de las posiciones 17, 24, 27, 33, 55, 59, 79, 82, 105 y 112 en la región variable de la cadena ligera que constituye el anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado mostrado en el SEQ ID NO: 7. Entre los residuos de aminoácido enumerados más arriba, no es necesario que los residuos de aminoácido distintos de los modificados en su carga sean modificados siempre que se obtenga el efecto modulador deseado sobre la cinética en plasma; sin embargo, dichos residuos de aminoácido se pueden modificar convencionalmente para que no tengan carga o tengan el mismo tipo de carga que el residuo o los residuos de aminoácido modificados.

Se sabe que están presentes aminoácidos que tienen carga. En general, lisina (K), arginina (R), e histidina (H) son conocidos como aminoácidos cargados positivamente. Ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E) son conocidos como aminoácidos cargados negativamente. Los aminoácidos distintos de estas son conocidos como aminoácidos no cargados.

Preferiblemente el "residuo de aminoácido modificado" anteriormente mencionado se selecciona convencionalmente entre, pero no está limitado a, los residuos de aminoácido presentes en cualquiera de los siguientes grupos (a) y (b).

- (a) ácido glutámico (E), ácido aspártico (D)
- (b) lisina (K), arginina (R), y histidina (H)

Cuando el residuo de aminoácido original (pre-modificación) ya tiene carga, la modificación para proporcionar un residuo de aminoácido no cargado es también una realización preferida de la presente invención. De este modo, la modificación de la presente invención abarca (1) la sustitución de un aminoácido cargado por un aminoácido no cargado, (2) la sustitución de un aminoácido cargado por un aminoácido que tiene una carga opuesta, y (3) la sustitución de un aminoácido no cargado por un aminoácido cargado.

Para la presente invención se prefiere la modificación de un residuo de aminoácido que constituye el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) para cambiar el punto isoeléctrico (pI) del anticuerpo. Además, en aquellos casos en los que se modificará una pluralidad de residuos de aminoácido, los residuos de aminoácido sometidos a modificación pueden incluir un pequeño número de residuos de aminoácido no cargados.

Los ejemplos adecuados de la "modificación en la carga de un residuo de aminoácido" en el anticuerpo anti-glicicano 3 de la presente invención son los siguientes. Con respecto a una modificación que incrementa el valor de pI, por ejemplo, se puede realizar al menos una sustitución seleccionada entre Q43K, D52N, y Q107R en la región variable de la cadena pesada que constituye el anticuerpo anti-glicicano 3 humanizado mostrado en el SEQ ID NO: 1, y es particularmente preferida una modificación en la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 4 o 6. Además, por ejemplo, se puede realizar al menos una sustitución seleccionada entre E17Q, Q27R, y Q105R en la región variable de la cadena ligera que constituye el anticuerpo anti-glicicano 3 humanizado mostrada en el SEQ ID NO: 7, y es particularmente preferida una modificación en la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 10 o 12. Por otra parte, con respecto a una modificación que disminuye el valor de pI, se puede realizar al menos una sustitución seleccionada entre K19T, Q43E, G62E, K63S, K65Q, y G66D en la región variable de la cadena pesada que constituye el anticuerpo anti-glicicano 3 humanizado mostrado en el SEQ ID NO: 1, y es particularmente preferida una modificación en la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 3, 5 o 27. Además, por ejemplo, se puede realizar al menos una sustitución seleccionada entre R24Q, Q27E, K79T, R82S y K112E en la región variable de la cadena ligera que constituye el anticuerpo anti-glicicano 3 humanizado mostrada en el SEQ ID NO: 7, y es particularmente preferida una modificación en la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 9, 11, 28 o 29. Además, la modificación que disminuye el valor de pI también incluye una sustitución de uno o más residuos de aminoácido en la región constante de la cadena pesada designada por H268, H274, H355, H356, H358 y H419 de acuerdo con la numeración de Kabat. Los ejemplos preferidos de sustitución son al menos una modificación en la región constante de la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 31 que incluye, por ejemplo, la sustitución de H que es el residuo de aminoácido 151<sup>o</sup> por Q, la sustitución de K que es el residuo de aminoácido 157<sup>o</sup> por Q, la sustitución de R que es el residuo de aminoácido 238<sup>o</sup> por Q, la sustitución de D que es el residuo de aminoácido 239<sup>o</sup> por E, la sustitución de L que es el residuo de aminoácido 241<sup>o</sup> por M, y la sustitución de Q que es el residuo de aminoácido 302<sup>o</sup> por E. La sustitución anterior dio como resultado una quimera de la región constante de IgG1 y la región constante de IgG4 de un anticuerpo humano. De este modo dicha sustitución permite la preparación de un anticuerpo modificado con un valor de pI deseado sin afectar a la inmunogenicidad del anticuerpo.

No existen limitaciones concretas sobre el número de residuos de aminoácido sometidos a modificación; por ejemplo, cuando la región variable del anticuerpo está siendo modificada, preferiblemente se modifica el número más pequeño de residuos de aminoácido necesario para lograr la cinética en plasma modulada deseada, con el fin de evitar disminuir la actividad de unión al antígeno y con el fin de evitar elevar la inmunogenicidad. También puede ser adecuado implementar una combinación adecuada con una modificación de un residuo de aminoácido que ocasione un descenso de la inmunogenicidad y/o una modificación de un residuo de aminoácido que ocasiona un incremento en la actividad de unión al antígeno.

Se pueden utilizar técnicas conocidas para medir la actividad de unión al antígeno del anticuerpo. Por ejemplo, se puede utilizar un análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), un inmunoanálisis enzimático (EIA), un radioinmunoanálisis (RIA), o un inmunoanálisis fluorescente. Estos métodos se describen en un libro de texto común, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor laboratory, 1988.

Los métodos descritos en las páginas 359 a 420 de *Antibodies: A Laboratory Manual* (Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor laboratory, 1988) son ejemplos de métodos que se pueden utilizar para medir la actividad de unión de un anticuerpo a células. La actividad de unión se puede evaluar basándose en un principio de FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) o ELISA utilizando las células como antígeno. En el formato ELISA, la actividad de unión de un anticuerpo a células se evalúa cuantitativamente comparando los niveles de señal generada por una reacción enzimática. De este modo, se añade un anticuerpo de ensayo a una placa de ELISA sobre la cual se han inmovilizado las células que se expresan en exceso y se detecta el anticuerpo unido a las células por medio de un anticuerpo marcado con enzima que reconoce el anticuerpo de ensayo. En el caso de FACS, la actividad de unión a las células se puede comparar construyendo una serie de diluciones con el anticuerpo de ensayo y comparando los títulos de unión de anticuerpo para las células que se expresan en exceso.

La unión entre un antígeno expresado sobre la superficie de células suspendidas en un tampón y no ancladas sobre un portador (tal como una placa de ELISA) y un anticuerpo para este antígeno se puede medir por medio del formato FACS. Los citómetros de flujo utilizados en dichas mediciones pueden incluir FACSCanto™ II, FACSAria™, FACSArray™, FACSVantage™ SE, y FACSCalibur™ (todos de BD Bioscience) y EPICS ALTRA HyPerSort, Cytomics FC 500, EPICS XL-MCL ADC, EPICS XL ADC, y Cell Lab Quanta/Cell Lab Quanta SC (todos de Beckman Coulter).

En un ejemplo de un método adecuado para medir la actividad de unión de un anticuerpo de ensayo anti-glicicano 3 a un antígeno, el anticuerpo de ensayo se hace reaccionar con una célula que expresa glicicano 3; las células se tiñen con un anticuerpo secundario marcado con FITC que reconoce el anticuerpo de ensayo; la intensidad de fluorescencia se mide con FACSCalibur (BD); y se analiza utilizando el soporte lógico CELL QUEST (BD). De acuerdo con este método, el anticuerpo de ensayo unido al glicicano 3 sobre la superficie de las células que expresan glicicano 3 se tiñe por medio del anticuerpo secundario marcado con FITC que reconoce específicamente el anticuerpo de ensayo, y se mide la intensidad de fluorescencia por medio de FACSCalibur, después se compara el valor medio geométrico (valor medio geo de ensayo) obtenido mediante análisis de la intensidad de fluorescencia resultante con el valor medio geo de control obtenido a partir de un anticuerpo de control utilizando el soporte lógico

CELL QUEST. Las fórmulas computacionales que producen el valor medio geo (medio geométrico) se describen en la Guía del Usuario del Soporte Lógico CELL QUEST (BD Biosciences).

5 Para evitar incrementar la inmunogenicidad *in vivo* para el ser humano que recibe el anticuerpo, la secuencia de aminoácidos modificada es preferiblemente, pero no está limitada a, una secuencia humana (secuencia observada en un anticuerpo natural de origen humano). Además, se pueden introducir adecuadamente mutaciones en localizaciones distintas de las de las modificaciones introducidas para cambiar el punto isoeléctrico, con el fin de modificar cada uno de la pluralidad de FR (FR1, FR2, FR3, FR4) en una secuencia humana. Un método que convierte cada una de las FR en una secuencia humana de esta manera es referido por Ono K., Ohtomo T., Yoshida K., Yoshimura Y., Kawai S., Koishihara Y., Ozaki S., Kosaka M., y Tsuchiya M., The humanized anti-HM1.24 antibody effectively kills multiple myeloma cells by human effector cell-mediated cytotoxicity, *Mol. Immunol.* (1999) 36(6), 387-395. Además, con el fin de cambiar el punto isoeléctrico del anticuerpo, se puede convertir cada una de las secuencias FR en otra secuencia FR humana para cambiar la carga de una FR concreta (por ejemplo, FR3 se puede cambiar por otra Fr humana con el fin de disminuir el punto isoeléctrico del anticuerpo). Dicho método de humanización es referido por Dall'Acqua W. F., Damschroder M. M., Zhang J., Woods R. M., Widjaja L., Yu J., y Wu H., Antibody humanization by framework shuffling, *Methods* (2005) 36(1), 43-60.

En aquellos casos en los que no se logra la cinética en plasma modulada deseada por medio de una modesta modificación de la carga superficial, se puede obtener adecuadamente un anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) que muestre la cinética en plasma modulada deseada mediante una ejecución repetitiva de la modificación de la carga superficial y evaluación de la cinética en plasma.

La cinética en plasma de EP5C7.g4 quimérico, un anticuerpo anti-E, P-selectina quimérico (IgG4), se ha comparado con la de HuEP5C7.g4, un anticuerpo humanizado (IgG4), y se demostró que los dos tenían la misma cinética en plasma en el mono Rhesus (He X. Y., Xu Z., Melrose J., Mullowney A., Vasquez M., Queen C., Vexler V., Klingbeil C., Co M. S., y Berg E. L., Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin, *J. Immunol.* (1998), 160(2), 1029-35). Además, la cinética en plasma de ch5d8, un anticuerpo anti-CD154 quimérico, se ha comparado con la del anticuerpo humanizado Hu5c8 en mono *Cynomolgus* y se demostró que los dos tenían la misma cinética en plasma (Gobburu J. V., Tenhoor C., Rogge M. C., Frazier D. E. Jr., Thomas D., Benjamin C., Hess D. M., y Jusko W. J., Pharmacokinetics/dynamics of 5c8, a monoclonal antibody to CD154 (CD40 ligand) suppression of an immune response in monkeys, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1998) 286(2), 925-30). Se demostró que la cinética en plasma del anticuerpo quimérico cCC49 era la misma que la del anticuerpo humanizado HuCC49 en ratones (Kashmiri S. V., Shu L., Padlan E. A., Milenic D. E., Schlom J., y Hand P. H., Generation, characterization, and *in vivo* studies of humanized anticarcinoma antibody CC49, *Hybridoma* (1995) 14(5), 461-73). Se demostró que la cinética en plasma y la distribución de anticuerpo de ratón y anticuerpo humanizado eran las mismas en evaluaciones en ratones (Graves S. S., Goshorn S. C., Stone D. M., Axworthy D. B., Reno J. M., Bottino B., Searle S., Henry A., Pedersen J., Rees A. R., y Libby R. T., Molecular modeling and preclinical evaluation of the humanized NR-LU-13 antibody, *Clin. Cancer Res.* (1999) 5(4), 899-908; Couto J. R., Blank E. W., Peterson J. A., y Ceriani R. L., Anti-BA46 monoclonal antibody Mc3: humanization using a novel positional consensus and *in vivo* and *in vitro* characterization, *Cancer Res.* (1995) 55(8) 1717-22). Se piensa que la cinética en plasma o la distribución de los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos humanizados son las mismas debido al hecho de que la Fc murina y la Fc humana presentan ambas reacción cruzada con la FcRn murina. Como se demuestra por medio de estos ejemplos, la cinética en plasma es la misma entre anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados que tienen las mismas CDR. Esto significa que la humanización mediante los métodos conocidos proporcionados por Ghetie V., Popov S., Borvak J., Radu C., Matesoi D., Medesan C., Ober R. J., y Ward E. S., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis, *Nat. Biotechnol.* (1997) 15(7), 637-40) etcétera, puede proporcionar la misma cinética en plasma que el anticuerpo quimérico, y por consiguiente no se puede preparar mediante métodos conocidos un anticuerpo humanizado que tenga una cinética en plasma modulada.

50 En contraste, cuando un anticuerpo quimérico (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3 quimérico) es humanizado, el pl del anticuerpo es modificado por medio de la modificación de un residuo de aminoácido que puede estar expuesto sobre la superficie del anticuerpo quimérico para construir un anticuerpo humanizado (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado) que muestra una cinética en plasma modulada (esto es, un incremento o un descenso en su vida media en plasma) en comparación con el anticuerpo quimérico original. Con el fin de modular la cinética en plasma, la modificación del aminoácido que puede estar expuesto sobre la superficie del anticuerpo humanizado (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado) se puede llevar a cabo al mismo tiempo que la humanización del anticuerpo, o se puede modificar el pl del anticuerpo humanizado por medio de una modificación del aminoácido expuesto en la superficie partiendo del anticuerpo humanizado (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado).

60 Se ha establecido que trastuzumab, bevacizumab, y pertuzumab, que son tres anticuerpos humanizados que han sido humanizados utilizando la misma secuencia FR de un anticuerpo humano, tienen aproximadamente la misma cinética en plasma (Adams C. W., Allison D. E., Flagella K., Presta L., Clarke J., Dybdal N., McKeever K., y Sliwkowski M. X., Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab, *Cancer Immunol Immunother.* (2006) 55(6), 717-27). De este modo, la cinética en plasma es aproximadamente la misma cuando los anticuerpos son humanizados utilizando la misma secuencia FR. De acuerdo con el método, la cinética en plasma del anticuerpo (p. ej. anticuerpo anti-glipicano 3) puede ser modulada en la

etapa de humanización en la que se modifica el pl del anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) añadiendo una modificación en un residuo de aminoácido que puede estar expuesto sobre la superficie del anticuerpo.

El método también se puede aplicar a anticuerpos humanos. Un anticuerpo humano (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3 humano) que tiene una cinética en plasma modulada con respecto a la cinética en plasma del anticuerpo humano preparado inicialmente (esto es, un incremento o un descenso en la vida media en plasma del primero) puede ser construido mediante la modificación del pl de un anticuerpo humano (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3 humano) añadiendo una modificación en un residuo de aminoácido que puede estar expuesto sobre la superficie de un anticuerpo humano construido a partir de una genoteca de anticuerpos humanos, un ratón productor de anticuerpos humanos, etcétera.

La vida media en plasma de un anticuerpo se incrementa disminuyendo el valor de pl del anticuerpo. En contraste, se sabe que la vida media en plasma disminuye y las características de translocación en los tejidos del anticuerpo mejoran elevando el valor de pl del anticuerpo (Vaisitti T., Deaglio S., y Malavasi F., Cationization of monoclonal antibodies: another step towards the "magic bullet"?, *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* (2005) 19(3-4), 105-12; Pardridge W. M., Buciak J., Yang J., y Wu D., Enhanced endocytosis in cultured human breast carcinoma cells and in vivo biodistribution in rats of a humanized monoclonal antibody after cationization of the protein, *J Pharmacol Exp Ther.* (1998) 286(1), 548-54). Sin embargo, debido al hecho de que dicho anticuerpo muestra un aumento de la inmunogenicidad y una potenciación de la internalización en la célula, se requieren mejoras adicionales para su aplicación como anticuerpo que muestra un efecto anti-canceroso por medio de un mecanismo tal como la actividad citotóxica, puesto que la internalización en la célula es un impedimento para la manifestación de su actividad citotóxica, tal como la actividad ADCC, la actividad CDC, etcétera. De este modo, con respecto al anticuerpo que muestra un efecto anti-canceroso por medio de un mecanismo tal como la actividad citotóxica, donde la internalización en la célula es un impedimento para la manifestación de su actividad citotóxica, tal como la actividad ADCC, la actividad CDC, etcétera, no ha sido determinado si un incremento en el valor de pl de un anticuerpo ocasiona una intensificación del efecto de inhibición tumoral. En la presente invención, se construyeron un anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado modificado con un valor de pl reducido y un anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado modificado con un valor de pl incrementado, y después se examinó la cuestión de cuál modificación tenía un actividad inhibidora tumoral más alta sometiendo ambos anticuerpos a un ensayo comparativo del efecto antitumoral. Como resultado, se demostró sorprendentemente que el anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado con el valor de pl reducido mostraba el mejor efecto contra el cáncer de hígado.

El término "anticuerpo anti-glipicano 3" según se utiliza en la presente memoria abarca anticuerpos anti-glipicano 3 obtenidos sometiendo un anticuerpo anti-glipicano 3 que ya se ha sometido a modificación de la carga de un residuo de aminoácido como se ha descrito más arriba, a una modificación adicional de su secuencia de aminoácidos, por ejemplo, sometiendo los residuos de aminoácido que constituyen este anticuerpo anti-glipicano 3 a sustitución, delección, adición, y/o inserción. Además, el término "anticuerpo anti-glipicano 3" según se utiliza en la presente memoria también incluye un anticuerpo anti-glipicano 3 obtenido partiendo de un anticuerpo anti-glipicano 3 que ya ha sido sometido a sustitución, delección, adición y/o inserción de un residuo de aminoácido, o a una modificación de su secuencia de aminoácidos, por ejemplo, por medio de quimerización, humanización, etcétera, y adicionalmente sometiendo los residuos de aminoácido que constituyen este anticuerpo anti-glipicano 3 a modificación de la carga.

Un ejemplo preferido de una modificación cuyo objetivo es mejorar las características del anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) de la presente invención es una modificación cuyo objetivo es elevar la estabilidad del anticuerpo (referida más abajo como modificación de la estabilidad). En solución acuosa, el anticuerpo se equilibra entre dos estados, su estado nativo y un estado desnaturalizado inactivo. La estabilidad del estado nativo, según se demuestra por medio de la segunda ley de la termodinámica ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ), depende del cambio en la energía libre de Gibbs  $\Delta G$  del sistema y del equilibrio entre los componentes de  $\Delta G$ , esto es, el cambio en la entalpía  $\Delta H$  (atribuible a cambios, por ejemplo, en las interacciones hidrófobas y el enlace de hidrógeno de la cadena polipeptídica) y el cambio en la entropía  $\Delta S$  (atribuible a cambios en la solvatación y los grados de libertad de la estructura tridimensional). Un valor positivo para  $\Delta G$  indica que el estado nativo de la proteína es más estable que el grado desnaturalizado de la proteína, y la estabilidad del estado nativo de la proteína aumenta a medida que  $\Delta G$  asume valores positivos más grandes. Las fuerzas que contribuyen a esta estabilidad deben ser distorsionadas para desnaturalizar la proteína. Por ejemplo, la exposición de la solución de proteína a temperaturas elevadas da como resultado un incremento en los grados de libertad de la estructura tridimensional o un debilitamiento de los factores que contribuyen a la estabilización de la proteína, causando una desnaturalización térmica de la proteína. En este caso el término  $-T\Delta S$  determina la desnaturalización. El  $\Delta H$  del desplegamiento debido a la desnaturalización térmica de la proteína se puede medir directamente mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC), como se describe específicamente en los ejemplos proporcionados en la presente memoria. La curva de DSC para el proceso de desnaturalización térmica de una proteína adopta la forma de un pico endotérmico que enmarca una temperatura, conocida como punto medio de desnaturalización ( $T_m$ ), que es característica de la proteína de ensayo. El cambio en la entalpía de desnaturalización se obtiene mediante integración de este pico. El valor de  $T_m$  es generalmente un indicador de la estabilidad térmica. El cambio en la capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ) también se puede medir durante la desnaturalización térmica de la proteína mediante DSC. El cambio en la capacidad calorífica que se produce durante la desnaturalización está causado principalmente por la hidratación que se produce cuando los residuos de aminoácido que no están expuestos sobre la superficie de la molécula cuando la proteína está en su estado nativo

quedan expuestos a las moléculas de disolvente durante el transcurso de la desnaturalización de la proteína.

Como se ha descrito antes, la "modificación" de un residuo de aminoácido en el método de la presente invención incluye específicamente, entre otros, la sustitución de un residuo de aminoácido original por otro residuo de aminoácido, la delección de un residuo de aminoácido original, y la adición de un nuevo residuo de aminoácido. Se prefiere la sustitución de un residuo de aminoácido original por otro residuo de aminoácido. De este modo, la modificación por sustitución de un residuo de aminoácido se utiliza preferiblemente en la presente invención cuando se pretende una modificación de la estabilidad del anticuerpo. El valor T<sub>m</sub> del anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) se incrementa como resultado de la ejecución de la modificación de la estabilidad sobre los residuos de aminoácido que constituyen el anticuerpo. De este modo, el valor T<sub>m</sub> se utiliza adecuadamente como un indicador de que se ha producido la modificación de la estabilidad del anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3).

Con el fin de llevar a cabo la "modificación de la estabilidad" anteriormente mencionada con el anticuerpo anti-glipicano 3 de la presente invención, la modificación se lleva a cabo preferiblemente, por ejemplo, en al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre los residuos de aminoácido de las posiciones 37, 40, 48, y 51 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado mostrada en el SEQ ID NO: 1. Además, la modificación se lleva a cabo preferiblemente en al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre los residuos de aminoácido de las posiciones 2, 25, 42, 48, 50, 83, y 84 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado mostrada en el SEQ ID NO: 7. No es necesario que los residuos de aminoácido distintos de los anteriormente mencionados sobre los cuales se ha llevado a cabo la modificación de la estabilidad, sean modificados siempre que se haya obtenido el valor T<sub>m</sub> deseado; sin embargo, puede ser apropiado llevar a cabo una modificación adecuada en ellos para proporcionar un valor T<sub>m</sub> que sea aproximadamente el mismo o mayor que el valor T<sub>m</sub> del anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado sometido a la modificación.

La modificación de la estabilidad se puede llevar a cabo modificando al azar los residuos de aminoácido que constituyen el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado) sometido a la modificación. Además, la modificación de la estabilidad también se puede llevar a cabo reemplazando una porción de la secuencia de aminoácidos que constituye el anticuerpo humanizado (p. ej. un anticuerpo anti-anticuerpo para glipicano 3) sometido a la modificación, por una secuencia de aminoácidos encontrada en un anticuerpo que ya tiene un valor T<sub>m</sub> elevado y que corresponde – desde el punto de vista de la correlación de la estructura tridimensional del anticuerpo – constituyendo dicha porción de la secuencia de aminoácidos el anticuerpo humanizado (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado) sometido a la modificación. No existen limitaciones sobre la posición del residuo o los residuos de aminoácido que sufren la sustitución; sin embargo, preferiblemente se modifican el residuo o los residuos de aminoácido de la FR. La modificación del residuo de aminoácido se puede llevar a cabo incluso, cuando proceda, en la región CDR siempre que no haya una reducción asociada en la actividad de unión al antígeno. Además, el número de residuos de aminoácido sometidos a modificación no está particularmente limitado, y la modificación se puede implementar incluso reemplazando un segmento concreto de la FR por un segmento deseado. Con respecto a dichos segmentos, todos los segmentos de la FR (FR1, FR2, FR3 FR4) pueden ser modificados, o se pueden combinar una o más de las modificaciones de segmentos.

La FR2 de la cadena pesada o la cadena ligera es un ejemplo preferido en aquellos casos en los que se modifica un segmento de la FR. Un ejemplo específico preferido en este aspecto es una modificación de un residuo de aminoácido en la que la FR2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado de la subclase VH1b (mostrada en el SEQ ID NO: 1) es modificada a la subclase VH4, esto es, las modificaciones V37I (la valina de la posición 37 es reemplazada por isoleucina) así como A40P, M48I, y L51I. Otros ejemplos específicos preferidos son una modificación de la región FR2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado de la subclase VK2 (mostrada en el SEQ ID NO: 7) a la subclase VK3, es decir, las modificaciones L42Q, S48A, y Q50R. También se prefiere la modificación V2I, que corresponde a una modificación a una secuencia de la línea germinal para FR1.

La ejecución de la sustitución, delección, adición, y/o inserción con respecto a los residuos de aminoácido que constituyen el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) y la modificación de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, mediante quimerización y humanización, se puede llevar a cabo, según convenga, mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. La ejecución de la sustitución, delección, adición, y/o inserción con respecto a los residuos de aminoácido que constituyen la región variable y la región constante del anticuerpo se pueden llevar a cabo de un modo similar según convenga, durante la construcción del anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) de la presente invención como anticuerpo recombinante.

Preferiblemente se puede utilizar como anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) de la presente invención cualquier anticuerpo de origen animal, p. ej., un anticuerpo de ratón, un anticuerpo humano, un anticuerpo de rata, un anticuerpo de conejo, un anticuerpo de cabra, un anticuerpo de camello. También se prefiere utilizar un anticuerpo modificado (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) obtenido mediante sustitución en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado. Asimismo se prefiere utilizar modificaciones de anticuerpos en las cuales se une una cualquiera de diferentes moléculas.

"Anticuerpo quimérico" hace referencia a un anticuerpo construido combinando secuencias procedentes de diferentes animales. Los ejemplos adecuados a este respecto son los anticuerpos construidos a partir de las

regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo de ratón y las regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo humano. Los métodos para construir anticuerpos quiméricos son conocidos. Por ejemplo, el ADN recombinante se genera por medio de la fusión en marco de ADN que codifica una región variable de un anticuerpo de ratón y ADN que codifica una región constante de un anticuerpo humano, y se puede incorporar a un vector de expresión convencional. Se cultiva una célula anfitriona transfectada o transformada con este vector y se puede preparar el anticuerpo quimérico o se puede aislar de un medio de cultivo mediante métodos adecuados.

Los anticuerpos humanizados también son conocidos como anticuerpos humanos remodelados. Estos son anticuerpos en los que una región determinante de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo aislado de un mamífero no humano, tal como un ratón, se liga a una región marco (FR) de un anticuerpo humano. La secuencia de ADN que codifica el anticuerpo humanizado se puede sintetizar por medio de una reacción PCR solapante utilizando una pluralidad de oligonucleótidos como cebadores. Las sustancias de partida y los procedimientos para las reacciones PCR solapantes se describen, por ejemplo, en el documento WO 98/13388 y en otros lugares. El ADN que codifica la región variable de un anticuerpo humanizado de la presente invención se obtiene por medio de PCR solapante a partir de una pluralidad de oligonucleótidos contruidos para que tengan secuencias de nucleótidos que solapen entre sí, que a su vez se liga con el ADN que codifica una región constante de un anticuerpo humano para formar una secuencia codónica en marco. El ADN ligado como se describe se inserta después operablemente en un vector de expresión seguido de transfección a un anfitrión.

Los métodos para identificar las CDR son conocidos (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., *Nature* (1989) 342, 877). Los procedimientos generales de recombinación genética para ello también son conocidos (remítase a los documentos EP 125023 A y WO 96/02576). Una vez que se ha determinado una CDR de un anticuerpo de un animal no humano, por ejemplo, un anticuerpo murino, se pueden utilizar estos y otros métodos para construir un ADN que codifica un anticuerpo recombinante en el que están ligadas la CDR y la FR de un anticuerpo humano. Las FR de anticuerpos humanos ligadas con la CDR se seleccionan de tal manera que la CDR forma un sitio de unión al antígeno alta calidad. De ser necesario, se puede modificar un residuo o residuos de aminoácido en las FR de las regiones variables del anticuerpo, según proceda para permitir que la CDR del anticuerpo humano remodelado forme un sitio de unión al antígeno adecuado (Sato et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-6). Los residuos de aminoácido de las FR sometidas a modificación pueden incluir residuos que se unen directamente al antígeno mediante enlaces no covalentes (Amit et al., *Science* (1986) 233, 747-53), residuos que influyen o actúan sobre la estructura de la CDR (Chothia et al., *J. Mol. Biol.* (1987) 196, 901-17), y residuos relacionados con las interacciones VH-VL (región variable de la cadena pesada-región variable de la cadena ligera) (documento EP 239400 B).

El anticuerpo humanizado codificado por el ADN es producido por la célula anfitriona que ha sido transformada o transfectada por el vector de expresión generalmente utilizado en el que se ha insertado el ADN y se aísla del medio de cultivo producido por el cultivo de la célula anfitriona.

Cuando el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano, preferiblemente se utiliza una región constante con origen en un anticuerpo humano como región constante para el anticuerpo. Por ejemplo, cuando el anticuerpo anti-glipicano 3 de la presente invención es un anticuerpo anti-glipicano 3 quimérico, un anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado o un anticuerpo anti-glipicano 3 humano, preferiblemente se utiliza una región constante con origen en un anticuerpo humano como región constante del anticuerpo anti-glipicano 3. Por ejemplo, Cy1, Cy2, Cy3, y Cy4 son adecuados cada uno para su uso como región constante de la cadena pesada, mientras Ck y Cl son cada uno adecuados para su uso como región constante de la cadena ligera. Además, la región constante del anticuerpo humano se puede modificar, según proceda, para mejorar el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) o mejorar la estabilidad de su producción. El anticuerpo quimérico (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3 quimérico) de la presente invención comprende adecuadamente una región variable de un anticuerpo de un mamífero no humano y una región constante de un anticuerpo humano. Por otra parte, el anticuerpo humanizado comprende preferiblemente una CDR de un anticuerpo de un mamífero no humano y una región constante y un FR de un anticuerpo humano. Por ejemplo, un anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado comprende preferiblemente una CDR de un anticuerpo anti-glipicano 3 de un mamífero no humano y una región constante y una FR de un anticuerpo humano. El anticuerpo humano comprende adecuadamente una CDR de un anticuerpo de origen humano y una región constante y un FR de un anticuerpo humano. Por ejemplo, el anticuerpo anti-glipicano 3 humano comprende adecuadamente una CDR de un anticuerpo anti-glipicano 3 de origen humano y una región constante y una FR de un anticuerpo humano. La región constante del anticuerpo humano está compuesta por una secuencia de aminoácidos que es característica del isotipo concreto, esto es, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA, IgD, e IgE. La región constante de un anticuerpo perteneciente a cualquiera de estos isotipos se utiliza adecuadamente como región constante del anticuerpo humanizado (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) de la presente invención. Se prefiere utilizar la región constante de la IgG humana, pero no está limitado a ello. Tampoco existen limitaciones concretas sobre la FR del anticuerpo humano utilizada como FR del anticuerpo humanizado (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado) o del anticuerpo humano (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3 humano), y se utiliza adecuadamente la FR de un anticuerpo perteneciente a cualquier isotipo.

- Con el propósito de disminuir la inmunogenicidad, también se pueden reemplazar todos o una porción de los residuos de aminoácido que constituyen la FR por secuencias de la línea germinal utilizando el método descrito por Ono K. et al., *loc. cit.*, o un método similar. Basándose en la predicción racional de que las secuencias de la línea germinal tendrán una inmunogenicidad baja, se puede comparar la secuencia de aminoácidos que constituye la FR del anticuerpo humanizado, por medio de alineamiento, con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal (Abhinandan K. R. y Martin C. R., J. Mol. Biol. (2007) 369, 852-862). Los residuos de aminoácido de la FR del anticuerpo humanizado que difieren en esta comparación pueden ser reemplazados, dentro de un intervalo que no deteriore las características de unión al antígeno, por residuos de aminoácido de una secuencia de la línea germinal. Los siguientes son ejemplos específicos de los residuos de aminoácido que constituyen la región variable de la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 1: modificación que reemplaza la L de la posición 70 por I, modificación que reemplaza la T de la posición 87 por R, y modificación que reemplaza la T de la posición 97 por A. Además, una modificación que reemplaza la S de la posición 25 por A es un ejemplo de los residuos de aminoácido que constituyen la región variable de la cadena ligera mostrada en el SEQ ID NO: 7.
- Con respecto a la región variable y la región constante del anticuerpo quimérico, el anticuerpo humanizado, y el anticuerpo humano modificados de la presente invención, se puede llevar a cabo la delección, sustitución, inserción, y/o adición según proceda en uno o más de los aminoácidos que constituyen la región variable y/o la región constante del anticuerpo que fue sometido a modificación, en tanto que muestre especificidad de unión al antígeno. En particular, en la región variable y la región constante del anticuerpo anti-glipicano 3 quimérico, el anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado, y el anticuerpo anti-glipicano 3 humano modificados de la presente invención, se puede llevar a cabo la delección, sustitución, inserción, y/o adición según proceda en uno o más de los aminoácidos que constituyen la región variable y/o la región constante del anticuerpo anti-glipicano 3 que se sometió a modificación, en tanto que muestre especificidad de unión por la molécula antigénica de glipicano 3.
- Debido a que los anticuerpos anti-glipicano 3 quiméricos que utilizan secuencias derivadas de seres humanos, los anticuerpos anti-glipicano 3 humanizados, y los anticuerpos anti-glipicano 3 humanos tienen una inmunogenicidad reducida en el organismo humano, se cree que son útiles para su aplicación como anticuerpos terapéuticos que se administran a seres humanos, por ejemplo, con un objetivo terapéutico.
- Se pueden utilizar secuencias conocidas en el método para las secuencias que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo para la introducción de una mutación. Además, las secuencias génicas del anticuerpo novedoso se pueden obtener mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden obtener adecuadamente genes a partir de genotecas de anticuerpos. Por otra parte, también se pueden obtener genes mediante clonación utilizando procedimientos conocidos, p. ej., RT-PCR utilizando como molde ARNm de un hibridoma productor de anticuerpo monoclonal.
- Ya se conocen numerosas genotecas de anticuerpos en la esfera de las genotecas de anticuerpos. Por otra parte, como los métodos para construir genotecas de anticuerpos también son conocidos, los expertos en la técnica serán capaces de obtener o construir genotecas de anticuerpos relevantes. Los ejemplos de las genotecas de anticuerpos adecuadas son las genotecas en fagos de anticuerpos descritas en la bibliografía, por ejemplo, Clackson et al., *Nature* (1991) 352, 624-8; Marks et al., *J. Mol. Biol.* (1991) 222, 581-97; Waterhouses et al., *Nucleic Acids Res.* (1993) 21, 2265-6; Griffiths et al., *EMBO J.* (1994) 13, 3245-60; Vaughan et al., *Nature Biotechnology* (1996) 14, 309-14; y *Solicitud de Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 2008-504970*. También se utilizan adecuadamente un método para construir una genoteca en células eucarióticas (documento WO 95/15393) y métodos conocidos tales como la presentación en ribosomas etcétera. La tecnología para obtener anticuerpos humanos mediante técnicas de inmunopurificación utilizando una genoteca de anticuerpos humanos como material de partida también es conocida por los expertos en la técnica. De este modo, los anticuerpos de cadena sencilla (scFv), que comprenden las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos humanos fusionadas en marco, se expresan sobre la superficie de un fago utilizando mecanismos de presentación en fagos. Los genes que codifican los scFv de unión al antígeno se aíslan de este fago seleccionando para determinar el fago que se une al antígeno. La identificación de la secuencia de dichos genes permite la determinación de la secuencia de ADN que codifica las regiones variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo anti-glipicano 3 humano que se une al antígeno glipicano 3. El anticuerpo anti-glipicano 3 humano se prepara adecuadamente insertando el gen del anticuerpo que tiene esta secuencia en un vector de expresión adecuado y permitiendo la expresión en una célula anfitriona adecuada como se describe más abajo. Tales métodos son bien conocidos en la técnica e incluyen los descritos en los documentos WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, y WO 95/15388.
- Se pueden utilizar las tecnologías conocidas para obtener un gen que codifica un anticuerpo a partir de un hibridoma que produce el anticuerpo, concretamente para obtener un gen que codifica un anticuerpo anti-glipicano 3 a partir de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal anti-glipicano 3. Brevemente, se inmuniza un animal con glipicano 3 (el antígeno sensibilizante deseado) utilizando una técnica de inmunización convencional y los inmunocitos obtenidos del animal se someten a fusión celular con células parentales conocidas mediante una técnica de fusión celular convencional, que se describe con detalle más abajo. Utilizando técnicas de escrutinio convencionales, se escrutan las células productoras de anticuerpo monoclonal (hibridomas), y se puede sintetizar el ADNc para la región variable (región V) del anticuerpo anti-glipicano 3 con la transcriptasa inversa utilizando el

ARNm aislado del hibridoma seleccionado como molde. Se prepara adecuadamente un gen del anticuerpo anti-glicoproteína 3 mediante fusión en marco de este ADNc con el ADN que codifica la región constante del anticuerpo deseado (región C).

5 A continuación se proporcionan ejemplos específicos, pero la presente invención no está limitada a estos ejemplos. El antígeno sensibilizante utilizado para generar el anticuerpo de la presente invención puede ser el antígeno inmunogénico completo o puede ser un antígeno incompleto, incluyendo, por ejemplo, un hapteno no inmunogénico. Por ejemplo, se puede utilizar adecuadamente la proteína glicoproteína 3 completa o un polipéptido parcial o péptido de la misma. Un ejemplo preferido es el polipéptido núcleo de GPC3 soluble mostrado en el SEQ ID NO: 13. Por lo  
10 demás, el uso de sustancias que comprenden polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos, etcétera como antígeno también es conocido. El antígeno al cual se une el anticuerpo anti-glicoproteína 3 de la presente invención no está particularmente limitado a las realizaciones descritas más arriba. La producción de antígeno se lleva a cabo adecuadamente mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar adecuadamente un método que utiliza baculovirus (por ejemplo, documento WO 98/46777 etcétera). Cuando el  
15 antígeno tiene una inmunogenicidad baja, el animal se puede inmunizar adecuadamente con dicho antígeno unido a una molécula inmunogénica muy grande, tal como albúmina. Cuando el antígeno sensibilizante es una molécula que abarca la membrana celular, tal como el glicoproteína 3, se utiliza adecuadamente un fragmento de polipéptido del dominio extracelular de la molécula según proceda como antígeno sensibilizante. O, se utiliza adecuadamente como antígeno sensibilizante una célula que expresa dicha molécula sobre la superficie celular. Además, cuando el  
20 antígeno sensibilizante es una molécula insoluble, la solubilización se puede efectuar anclando la molécula a otra molécula soluble en agua y después se puede utilizar adecuadamente la molécula solubilizada como antígeno sensibilizante.

Las células productoras de anticuerpo (p. ej. células productoras de anticuerpo anti-glicoproteína 3) se obtienen  
25 adecuadamente inmunizando un animal utilizando un antígeno sensibilizante adecuado como se describe más arriba. O, se pueden obtener células productoras de anticuerpo (p. ej. células productoras de anticuerpo anti-glicoproteína 3) mediante inmunización *in vitro* de linfocitos que son capaces de producir anticuerpo. Se pueden utilizar diferentes vertebrados y mamíferos como animal a inmunizar. En particular, se pueden utilizar generalmente roedores, lagomorfos, y primates como animal a inmunizar. Los roedores pueden incluir ratón, rata, y hámster; los  
30 lagomorfos pueden incluir conejo; y los primates pueden incluir monos tales como el mono *Cynomolgus*, mono rhesus, babuino *Hamadryas*, y chimpancé. Además, también se conocen animales transgénicos que conservan un repertorio de genes de anticuerpos humanos en su genoma, y se puede obtener anticuerpo humano adecuadamente utilizando dichos animales (documento WO 96/34096; Mendez et al., *Nat. Genet.* (1997) 15, 146-56). En lugar de utilizar dichos animales transgénicos, se puede obtener adecuadamente un anticuerpo humano que muestra  
35 actividad de unión a un antígeno deseado, por ejemplo, sensibilizando linfocitos humanos *in vitro* con el antígeno deseado o con células que expresan el antígeno deseado seguido de fusión celular con células de mieloma humano, por ejemplo, U266 (Publicación de Patente Japonesa Núm. Hei 1-59878). Además, se puede obtener adecuadamente un anticuerpo humano deseado (p. ej. un anticuerpo anti-glicoproteína 3 humano) por medio de la inmunización con un antígeno deseado de un animal transgénico que conserva el repertorio completo de genes de  
40 anticuerpos humanos en su genoma (documentos WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 96/34096, y WO 96/33735).

La inmunización del animal se lleva a cabo, por ejemplo, mediante dilución adecuada y suspensión del antígeno sensibilizante en solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica, etcétera; emulsión, según  
45 proceda, mediante mezclado de coadyuvante; y después inyección intraperitoneal o subcutánea del antígeno sensibilizante en el animal. Esto está seguido preferiblemente de varias administraciones del antígeno sensibilizante mezclado con coadyuvante incompleto de Freund en un intervalo de 4 a 21 días. La producción en el animal inmunizado del anticuerpo contra el antígeno sensibilizante se puede medir utilizando técnicas analíticas, por  
50 ejemplo, análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) y citometría de flujo (FACS).

Se puede preparar un hibridoma fusionando una célula productora de anticuerpo anti-glicoproteína 3 obtenida de un animal o linfocito inmunizado con el antígeno sensibilizante de interés, con células de mieloma utilizando un agente de fusión empleado convencionalmente para la fusión celular, p. ej., polietilenglicol (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986) 59-103). La producción de hibridoma se puede llevar a cabo  
55 adecuadamente, por ejemplo, de acuerdo con el método de Milstein et al. (G. Kohler y C. Milstein, *Methods Enzymol.* (1981) 73, 3-46). El cultivo y la proliferación de las células de hibridoma preparadas mediante este método proporcionan un anticuerpo monoclonal que es producido por el hibridoma y se une específicamente al glicoproteína 3. La especificidad de unión mostrada por este anticuerpo monoclonal para el glicoproteína 3 se puede medir adecuadamente mediante técnicas analíticas conocidas, tales como inmunoprecipitación, radioinmunoanálisis (RIA),  
60 análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), citometría de flujo (FACS), etcétera. De ser necesario, un hibridoma que produce anticuerpo anti-glicoproteína 3 con la especificidad, afinidad, o actividad deseada se puede subclonar después adecuadamente, por ejemplo, mediante dilución limitante, y se puede aislar el anticuerpo monoclonal producido por este hibridoma.

65 El gen que codifica el anticuerpo seleccionado se puede clonar después a partir del hibridoma o la célula productora de anticuerpo (p. ej., linfocito sensibilizado) utilizando una sonda capaz de unirse específicamente al gen (por ejemplo,

un oligonucleótido complementario a la secuencia que codifica la región constante del anticuerpo). La clonación también se puede llevar a cabo mediante RT-PCR utilizando ARNm aislado del hibridoma o células productora de anticuerpo (p. ej., linfocito sensibilizado) como molde. Las inmunoglobulinas se dividen en 5 clases diferentes, esto es, IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, basándose en las diferencias en su estructura y función. Además, las clases individuales se dividen en varias subclases (isotipos) (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4; IgA1 y IgA2; etcétera). El anticuerpo de la presente invención se puede originar a partir de un anticuerpo perteneciente a cualquiera de estas clases y subclases y no está particularmente limitado a ninguna clase o subclase; no obstante, son particularmente preferidos los anticuerpos pertenecientes a la clase IgG.

Los genes que codifican las secuencias de aminoácidos que constituyen la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) se pueden modificar, según proceda, por medio de técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, un anticuerpo que se ha sometido a una modificación artificial con el propósito, por ejemplo, de reducir la xeno-inmunogenicidad contra seres humanos (p. ej., un anticuerpo quimérico tal como un anticuerpo quimérico anti-glipicano 3, un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado, etcétera), se puede producir adecuadamente mediante modificación de residuos del ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos que constituye el anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, un anticuerpo de rata, un anticuerpo de conejo, un anticuerpo de hámster, un anticuerpo de oveja, un anticuerpo de camello, etcétera. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo constituido por las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo procedente de un mamífero no humano tal como un ratón, y las regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo humano. Se puede obtener un anticuerpo quimérico como sigue: se liga el ADN que codifica la región variable de un anticuerpo procedente de ratón con el ADN que codifica la región constante de un anticuerpo humano y se insertan en un vector de expresión, y el vector recombinante resultante se introduce en un anfitrión y se permite su expresión. Los anticuerpos humanizados también se conocen como anticuerpos humanos remodelados y son anticuerpos en los que la región determinante de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) aislado de un mamífero no humano tal como un ratón se liga con la región marco de un anticuerpo humano para formar una secuencia codónica en marco. La secuencia de ADN que codifica un anticuerpo humanizado se puede sintetizar por medio de una reacción PCR solapante utilizando una pluralidad de oligonucleótidos como moldes. Las sustancias de partida y los procedimientos para la reacción de PCR solapante se describen, por ejemplo, en el documento WO 98/13388 y en otros lugares.

El ADN que codifica la región variable del anticuerpo recombinante (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3 recombinante) de la presente invención se obtiene por medio de PCR solapante a partir de una pluralidad de oligonucleótidos construidos para que tengan secuencias de nucleótidos que se solapen entre sí, que a su vez se liga con un ADN que codifica la región constante de un anticuerpo humano para formar una secuencia codónica en marco. El ADN ligado de esta manera se inserta después de una manera operable en un vector de expresión, y se introduce en un anfitrión. El anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) codificado por el ADN se expresa cultivando el anfitrión. El anticuerpo expresado (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) se aísla purificándolo del medio de cultivo del anfitrión (documentos EP 239400, WO 96/02576, etcétera). Las FR del anticuerpo humanizado (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) ligadas con la CDR se seleccionan de tal manera que la región determinante de la complementariedad forma un sitio de unión al antígeno de alta calidad para el antígeno. La secuencia de aminoácidos se puede modificar, según proceda, mediante una sustitución adecuada de los residuos de aminoácido que constituyen las FR de la región variable del anticuerpo, para permitir que la región determinante de la complementariedad del anticuerpo remodelado forme un sitio de unión al antígeno adecuado para el antígeno (K. Sato et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856)

Además de las modificaciones relacionadas con la humanización comentadas más arriba, se pueden introducir modificaciones adicionales, por ejemplo, para mejorar las características bioquímicas del anticuerpo, p. ej., la actividad de unión con el antígeno reconocido por el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3). Las modificaciones en el contexto de la presente invención se pueden llevar a cabo adecuadamente mediante métodos conocidos tales como la mutagénesis de sitio específico (remitirse, por ejemplo, a Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82, 488), la mutación por PCR, la mutación de casete, etcétera. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo modificado con características bioquímicas mejoradas tiene generalmente una identidad y/o similitud de al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, e incluso más preferiblemente al menos 90% (por ejemplo, al menos 95%, 97%, 98%, 99%, etcétera) con la secuencia de aminoácidos que constituye el anticuerpo sometido a la modificación (esto es, el anticuerpo en el que se basa el anticuerpo modificado). Según se utiliza en la presente memoria, la identidad y/o similitud de referencia hace referencia a la proporción de residuos de aminoácido que son idénticos (residuos idénticos) o similares (residuos de aminoácido clasificados en el mismo grupo basándose en las características generales de la cadena lateral del aminoácido) después de alinear las secuencias e insertar espacios, según proceda, de tal manera que la identidad de secuencia suponga un máximo. Los residuos de aminoácido de origen natural se pueden clasificar generalmente en los siguientes grupos basándose en las propiedades de la cadena lateral: (1) hidrófobos: alanina, isoleucina, valina, metionina, y leucina; (2) hidrófilos neutros: asparragina, glutamina, cisteína, treonina, y serina; (3) ácidos: ácido aspártico y ácido glutámico; (4) alcalinos: arginina, histidina, y lisina; (5) residuos que afectan a la orientación de la cadena: glicina y prolina; y (6) aromáticos: tirosina, triptófano, y fenilalanina.

Una realización adecuada específica de una modificación para intensificar la función de un anticuerpo incluye una mejora en la citotoxicidad mostrada por el anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-glicoproteína 3 humanizado. Los ejemplos preferidos de citotoxicidad son la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En la presente invención, la actividad CDC indica citotoxicidad debido al sistema del complemento, mientras la ADCC hace referencia a una actividad que perjudica la célula diana cuando un anticuerpo específico se ancla al antígeno de superficie sobre la célula diana y una célula que porta un receptor de Fcγ (p. ej., un inmunocito) se une a la porción Fc del anticuerpo a través del receptor de Fcγ. Se puede medir si un anticuerpo de ensayo tiene actividad ADCC o tiene actividad CDC mediante métodos conocidos (por ejemplo, Current Protocols in Immunology, Capítulo 7, Immunologic studies in humans. Editor, John E. Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc., (1993)).

En términos específicos, se preparan primero las células efectoras, una solución de complemento, y las células diana.

**(1) Preparación de células efectoras**

Se aísla el bazo, por ejemplo, de un ratón CBA/N, y se separan las células del bazo sobre medio RPMI 1640 (Invitrogen). Después de lavar con el mismo medio que contiene suero bovino fetal al 10% (FBS, HyClone) se ajusta la concentración celular a  $5 \times 10^6$  células/mL para preparar las células efectoras.

**(2) Preparación de la solución de complemento**

La solución de complemento se puede preparar por medio de una dilución 10X de Baby Rabbit Complement (CEDARLANE) con medio que contiene FBS al 10% (Invitrogen).

**(3) Preparación de células diana**

Las células que expresan una proteína antigénica a la cual se une el anticuerpo de ensayo se cultivan con cromiato de sodio  $Cr^{51}$  a 0,2 mCi (GE Healthcare Bioscience) durante 1 hora a 37°C en medio DMEM que contiene FBS al 10% con el fin de radiomarcarse las células diana. Se pueden utilizar, entre otras, las siguientes como células que expresan una proteína antigénica a la cual se une el anticuerpo de ensayo: células transformadas con un gen que codifica una proteína antigénica a la cual se une el anticuerpo de ensayo, células de cáncer de ovario, células de cáncer de próstata, células de cáncer de mama, células de cáncer de útero, células de cáncer de hígado, células de cáncer de pulmón, células de cáncer pancreático, células de cáncer de riñón, células de cáncer de vejiga, y células de cáncer de colon. Después del radiomarcaje, las células se lavan tres veces con medio RPMI 1640 que contiene FBS al 10% y se ajusta la concentración celular a  $2 \times 10^5$  células/mL para preparar las células diana.

La actividad ADCC y la actividad CDC se pueden medir mediante los siguientes métodos. Con el fin de medir la actividad ADCC, se añaden 50 µL de las células diana y 50 µL del anticuerpo de ensayo a una placa con el fondo en U de 96 pocillos (Becton Dickinson) y se hacen reaccionar durante 15 minutos sobre hielo. Se añaden a la mezcla de reacción 100 µL de células efectoras y se incuban durante 4 horas en una incubadora con dióxido de carbono. La concentración final de anticuerpo de ensayo está preferiblemente en el intervalo de 0 a 10 µg/mL. Después de la incubación, se recuperan 100 µL del sobrenadante y se mide la radiactividad del sobrenadante utilizando un contador gamma (COBRA II AUTO-GAMMA, MODEL D5005, Packard Instrument Company). La citotoxicidad se puede calcular utilizando la radiactividad de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$(A - C) / (B - C) \times 100$$

donde A es la radiactividad (cpm) para la muestra utilizando un anticuerpo de ensayo concreto; B es la radiactividad (cpm) de la muestra a la que se ha añadido NP-40 al 1% (Nacalai Tesque); y C es la radiactividad (cpm) para la muestra que contiene solamente las células diana.

Para medir la actividad CDC, se añaden 50 µL de las células diana y 50 µL del anticuerpo de ensayo a una placa con el fondo plano de 96 pocillos (Becton Dickinson) y se hacen reaccionar durante 15 minutos sobre hielo. A la mezcla de reacción se le añaden 100 µL de solución de complemento y se incuban durante 4 horas en una incubadora con dióxido de carbono. La concentración final de anticuerpo de ensayo está preferiblemente en el intervalo de 0 a 3 µg/mL. Después del cultivo, se recuperan 100 µL del sobrenadante y se mide la radiactividad del sobrenadante con un contador gamma. La citotoxicidad se puede calcular de la misma manera que para la medida de la actividad ADCC.

Cuando se va a medir la citotoxicidad debida a un producto conjugado con anticuerpo, se añaden 50 µL de las células diana y 50 µL del producto conjugado con el anticuerpo de ensayo a una placa de fondo plano de 96 pocillos (Becton Dickinson) y se hacen reaccionar durante 15 minutos sobre hielo. Después la placa se incuba de 1-4 horas en una incubadora con dióxido de carbono. La concentración de anticuerpo de ensayo final está preferiblemente en el intervalo de 0 a 3 µg/mL. Tras la incubación, se recuperan 100 µL del sobrenadante y se mide la radiactividad del sobrenadante con un contador gamma. La citotoxicidad se puede calcular de la misma manera que para la medida

de la actividad ADCC.

Las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) están compuestas generalmente, como se ha descrito más arriba, por 3 CDR y 4 FR. Los residuos de aminoácido sometidos a "modificación" en una realización preferida de la presente invención se pueden seleccionar adecuadamente, por ejemplo, entre los residuos de aminoácido que constituyen las CDR o las FR. La modificación de los residuos de aminoácido que constituyen las CDR pueden causar en algunos casos una reducción de la actividad de unión al antígeno del anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) implicado en la modificación. Por consiguiente, los residuos de aminoácido del anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) sometidos a "modificación" en el presente método se seleccionan preferiblemente entre los residuos de aminoácido que constituyen las FR, pero no están limitados a ellos. Cuando se confirma que la modificación de los residuos de aminoácido localizados en las CDR no causan una reducción en la actividad de unión al antígeno del anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) implicado en la modificación, dichos residuos de aminoácido pueden ser seleccionados para la modificación.

Los expertos en la técnica pueden encontrar fácilmente en una base de datos pública, tal como la base de datos de Kabat, secuencias de aminoácidos que constituyen la FR de la región variable del anticuerpo que realmente existen en un organismo tal como un ratón o un ser humano.

Una realización preferida de la presente invención proporciona un anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado que tiene una cinética en plasma modulada. Por ejemplo, el anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado es un anticuerpo humanizado que comprende una región determinante de la complementariedad (CDR) derivada de un animal no humano, una región marco (FR) de origen humano, y una región constante humana, donde al menos un residuo de aminoácido que puede estar expuesto sobre la superficie del anticuerpo de la CDR o la FR tiene una carga diferente de la del residuo de aminoácido de la correspondiente posición de la CDR o la FR del anticuerpo original y donde el anticuerpo humanizado tiene una cinética en plasma modulada en comparación con el anticuerpo quimérico que tiene la misma región constante.

Otra realización preferida de la presente invención proporciona a anticuerpo anti-glipicano 3 humano que tiene una cinética en plasma modulada. El anticuerpo humano, por ejemplo, es un anticuerpo humano que comprende una región determinante de la complementariedad (CDR) de origen humano, una región marco (FR) de origen humano, y una región constante humana, donde al menos un residuo de aminoácido que puede estar expuesto sobre la superficie del anticuerpo de la CDR o la FR tiene una carga diferente de la del residuo de aminoácido de la correspondiente posición de la CDR o la FR del anticuerpo original y donde el anticuerpo humano tiene una cinética en plasma modulada en comparación con un anticuerpo quimérico que tiene la misma región constante.

La región constante humana anteriormente mencionada indica preferiblemente una región que comprende una región Fc humana de tipo salvaje, pero también se puede utilizar adecuadamente una Fc modificada. Dicha "Fc modificada" puede incluir una Fc modificada preparada mediante la modificación de un residuo de aminoácido que constituye la Fc así como una Fc modificada preparada mediante una modificación de la modificación ya ejecutada en el radical Fc. Un ejemplo preferido de dicha modificación de una modificación es la modificación de la naturaleza de la modificación de la cadena de azúcar anclada a la porción de Fc. Un ejemplo específico preferido es el "anticuerpo que tiene un contenido reducido de fucosa anclada a la región Fc" que se describe específicamente en la presente memoria como un ejemplo de referencia.

El término "anticuerpo que tiene un contenido reducido de fucosa anclada a la región Fc" indica un anticuerpo para el cual la cantidad de fucosa unida se ha reducido significativamente en comparación con el anticuerpo de control, y preferiblemente la fucosa no es detectable. La fucosa se une generalmente a las cadenas de azúcar unidas a N-glicósido que están unidas a los dos sitios de unión de la cadena de azúcar presentes en la región Fc de las dos moléculas de la cadena pesada que forman una única molécula de anticuerpo. El término "anticuerpo que tiene un contenido reducido de fucosa anclada a la región Fc" indica un anticuerpo que, en comparación con el anticuerpo ordinario como control, tiene un contenido de fucosa no mayor de 50%, preferiblemente no mayor de 25%, más preferiblemente no mayor de 10%, y particularmente preferiblemente no mayor de 0% del contenido de cadena de azúcar total del anticuerpo de control. El contenido de fucosa se puede medir utilizando el procedimiento analítico proporcionado en los ejemplos de referencia de más abajo. El método para preparar dicho anticuerpo con la fucosa agotada puede incluir el método descrito en los ejemplos de referencia de la presente invención, así como el método para producir anticuerpos con células animales carentes de fucosil transferasa (Biotechnol. Bioeng. (2004) 87(5), 614-22) y un método para preparar anticuerpos con células animales en las cuales la modificación de la cadena de azúcar ramificada compleja es modificada (Biotechnol. Bioeng. (2006) 93(5), 851-61). Además, los ejemplos adecuados de los métodos de preparación utilizando células no animales como células anfitrionas pueden incluir un método para producir anticuerpos con células vegetales (Nature Biotechnology (2006) 24, 1591-7) y con células de levadura (Nature Biotechnology (2006) 24, 210-5).

Una realización preferida de la preparación es un método para preparar un anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) que tiene una cinética en plasma modulada, que comprende (a) modificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende al menos un residuo de aminoácido que puede estar expuesto sobre la superficie del

anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glicoproteico 3), de manera que la carga del residuo o los residuos de aminoácido cambie; (b) cultivar una célula anfitriona de tal manera que el ácido nucleico modificado en la etapa (a) sea expresado; y (c) recuperar el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glicoproteico 3) del cultivo de células anfitrionas.

5 En el método, el término "modificar un ácido nucleico" hace referencia a una modificación de la secuencia de ácido nucleico para proporcionar un codón que corresponda al residuo de aminoácido que se introduce mediante la "modificación". Más específicamente, este término hace referencia a una modificación de un ácido nucleico que contiene un codón que experimentará la modificación, donde dicha modificación cambia el codón correspondiente al residuo de aminoácido pre-modificación al codón del residuo de aminoácido que es introducido mediante la modificación. Generalmente este término representa la implementación de un proceso genético o un tratamiento mutagénico con el fin de reemplazar al menos una base del ácido nucleico que comprende el codón para proporcionar un codón que codifica el residuo de aminoácido diana. Esto es, el codón que codifica el residuo de aminoácido sometido a modificación es reemplazado por un codón que codifica el residuo de aminoácido que es introducido mediante la modificación. La modificación del ácido nucleico puede ser llevada a cabo adecuadamente por los expertos en la técnica utilizando la tecnología conocida, por ejemplo, mutagénesis de sitio específico, mutagénesis por PCR, etcétera.

El ácido nucleico preparado se sitúa (inserta) generalmente en un vector adecuado o se introduce en una célula anfitriona. No existen limitaciones concretas sobre el vector siempre que tenga la capacidad de mantener establemente el ácido nucleico insertado. Por ejemplo, con referencia al uso de *E. coli* como anfitrión, se prefiere el vector pBluescript (Stratagene) como vector de clonación, aunque se pueden utilizar diferentes vectores disponibles en el mercado. Un vector de expresión es particularmente útil en aquellos casos en los que se utiliza el vector para producir el polipéptido de la presente invención. No existen limitaciones concretas sobre el vector de expresión siempre que pueda expresar el polipéptido *in vitro*, en *E. coli*, en cultivo celular, o en un organismo. Los ejemplos preferidos incluyen el vector pBEST (Promega) para a expresión *in vitro*, el vector pET (Invitrogen) para *E. coli*, el vector pME18S-FL3 (Núm. de Acceso GenBank AB009864) para el cultivo celular, y el vector pME18S vector (Mol. Cell Biol. (1988) 8, 466-472) para un organismo. El ADN de acuerdo con la presente invención se puede insertar en el vector por medio de métodos convencionales, por ejemplo, mediante reacción con ligasa utilizando sitios para la enzima de restricción (Current Protocols in Molecular Biology, editado por Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons, secciones 11.4-11.11).

No existen limitaciones concretas sobre la célula anfitriona referida más arriba, y se pueden utilizar diferentes células anfitrionas dependiendo del propósito. Los ejemplos de las células para la expresión del polipéptido incluyen células bacterianas (p. ej., *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Streptomyces*, *Bacillus subtilis*), células fúngicas (p. ej., levadura, *Aspergillus*), células de insecto (p. ej., S2 de *Drosophila*, Sf9 de *Spodoptera*), células animales (p. ej., células CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293, de melanoma de Bowes), y células vegetales. El vector puede ser introducido en la célula anfitriona mediante métodos conocidos, por ejemplo, precipitación con fosfato de calcio, poración por electropulsos (Current Protocols in Molecular Biology, editado por Ausubel et al. (1987) John Wiley & Sons, secciones 9.1-9.9), lipofección, y microinyección.

Se puede incorporar de manera adecuada al anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glicoproteico 3) una señal secretora apropiada con el fin de ocasionar la secreción del anticuerpo expresado en la célula anfitriona al lumen del retículo endoplásmico, al espacio periplásmico, o al entorno extracelular. Dicha señal puede ser adecuadamente la secuencia señal nativa característica del anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glicoproteico 3) o puede ser una secuencia señal heteróloga.

El anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glicoproteico 3) producido como se ha descrito más arriba se puede recuperar recogiendo el medio de cultivo en aquellos casos en los que el anticuerpo de la presente invención es secretado al medio de cultivo. En aquellos casos en los que el anticuerpo anti-glicoproteico 3 de la presente invención es producido en el interior de la célula, la célula se lisa primero y después se recupera el anticuerpo.

Se pueden utilizar adecuadamente métodos conocidos para purificar el anticuerpo anti-glicoproteico 3 de la invención recuperado del cultivo de células recombinantes, por ejemplo, sulfato de amonio y precipitación con etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxipatita, y cromatografía en lectina.

La presente invención también hace referencia a una composición (un fármaco) que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y el anticuerpo anti-glicoproteico 3 (por ejemplo, un anticuerpo IgG) que tiene una cinética en plasma modulada mediante el método de la invención.

La composición farmacéutica en el contexto de la presente invención hace referencia generalmente a un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o para la detección o la diagnosis de una enfermedad.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular mediante un método conocido para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la formulación por una ruta no oral en forma de un inyectable,

esto es, una suspensión o una solución aséptica con agua u otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la formulación se puede preparar combinando el anticuerpo con un portador o medio farmacológicamente aceptable, en particular con agua estéril o solución salina fisiológica, aceite vegetal, agente emulsionante, agente suspensor, tensoactivo, estabilizador, aromatizante, diluyente, portador, conservante, aglutinante, etcétera, y mezclando en el estado de dosificación unitaria requerido por la práctica farmacéutica generalmente establecida. La cantidad de ingrediente activo en las formulaciones se selecciona de tal manera que se obtenga una dosis adecuada en el intervalo indicado.

Se puede formular adecuadamente una composición estéril para inyectable de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional utilizando un portador tal como agua destilada para inyectables.

La solución acuosa para inyectables puede ser, por ejemplo, una solución isotónica que contenga solución salina fisiológica, dextrosa, y otros coadyuvantes (por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol, cloruro de sodio). También se pueden utilizar, según proceda, agentes solubilizantes adecuados (p. ej., un alcohol tal como etanol o un polialcohol tal como propilenglicol o polietilenglicol) y un tensoactivo no iónico (p. ej., Polysorbate 80™, HCO-50).

Los líquidos oleosos incluyen aceite de sésamo y aceite de soja. También se pueden utilizar adecuadamente benzoato de bencilo y/o alcohol bencilico como agentes solubilizantes. Asimismo se pueden incorporar, según proceda, un tampón (por ejemplo, solución de tampón fosfato, solución de tampón acetato de sodio), un agente analgésico (por ejemplo, hidrocloreuro de procaína), un estabilizador (por ejemplo, alcohol bencilico y fenol), y un inhibidor de la oxidación. La solución inyectable preparada como se ha descrito más arriba se carga generalmente en ampollas adecuadas.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar preferiblemente mediante administración no oral. Por ejemplo, se puede formular en forma de una composición inyectable, una composición transnasal, una composición para su administración por inhalación, o una composición transdérmica. Ésta se puede administrar adecuadamente de manera sistémica o local, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, o inyección subcutánea.

El método de administración se puede seleccionar, según proceda, dependiendo de la edad y los síntomas del paciente. La dosificación de la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el polinucleótido que codifica el anticuerpo se puede seleccionar, por ejemplo, en el intervalo de 0,0001 mg a 1000 mg por 1 kg de peso corporal por dosis unitaria. O, se puede formular o ajustar la dosificación a una dosificación de 0,001 a 100.000 mg por paciente; sin embargo, la presente invención no está limitada necesariamente a estos valores numéricos. La dosificación y el método de administración variarán dependiendo del peso corporal, la edad, y los síntomas del paciente, y los expertos en la técnica pueden seleccionar una dosificación y un método de administración apropiados basándose en la consideración de estos factores.

La presente invención también proporciona un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-glicicano 3 (por ejemplo, un anticuerpo anti-glicicano 3 humanizado) que tiene una cinética en plasma modulada. Asimismo se describe un vector que porta dicho ácido nucleico.

La presente invención también proporciona una célula anfitriona que comprende el ácido nucleico anteriormente mencionado. El tipo de célula anfitriona no está particularmente limitado, y puede ser, por ejemplo, una célula bacteriana tal como *E. coli* o cualquiera de diferentes células animales. La célula anfitriona se puede utilizar, según proceda, en un sistema de producción para la producción o expresión del anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glicicano 3) de la presente invención. De este modo, la presente invención también proporciona un sistema de producción que puede ser utilizado para producir el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glicicano 3) utilizando la célula anfitriona anteriormente mencionada. Se puede utilizar adecuadamente un sistema de producción *in vitro* o *in vivo* como sistema de producción. Las células eucarióticas y procarióticas se emplean adecuadamente como células anfitrionas utilizadas en el sistema de producción *in vitro*.

Las células eucarióticas utilizadas como célula anfitriona pueden incluir células animales, células vegetales, y células fúngicas. Las células animales pueden incluir células de tipo mamífero tales como células CHO (*J. Exp. Med.* (1995) 108, 945), COS, HEK293, 3T3, de mieloma, BHK (riñón de cría de hámster), HeLa, Vero, etcétera; células de anfibio tales como oocitos de *Xenopus laevis* (Valle et al., *Nature* (1981) 291, 338-340); y células de insectos tales como Sf9, Sf21, y Tn5. Por ejemplo, las células CHO-DG44, CHO-DX11B, COS7, las células HEK293 y las células BHK se utilizan adecuadamente para la expresión del anticuerpo anti-glicicano 3 de la presente invención. El uso de células CHO como célula anfitriona es particularmente preferida cuando se desean elevados niveles de expresión en células animales. La transfección del vector recombinante en la célula anfitriona se lleva a cabo adecuadamente utilizando la técnica del fosfato de calcio, la técnica del DEAE dextrano, las técnicas que emplean el liposoma catiónico DOTAP (Boehringer Mannheim), las técnicas de electroporación, las técnicas de lipofección, etcétera.

Con respecto a las células vegetales, se conocen *Lemna minor* y las células derivadas de *Nicotiana tabacum* como sistemas de producción de proteínas, y el anticuerpo anti-glicicano 3 de la presente invención puede ser producido mediante técnicas de cultivo de callos utilizando estas células. Con respecto a las células fúngicas, se conocen

sistemas de expresión de proteínas que utilizan células de levadura, p. ej., *Saccharomyces* (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*), y sistemas de expresión de proteínas que utilizan hongos filamentosos, p. ej., *Aspergillus* (p. ej., *Aspergillus niger*), y se pueden utilizar como células anfitrionas para producir el anticuerpo anti-glipicano 3 de la presente invención.

5 Con respecto al uso de células procarióticas, se puede utilizar adecuadamente cualquier sistema de producción que utilice células bacterianas. Se conocen los sistemas de producción que utilizan *E. coli* como se ha descrito más arriba o *B. subtilis* para las células bacterianas, y cualquiera de estas células bacterianas puede ser utilizada adecuadamente para producir el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) de la presente invención.

10 Para producir el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) utilizando una célula anfitriona de la presente invención, se cultiva la célula anfitriona transformada con el vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica el anticuerpo de la presente invención para expresar un polinucleótido que codifica el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3). Las células anfitrionas pueden ser cultivadas de acuerdo con métodos conocidos.  
15 Cuando se utiliza una célula animal como anfitrión, por ejemplo, se utiliza adecuadamente DMEM, MEM, RPMI1640, o IMDM como medio de cultivo. Se puede añadir un suero auxiliar, p. ej., FBS, suero de ternera fetal (FCS), etcétera. Las células también se pueden cultivar en un medio sin suero. Las células pueden ser cultivadas a un pH de aproximadamente 6-8, dependiendo de la célula anfitriona. El cultivo se realiza generalmente durante aproximadamente 15 a 200 horas a aproximadamente 30 - 40°C, con sustitución del medio, aireación, y agitación  
20 según proceda.

Por otra parte, los sistemas de producción basados en un animal o una planta se encuentran disponibles como sistemas *in vivo* para producir el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) de la presente invención. El polinucleótido que codifica el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) de la presente invención es introducido  
25 en un animal o planta y el anticuerpo es producido en el animal o planta y es recuperado. El término "anfitrión" según se utiliza en la presente memoria incluye tales animales y plantas.

30 Cuando se utiliza un animal como anfitrión, se encuentran disponibles sistemas de producción basados en mamíferos e insectos. Se utilizan adecuadamente cabra, cerdo, oveja, ratón, vaca, etcétera, como mamífero (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications (1993)). También se puede emplear un animal transgénico.

Por ejemplo, se puede producir un polinucleótido que codifica el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) de la presente invención en forma de un gen de fusión con un gen que codifica un polipéptido que es producido específicamente en la leche, tal como la  $\beta$ -caseína de cabra. Después se inyecta un fragmento del polinucleótido que comprende el gen de fusión en un embrión de cabra y se trasplanta a una cabra hembra. El anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) de interés se obtiene de la leche producida por la cabra transgénica nacida de la cabra que recibió el embrión o de la leche producida por el vástago de la cabra transgénica. Se pueden administrar hormonas adecuadas, según proceda, a la cabra transgénica para incrementar la cantidad de leche que contiene el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) a partir de la cabra transgénica (Ebert et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702).  
40

El gusano de seda es un ejemplo de un insecto que puede ser utilizado para producir el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) de la presente invención. Cuando se emplea el gusano de seda, se puede infectar el gusano de seda con un baculovirus que tiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo deseado (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) insertado en su genoma viral. El anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) de interés se obtiene de los fluidos corporales del gusano de seda infectado (Susumu et al., Nature (1985) 315, 592-4).  
45

La planta de tabaco es un ejemplo de una planta que se puede utilizar para producir el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) de la presente invención. Cuando se utiliza la planta de tabaco, el polinucleótido que codifica el anticuerpo (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) de interés se inserta en un vector de expresión vegetal, tal como pMON 530, y el vector recombinante resultante se transfecta en una bacteria tal como *Agrobacterium tumefaciens*. Después se utiliza esta bacteria para infectar una planta de tabaco (por ejemplo, *Nicotiana tabacum*) (Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-8), y se obtiene el anticuerpo deseado (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) a partir de las hojas de la planta de tabaco infectada. De un modo similar se puede infectar *Lemna minor* con dicha bacteria y se puede obtener el anticuerpo deseado (p. ej. un anticuerpo anti-glipicano 3) a partir de las células de *Lemna minor* infectada clonada (Cox K. M. et al., Nat. Biotechnol. (2006) 24(12), 1591-7).  
50  
55

El anticuerpo anti-glipicano 3 de la presente invención obtenido de la manera descrita más arriba se puede aislar del interior o el exterior de las células anfitrionas (p. ej., medio de cultivo o leche) y se pueden purificar para dar un anticuerpo homogéneo sustancialmente puro. Se pueden emplear adecuadamente las técnicas de separación y purificación utilizadas generalmente para la purificación de polipéptidos en la separación y purificación de anticuerpos en la presente invención, pero no están limitadas. Por ejemplo, el anticuerpo se puede separar y purificar adecuadamente mediante una selección y combinación apropiadas de cromatografía en columna, filtración, ultrafiltración, precipitación por adición sal, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, electroforesis isoelectrónica, diálisis, recristalización, etcétera.  
60  
65

Las técnicas cromatográficas incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía en fase reversa, cromatografía de adsorción, etcétera (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed. Daniel R. Marshak et al. (1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press). La cromatografía se puede llevar a cabo utilizando la cromatografía en fase líquida, por ejemplo, HPLC, FPLC, etcétera. La columna utilizada en la cromatografía de afinidad incluye, por ejemplo, una columna de proteína A o una columna de proteína G. Hyper D, POROS, y Sepharose F. F. (Pharmacia) son ejemplos de columnas basadas en proteína A.

Otra realización preferida de la presente invención es un método para preparar el anticuerpo anti-glipicano 3 con una cinética en plasma modulada de la presente invención, que comprende la etapa de cultivar una célula anfitriona de la presente invención como se ha descrito más arriba y recuperar el anticuerpo anti-glipicano 3 del cultivo celular.

La presente invención se describe específicamente a continuación, pero la presente invención no está limitada a los ejemplos proporcionados más abajo.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### (1) Construcción de genes con mutación puntual del anticuerpo H0L0 humanizado

Se construyeron varios genes con mutaciones puntuales partiendo de un gen que codificaba el anticuerpo anti-glipicano 3 que comprendía la CDR del anticuerpo GC33 humanizado descrito en el documento WO 2006/046751. Se sintetizaron oligoADN diseñados basándose en las secuencias de las cadenas efectoras y antisentido que contenían los sitios de la modificación. Se construyó una pluralidad de genes con mutaciones puntuales utilizando el Kit comercial de Mutagénesis Dirigida al Sitio QuikChange (Stratagene). La construcción de los genes con mutaciones puntuales se llevó a cabo mediante PCR en las siguientes condiciones. Después de calentar durante 30 segundos a 95°C, una mezcla de reacción de 10 ng de plásmido molde, 10 pmoles de oligo-ADN sintéticos de cadena directa y cadena inversa y 10X tampón, mezcla de dNTP, y Pfu Turbo ADN Polimerasa proporcionada con el kit se sometió a 18 ciclos de 95°C 30 seg, 55°C 1 min y 68°C 4 min. Se añadió a la mezcla de reacción DpnI proporcionado con el kit, y se llevó a cabo la digestión de restricción con la enzima de restricción durante 1 hora a 37°C. Las células DH5 $\alpha$  competentes (Toyobo) fueron transformadas con la solución de reacción resultante para obtener transformantes. La introducción de la mutación puntual fue confirmada determinando la secuencia de nucleótidos del ADN plasmídico aislado de los transformantes. Cada gen con mutación puntual fue clonado en los vectores de expresión capaces de expresar el gen del inserto en células animales. Los genes modificados se prepararon por medio de las modificaciones descritas más abajo.

La expresión transitoria del anticuerpo H0L0 humanizado y sus anticuerpos modificados con mutaciones puntuales se llevó a cabo utilizando polietilenimina (Polysciences Inc.). Las células HEK293 se separaron mediante tripsina-EDTA (Invitrogen), y se sembraron en una placa de cultivo de 10 cm<sup>2</sup> a 6 x 10<sup>6</sup> células/10 mL. Al día siguiente, se mezclaron medio de cultivo SFMII y polietilenimina con un ADN plasmídico para la expresión de la cadena pesada y un ADN plasmídico para la expresión de la cadena ligera de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y la mezcla resultante se dejó reposar durante 10 minutos a la temperatura ambiente. La mezcla completa se añadió gota a gota a la placa de cultivo que contenía las células HEK293 sembradas como se ha descrito más arriba. El sobrenadante de cultivo se recuperó después de aproximadamente 72 horas y el anticuerpo H0L0 humanizado expresado y sus anticuerpos modificados con mutaciones puntuales fueron purificados utilizando rProteinA Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### (1-1) Modificación del valor Tm del anticuerpo H0L0 humanizado

Se determinó la temperatura del punto medio de desnaturalización térmica (Tm) por la parte superior del pico de desnaturalización del termograma (Cp con respecto a T) obtenido después de calentar la solución de la muestra de ensayo a una velocidad de calentamiento programada constante. El valor Tm del anticuerpo H0L0 humanizado se midió utilizando una solución de muestra para la medición de DSC preparada como se describe a continuación. La solución de anticuerpo (correspondiente a 50 - 100  $\mu$ g) cargada en una membrana de diálisis se sometió a diálisis primero durante 24 horas frente a una solución externa de diálisis de 20 moles/L de solución tampón de acetato de sodio (pH 6,0) que contenía 150 mmoles/L de cloruro de sodio. Con posterioridad, se ajustó la solución de muestra a su concentración de anticuerpo de 50 a 100  $\mu$ g/mL con solución externa de diálisis y se utilizó como solución molde para la medición de DSC.

Se utiliza un aparato para DSC adecuado, por ejemplo, DSC-II (Calorimetry Sciences Corporation), para este experimento. La solución de muestra preparada como se ha descrito anteriormente y la solución de referencia (solución externa de diálisis) se desgasificaron cuidadosamente, y cada uno de estos especímenes de ensayo se colocó en una celda del calorímetro y se equilibró térmicamente a 40°C. Después se realizó un barrido DSC de 40°C a 100°C a una velocidad de barrido de aproximadamente 1 K/minuto. Los resultados de esta medición se dan como la parte superior del pico de desnaturalización como una función de la temperatura. La temperatura del punto medio

de desnaturalización térmica del anticuerpo H0L0 humanizado se calculó mediante asignación al pico del dominio Fab de acuerdo con Rodolfo et al., Immunology Letters (1999), 47-52. Como ejemplo específico, el diagrama obtenido a partir de la calorimetría de barrido diferencial (DSC) en el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) se muestra en la Figura 1.

El anticuerpo H0L0 humanizado, que comprende la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 1 y la cadena ligera mostrada en el SEQ ID NO: 7, tiene un valor T<sub>m</sub> de 76,6°C calculado mediante el método descrito más arriba. Los valores de T<sub>m</sub> de Synagis y Herceptin, proporcionados como ejemplos de anticuerpos existentes, se miden a 85,4°C y 81,8°C, respectivamente. De este modo se demostró que el valor de T<sub>m</sub> del anticuerpo H0L0 humanizado es inferior al de los anticuerpos existentes.

Por lo tanto los anticuerpos modificados se prepararon a partir del anticuerpo H0L0 humanizado con el propósito de elevar el valor de T<sub>m</sub>. Se introdujeron las modificaciones V37I, A40P, M48I, y L51I en la FR2 de la cadena pesada del anticuerpo H0L0 mostrada en el SEQ ID NO: 1 para preparar el anticuerpo H15 (SEQ ID NO: 2), donde su subclase cambió de VH1b a VH4. El valor de T<sub>m</sub> se mejoró hasta 79,1°C. Asimismo se modificó la cadena ligera del anticuerpo H0L0 mostrada en el SEQ ID NO: 7 introduciendo las modificaciones L42Q, S48A, y Q50R en la FR2 que cambió de la subclase VK2 a VK3, e introduciendo la modificación V2I para reemplazar V2 de FR1 por I (secuencia de la línea germinal), de ese modo se preparó L4 (SEQ ID NO: 8). Se midió el valor de T<sub>m</sub> de cada anticuerpo como se ha descrito más arriba. El valor de T<sub>m</sub> de H15L0 y H0L4 fue de 79,2°C y 77,2°C, respectivamente, lo que demuestra la mejora desde el valor de T<sub>m</sub> 76,6°C de H0L0. El valor de T<sub>m</sub> del anticuerpo H15L4 que comprende la combinación de estas dos modificaciones se mejoró hasta 8,5°C.

### **(1-2) Modificación del valor de pI del anticuerpo H0L0 humanizado**

La vida media en plasma de un anticuerpo se prolonga disminuyendo el valor de pI mostrado por el anticuerpo. En contraste, las características de translocación tisular de un anticuerpo mejoran incrementado el pI del anticuerpo. Se desconoce si el incremento o la disminución del valor de pI de un anticuerpo eficaz en el tratamiento del cáncer aumentaría el efecto supresor de tumores. Por lo tanto, se prepararon un anticuerpo H0L0 humanizado modificado con un pI disminuido y un anticuerpo H0L0 humanizado modificado con un pI incrementado y se comparó la actividad anti-tumoral de los mismos para investigar si cualquier modificación tenía una actividad supresora de tumores superior.

Se calculó el valor de pI de cada anticuerpo basándose en el análisis mediante electroforesis isoelectrica. La electroforesis se llevó a cabo como se describe a continuación. Utilizando PhastSystem Cassette (Amersham Bioscience), Phast-Gel Dry IEF (Amersham Bioscience) se embebió el gel durante aproximadamente 60 minutos con una solución de imbibición con la composición dada más abajo.

1. (a) Composición de la solución de imbibición para pI elevado:
  - 1,5 mL glicerol al 10%
  - 100 µL Pharmalyte 8-10,5 para IEF (Amersham Bioscience)
2. (b) Composición de la solución de imbibición para pI bajo:
  - 1,5 mL agua purificada
  - 20 µL Pharmalyte 8-10,5 para IEF (Amersham Bioscience)
  - 80 µL Pharmalyte 5-8 para IEF (Amersham Bioscience)

Se cargaron aproximadamente 0,5 µg de anticuerpo sobre el gel embebido y se llevó a cabo la electroforesis isoelectrica utilizando PhastSystem (Amersham Bioscience) controlado por el programa descrito más abajo. La muestra se añadió al gel en la Etapa 2 de este programa. Se utilizó un Kit de Calibrado para el pI (Amersham Bioscience) para los marcadores de pI.

Etapa 1: 2000 V, 2,5 mA, 3,5 W, 15°C, 75 Vh  
 Etapa 2: 200 V, 2,5 mA, 3,5 W, 15°C, 15 Vh  
 Etapa 3: 2000 V, 2,5 mA, 3,5 W, 15°C 410 Vh

Después de la electroforesis, el gel se fijó con TCA al 20% y después se llevó a cabo la tinción con plata utilizando Silver Staining Kit, Protein (Amersham Bioscience) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas con el kit. Después de la tinción, se calculó el punto isoelectrico de cada anticuerpo (muestra de ensayo) basándose en los puntos isoelectricos ya conocidos de los marcadores de pI. El electroforetograma de la electroforesis isoelectrica de pI elevado se muestra en la Figura 2 y el electroforetograma de la electroforesis isoelectrica de bajo pI se muestra en la Figura 3.

### **(a) Modificaciones que elevan el pI**

Se preparó Hspu2.2 (Hu2.2) (SEQ ID NO: 6), en el que las modificaciones Q43K, D52N, y Q107R se implementaron adicionalmente en H15. También se preparó Lspu2.2 (Lu2.2) (SEQ ID NO: 12), en el que las modificaciones E17Q, Q27R, Q105R y S25A se implementaron en L4, donde la modificación S25A reemplaza la S25 de CDR2 por A (abundante en una línea germinal). El valor de T<sub>m</sub> del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) compuesto por Hspu2.2 (Hu2.2) y Lspu2.2 (Lu2.2) se midió a 76,8°C y se midió su valor de pI a 9,6. Puesto que el pI del anticuerpo

H0L0 es 8,9, el pl del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) se había incrementado en 0,7.

**(b) Modificaciones que disminuyen el pl**

- 5 Se preparó Hspd1.8 (Hd1.8) (SEQ ID NO: 5), en el que las modificaciones K19T, Q43E, K63S, K65Q, y G66D se implementaron adicionalmente en H15. Se preparó Lspd1.6 (Ld1.6) (SEQ ID NO: 11) realizando las siguientes modificaciones: la modificación Q27E en L4; la modificación de KISRVE en 79-84 de la FR3 en L4 a TISSLQ; y la modificación S25A para lograr la misma modificación que para Lspu2.2 (Lu2.2). El valor de pl del anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) compuesto por Hspd1.8 (Hd1.8) y Lspd1.6 (Ld1.6), se midió a 7,4. Puesto que el pl del anticuerpo H0L0 es 8,9, el pl del anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) se había reducido en 1,5.

**(2) Evaluación mediante ELISA competitivo de la actividad de unión de los anticuerpos modificados con mutaciones puntuales a partir del anticuerpo H0L0**

- 15 Se evaluaron el anticuerpo H0L0 y sus anticuerpos con mutaciones puntuales purificados en el apartado (1) mediante ELISA competitivo. Se añadieron 100 µL del polipéptido núcleo GPC3 soluble (SEQ ID NO: 13) a 1 µg/mL a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. El polipéptido núcleo GPC3 soluble se inmovilizó sobre la placa permitiendo que la placa reposara durante la noche a 4°C. El polipéptido GPC3 núcleo soluble inmovilizado sobre la placa se lavó 3 veces con un tampón de lavado utilizando Skan WASHER400 (Molecular Devices); y se bloqueo con 200 µL de tampón de bloqueo a 4°C durante al menos 30 min. La placa bloqueada sobre la cual se había inmovilizado el polipéptido GPC3 núcleo soluble se lavó después 3 veces con tampón de lavado utilizando Skan WASHER400. Con posterioridad, cada pocillo de la placa recibió 200 µL de una mezcla que contenía 100 µL de anticuerpo H0L0 biotinilado (concentración final = 0,3 µg/mL) y 100 µL del anticuerpo H0L0 o su anticuerpo modificado con una mutación puntual (a diferentes concentraciones). El anticuerpo H0L0 se biotiniló utilizando Biotin Labeling Kit (Roche) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas con el kit. La placa se dejó estar durante 1 hora a la temperatura ambiente, después se lavó 5 veces con tampón de lavado utilizando Skan WASHER400 (Molecular Devices). Se añadieron a cada pocillo 100 µL de anti-fosfatasa alcalina-estreptavidina de cabra (ZYMED), diluida 20.000X con tampón sustrato, y la placa resultante se dejó reposar durante 1 hora a la temperatura ambiente, y después se lavó 5 veces con tampón de lavado utilizando Skan WASHER400. Se preparó Sustrato de Fosfatasa (Sigma) a 1 mg/mL en el tampón sustrato, se añadió a 100 µL por pocillo durante 1 hora. Se midió la absorbancia a 405 nm de la solución de reacción en cada pocillo utilizando Benchmark Plus (BIO-RAD), con la absorbancia de control a 655 nm.

- 35 Como se muestra en la Figura 4, se demostró que la actividad de unión al antígeno del anticuerpo H15L4 era casi la misma que la del anticuerpo H0L0 que había sido sometido a la modificación. Además, como se muestra en la Figura 5, se demostró que la actividad de unión al antígeno del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) era aproximadamente la misma que la del anticuerpo H0L0 sometido a la modificación. Por otra parte, como se muestra en la Figura 6, se demostró que la actividad de unión al antígeno del anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) era aproximadamente la misma que la del anticuerpo H0L0 sometido a la modificación.

40 **Ejemplo de Referencia 2**

**Desorganización del gen transportador de fucosa en células CHO**

45 **(1) Construcción del vector de redireccionamiento**

**(1-1) Construcción del vector KO1 vector**

- 50 Se añadieron el sitio BamHI y la secuencia TGCGC al lado 3' del codón de iniciación del gen de resistencia a higromicina (Hygr) mediante PCR utilizando pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen) con los cebadores Hyg5-BH y Hyg3-NT para obtener la misma secuencia que en el lado 5' del codón de iniciación del gen transportador de fucosa. También se añadió el sitio NotI en el lado 3' incluyendo la región hasta la señal de adición de poliA de SV40. Después se escindió el gen Hygr.

- 55           cebador directo  
Hyg5-BH 5'-GGATCCTGCGCATGAAAAAGCCTGAACTCACC-3' (SEQ ID NO: 14)  
          cebador inverso  
Hyg3-NT 5'-GCGGCCGCTATTCTTTGCCCTCGGACG-3' (SEQ ID NO: 15)

- 60 Se construyó el vector de redireccionamiento del transportador de fucosa ver. 1 (referido como vector KO1) insertando el lado 5' del transportador de fucosa (desde SmaI en el No. 2.780 del SEQ ID NO: 16 hasta BamHI en el No. 4.232), el lado 3' (desde el No. 4.284 hasta SacI en el No. 10.934), y el fragmento Hygr en el vector pMC1DT-A (Yagi T., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87, 9918-22). Un rasgo característico de este vector es que, cuando se ha producido la recombinación homóloga, Hygr es expresado bajo el promotor del transportador de fucosa, puesto que un promotor no está anclado al gen Hygr. Sin embargo, cuando se introduce solamente una copia del vector en la célula mediante recombinación homóloga, Hygr no siempre es expresado en un grado suficiente para mostrar

resistencia a la higromicina B. El vector KO1 fue escindido en el sitio NotI y transfectado en la célula. Se piensa que 41 pares de bases en el exón 1, incluyendo el codón de inicio, serán suprimidas del transportador de fucosa por la introducción del vector KO1, dando como resultado una pérdida de función.

#### 5 (1-2) Construcción de pBSK-pgk-1-Hygr

Se construyó pBSK-pgk-1 escindiendo el promotor del gen pgk-1 de ratón del vector pKJ2 vector (Popo H., Biochemical Genetics (1990) 28, 299-308) con EcoRI-PstI y clonándolo en los sitios EcoRI-PstI de pBluescript (Stratagene). Con respecto a Hygr, se añadieron un sitio EcoT22I y una secuencia Kozak en el lado 5' de Hygr y se añadió un sitio BamHI en el lado 3' incluyendo la región hasta la señal de adición de poliA de SV40 mediante PCR utilizando pcDNA3.1/Hygro con los cebadores Hyg5-AV y Hyg3-BH. Después se escindió el gen Hygr.

cebador directo

Hyg5-AV 5'-ATGCATGCCACCATGAAAAAGCCTGAACTCACC-3' (SEQ ID NO: 17)

cebador inverso

Hyg3-BH 5'-GGATCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTC-3' (SEQ ID NO: 18)

Se construyó pBSK-pgk-1-Hygr insertando el fragmento Hygr (EcoT22I-BamHI) en los sitios PstI-BamHI de pBSK-pgk-1.

#### 20 (1-3) Construcción del vector K02

El vector de redireccionamiento del transportador de fucosa ver. 2 (referido en adelante como vector KO2) se construyó insertando el lado 5' del transportador de fucosa (desde el sitio SmaI en el No. 2.780 del SEQ ID NO: 16 al BamHI en el No. 4.232), el lado 3' (desde el No. 4.284 al sitio SacI en el No. 10.934), y el fragmento pgk-1-Hygr en el vector pMC1DT-A vector. A diferencia del caso para el vector KO1, el vector KO2 tiene el promotor del gen pgk-1 anclado a Hygr, por lo tanto adquirirá resistencia a la higromicina B incluso cuando solamente se introduce una copia del vector en la célula mediante recombinación homóloga. El vector KO2 fue escindido en NotI y fue transfectado en la célula. Introduciendo el vector KO2, se suprimirán 46 pares de bases en el exón 1 del transportador de fucosa incluyendo el codón de inicio, dando como resultado una pérdida de función.

#### (1-4) Construcción de pBSK-pgk-1-Puror

Se escindió el vector pPUR (BD Biosciences) por medio de PstI y BamHI y el fragmento escindido (Puror) se insertó en los sitios PstI-BamHI de pBSK-pgk-1 para construir pBSK-pgk-1-Puror.

#### (1-5) Construcción del vector KO3

Se construyó el vector de redireccionamiento del transportador de fucosa ver. 3 (referido en adelante como vector KO3) insertando el lado 5' del transportador de fucosa (desde el sitio SmaI en el No. 2.780 del SEQ ID NO: 16 al BamHI en el No. 4.232), el lado 3' (desde el No. 4.284 al sitio SacI en el No. 10.934), y el fragmento pgk-1-Puror en el vector pMC1DT-A. Se ancló de manera preliminar una secuencia para la unión al cebador de escrutinio mostrado más abajo al extremo 3' de pgk-1-Puror. Se escindió el vector KO3 mediante NotI y se transfectó en la célula. Introduciendo el vector KO3, se suprimirán 46 pares de bases en el exón 1 del transportador de fucosa incluyendo el codón de inicio, dando como resultado la pérdida de función.

cebador inverso

RSGR-A 5'-GCTGTCTGGAGTACTGTGCATCTGC-3' (SEQ ID NO: 19)

50 El gen transportador de fucosa se desactivó utilizando los tres vectores de redireccionamiento descritos más arriba.

#### (2) Introducción del vector en células CHO

Se añadieron Suplemento HT (100x) (Invitrogen) y penicilina-estreptomina (Invitrogen) a CHO-S-SFMII HT- (Invitrogen), cada uno a 1/100ª del volumen de CHO-S-SFMII HT- para preparar un medio de cultivo (referido en adelante como SFMII(+)). Las células CHO DXB11 se subcultivaron en SFMII(+). Se suspendieron  $8 \times 10^6$  células CHO en 0,8 mL de tampón fosfato de Dulbecco (Invitrogen) (referido en adelante como PBS). Se añadieron 30 µg de vector de redireccionamiento a la suspensión celular, y se transfirieron a una cubeta Gene Pulser (4 mm) (BioRad). Después de mantener durante 10 minutos sobre hielo, el vector se transfectó en las células mediante electroporación con GENE PULSER II (BioRad) a 1,5 kV y 25 µFD. Después de la transfección del vector, las células se suspendieron en 200 mL de medio SFMII(+) y se sembraron en veinte placas de fondo plano de 96 pocillos (Iwaki) a 100 µl/pocillo. Las placas se cultivaron durante 24 horas a 37°C en una incubadora con CO<sub>2</sub>, después se añadió el reactivo.

65

**(3) Inactivación génica: etapa 1**

Se transfectó el vector KO1 o el vector KO2 en las células CHO, y se seleccionaron con higromicina B (Invitrogen) 24 horas después de la transfección del vector. La higromicina B se disolvió en SFMII(+) a 0,3 mg/mL, y se añadieron 100 µL por pocillo.

**(4) Escrutinio para determinar recombinantes homólogos mediante PCR****(4-1) Preparación de la muestra para PCR**

Se escrutaron los recombinantes homólogos mediante PCR. Las células CHO se cultivaron sobre placas de fondo plano de 96 pocillos, se separó el sobrenadante de cultivo y se añadió un tampón de lisis celular a 50 µL/pocillo, y se incubaron a 55°C durante 2 horas. Después se desactivó la proteinasa K calentando a 95°C durante 15 minutos para preparar un molde para PCR. El tampón de lisis celular estaba compuesto por lo siguiente por pocillo: 5 µL 10x de LA Buffer II (suministrado con Takara LA Taq), 2,5 µL de NP-40 al 10% (Roche), 4 µL de proteinasa K (20 mg/mL, Takara), y 38,5 µL de agua destilada (Nacalai Tesque).

**(4-2) Condiciones de PCR**

La mezcla de reacción de PCR estaba compuesta de 1 µL de la muestra de PCR descrita más arriba, 5 µL 10x LA Buffer II, 5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 5 µL de dNTP (2,5 mM), 2 µL de cebador (10 µM cada uno), 0,5 µL LA Taq (5 IU/µL), y 29,5 µL de agua destilada (total de 50 µL). Se utilizaron los cebadores TP-F4 y THygro-R1 como cebadores para la PCR para escrutar las células transfectadas con el vector KO1, y se utilizaron los cebadores TP-F4 y THygro-F1 como cebadores para la PCR para escrutar las células transfectadas con el vector KO2.

El escrutinio mediante PCR para determinar las células transfectadas con el vector KO1 se llevó a cabo precalentando durante 1 minuto a 95°C; 40 ciclos de 95°C/30 segundos, 60°C/30 segundos, y 60°C/2 minutos; y volviendo a calentar a 72°C durante 7 minutos. El escrutinio mediante PCR para determinar las células transfectadas con el vector KO2 se llevó a cabo precalentando durante 1 minuto a 95°C; 40 ciclos de 95°C/30 segundos y 70°C/3 minutos; y volviendo a calentar a 70°C durante 7 minutos.

Los cebadores se proporcionan más abajo. En las muestras de células, en las que se había producido recombinación homóloga, se amplifica ADN de aproximadamente 1,6 kb para el vector KO1 y se amplifica ADN de aproximadamente 2,0 kb para el vector KO2. El cebador TP-F4 fue diseñado en la región genómica del transportador de fucosa en el lado 5' fuera del vector, y los cebadores THygro-FI y THygro-R1 fueron diseñados en Hygr dentro del vector.

cebador directo (KO1, KO2)

TP-F4 5'-GGAATGCAGCTTCTCAAGGGACTCGC-3' (SEQ ID NO: 20)

cebador inverso (KO1)

THygro-R1 5'-TGCATCAGGTCGGAGACGCTGTGCGAAC-3' (SEQ ID NO: 21)

cebador inverso (KO2)

THygro-F1 5'-GCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGC-3' (SEQ ID NO: 22)

**(5) Resultados del escrutinio mediante PCR**

Se analizaron 918 células transfectadas con el vector KO1, y se pensó que 1 célula era un recombinante homólogo (eficacia de recombinación homóloga = aproximadamente 0,1%). Se analizaron 537 células transfectadas con el vector KO2, y se pensó que 17 células eran recombinantes homólogos (eficacia de recombinación homóloga = aproximadamente 3,2%).

**(6) Análisis de transferencia Southern**

Se llevó a cabo una confirmación adicional mediante transferencia Southern. Se prepararon 10 µg de ADN genómico a partir de las células cultivadas mediante un método convencional y se sometieron a transferencia Southern. Utilizando los dos cebadores proporcionados más abajo, se preparó una sonda de 387 pb mediante inmunopurificación por PCR de la región desde el No. 2.113 al No. 2.500 de la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEQ ID NO: 16, y se utilizó para la transferencia Southern. El ADN genómico se escindió con BgIII.

cebador directo

Bgl-F 5'-TGTGCTGGGAATTGAACCCAGGAC-3' (SEQ ID NO: 23)

cebador inverso

Bgl-R 5'-CTACTTGTCTGTGCTTTCTTCC-3' (SEQ ID NO: 24)

La escisión por BgIII proporciona una banda de aproximadamente 3,0 kb del cromosoma del transportador de fucosa, una banda de aproximadamente 4,6 kb del cromosoma en el que se había producido la recombinación homóloga con el vector KO1, y una banda de aproximadamente 5,0 kb del cromosoma en el cual se había producido

la recombinación homóloga con el vector KO2. Se utilizaron una célula obtenida mediante recombinación homóloga con el vector KO1 y 7 células obtenidas mediante recombinación homóloga con el vector KO2 en los experimentos. La única célula obtenida con el vector KO1 se denominó 5C1; sin embargo, se demostró por medio de un análisis subsiguiente que comprendía múltiples poblaciones celulares. De este modo la clonación mediante dilución limitante se llevó a cabo antes de utilizarla en los siguientes experimentos. Una de las células obtenidas con el vector KO2 se denominó 6E2.

#### (7) Inactivación Génica: etapa 2

Para establecer líneas celulares que tengan un gen de transportador de fucosa completamente defectuoso, se introdujo uno de los tres vectores en las células en las cuales se había logrado la recombinación homóloga por medio del vector KO1 o el vector KO2. Las combinaciones de vector/célula fueron las siguientes: método 1: vector KO2 y células 5C1 (KO1); método 2: vector KO2 y células 6E2 (KO2); método 3: vector KO3 y células 6E2 (KO2). El vector se transfirió en la célula respectiva, y se inició la selección con higromicina B y puromicina (Nacalai Tesque) 24 horas después de la transfección con el vector. La concentración final de higromicina B fue de 1 mg/mL en el método 1 y de 7 mg/mL en el método 2. En el método 3, se añadió la higromicina B a una concentración final de 0,15 mg/mL y se añadió la puromicina a una concentración final de 8 µg/mL.

#### (8) Escrutinio mediante PCR de los recombinantes homólogos

Las muestras se prepararon como se describe más arriba. En el escrutinio para el método 1, se realizaron senadas PCR por medio de las cuales se detectaron las células en las que se había producido recombinación homóloga con el vector KO1 y el vector KO2. Los cebadores de la PCR mostrados más abajo se diseñaron para el método 2. TPS-F1 corresponde a la región desde el No. 3.924 al No. 3.950 en la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEQ ID NO: 16, mientras SHygro-R1 corresponde a la región desde el No. 4.248 al 4.274. Estos cebadores de la PCR amplificarán 350 pb de la región del gen del transportador de fucosa que es suprimida por otra parte por el vector KO2. Por lo tanto, en el método de escrutinio de la PCR en el método 2, se consideró que las células que no producían producto de amplificación de 350 eran las células que carecían completamente del gen del transportador de fucosa. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: precalentamiento durante 1 minuto a 95°C; 35 ciclos de amplificación de 95°C/30 segundos y 70°C/1 minuto; y recalentamiento a 70°C durante 7 minutos.

cebador directo

TPS-F1 5'-CTCGACTCGTCCCTATTAGGCAACAGC-3' (SEQ ID NO: 25)

cebador inverso

SHygro-R1 5'-TCAGAGGCAGTGGAGCCTCCAGTCAGC-3' (SEQ ID NO: 26)

En el caso del método 3, se utilizó TP-F4 como cebador directo y se utilizó RSGR-A como cebador inverso. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: precalentamiento durante 1 minuto a 95°C; 35 ciclos de amplificación de 95°C/30 segundos, 60°C/30 segundos, y 72°C/2 minutos; recalentamiento a 72°C durante 7 minutos. Se amplificará un ADN de aproximadamente 1,6 kb a partir de las muestras de células en las cuales se ha producido recombinación homóloga por el vector KO3. Por medio de esta PCR, se detectaron las células en las cuales se había producido recombinación homóloga por el vector KO3, y también se confirmó que las células conservaban la recombinación homóloga por el vector KO2 mientras se estaban detectando.

#### (9) Resultados del escrutinio por PCR

Se consideró que 18 células de las 616 células analizadas mediante el método 1 eran recombinantes homólogos (eficacia de recombinación homóloga = 2,9%). Se consideró que 2 células de las 524 células analizadas mediante el método 2 eran recombinantes homólogos (eficacia de recombinación homóloga = aproximadamente 0,4%). Se consideró que 7 células de las 382 células analizadas mediante el método 3 eran recombinantes homólogos (eficacia de recombinación homóloga = aproximadamente 1,8%).

#### (10) Análisis mediante transferencia Southern

Se llevó a cabo el análisis mediante transferencia Southern mediante el método descrito anteriormente, y se identificó una célula que había perdido casi completamente el gen del transportador de fucosa. Los resultados analíticos de la PCR y la transferencia Southern fueron coincidentes en la etapa 1 de la inactivación génica, pero no en la etapa 2 de la inactivación génica.

#### (11) Análisis de expresión de fucosa

Se analizaron 26 células que se había encontrado que eran homólogos recombinantes para determinar la expresión de fucosa mediante PCR. Se tiñeron  $1 \times 10^6$  células en 100 µL de PBS que contenía 5 µg/mL de aglutinina de *Lens culinaris*, producto conjugado con FITC (Vector Laboratory), FBS al 2,5%, y azida de sodio al 0,02% (referida en adelante como solución FACS) durante 1 hora enfriando con hielo. Después se lavaron las células 3 veces con solución FACS y se analizaron mediante FACSCalibur (Becton Dickinson). Los resultados demostraron que la

expresión de fucosa era reducida solamente en las células FTP-KO, que se había encontrado que mostraban una pérdida completa del gen de transportador de fucosa en el análisis de transferencia Southern.

### Ejemplo de Referencia 3

#### Establecimiento de células productoras de anticuerpo derivadas de la línea FTP-KO y purificación del anticuerpo producido por estas células

La línea carente de transportador de fucosa obtenida en el Ejemplo 1 (células FTP-KO, nombre del clon: 3F2) fue subcultivada en SFMII(+) que contenía higromicina B a una concentración final de 1 mg/mL. Se suspendieron  $8 \times 10^6$  células 3F2 en 0,8 mL de tampón fosfato de Dulbecco. Se añadieron 25  $\mu$ g de un vector de expresión del anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado a la suspensión celular y se transfirieron a una cubeta Gene Pulser. Después de mantener durante 10 minutos sobre hielo, el vector se transfectó en las células mediante electroporación con GENE PULSER II a 1,5 kV y 25  $\mu$ FD. Después de la transfección del vector, las células se suspendieron en 40 mL de medio SFMII(+) y se escrutaron sobre una placa de fondo plano de 96 pocillos (Iwaki) a 100  $\mu$ L/pocillo. Después de que la placa fuera incubada durante 24 horas a 37°C en una incubadora con CO<sub>2</sub>, se añadió geneticina (Invitrogen) a una concentración final de 0,5 mg/mL. Se midió la producción de anticuerpo de las células resistentes al fármaco para obtener líneas celulares productoras de anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado.

El sobrenadante de cultivo de las líneas que expresaban el anticuerpo se recogió y se aplicó a una columna Hitrap rProtein A (Pharmacia) utilizando una bomba P-1 (Pharmacia). La columna se lavó con un tampón de unión (fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0)), y el anticuerpo unido se hizo eluir con posterioridad con tampón de elución (glicina-HCl 0,1 M (pH 2,7)). El producto eluido se neutralizó inmediatamente con tampón de neutralización (Tris-HCl 1 M (pH 9,0)). Las fracciones de anticuerpo eluidas se seleccionaron utilizando el análisis de proteínas DC (BioRad) y se reunieron, y se concentraron a aproximadamente 2 mL con Centriprep-YM10 (Millipore). La solución concentrada se sometió después a filtración en gel sobre Superdex200 26/60 (Pharmacia) equilibrado con tampón de ácido acético 20 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 150 mM. El pico de la fracción monomérica del producto eluido se recogió y se concentró con Centriprep-YM10. La solución concentrada se filtró utilizando una unidad de filtro MILLEX-GW de 0,22  $\mu$ m (Millipore) y se almacenó a 4°C. La concentración de anticuerpo purificado se determinó calculando a partir del coeficiente de absorción molar basándose en la absorbancia a 280 nm.

### Ejemplo de Referencia 4

#### Análisis de las cadenas de azúcar ancladas al anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado producido por las células FTP-KO

##### (1) Preparación de cadenas de azúcar marcadas con 2-aminobenzamida (cadenas de azúcar marcadas con 2-AB)

El anticuerpo de la presente invención producido por las células FTP-KO y el anticuerpo producido por las células CHO (control) se trataron con N-glicosidasa F (Roche Diagnostics) para liberar las cadenas de azúcar unidas al anticuerpo (Weitzhandler M. et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences* (1994) 83(12), 1670-5). Después de la desproteínación con etanol (Schenk B. et al., *The Journal of Clinical Investigation* (2001), 108(11), 1687-95), las cadenas de azúcar liberadas se concentraron hasta sequedad y se marcaron fluorescentemente con 2-aminopiridina (Bigge J. C. et al., *Analytical Biochemistry* (1995) 230(2), 229-238). Las cadenas de azúcar marcadas con 2-AB resultantes se separaron del reactivo mediante extracción en fase sólida utilizando un cartucho de celulosa, se concentraron mediante centrifugación para obtener cadenas de azúcar marcadas con 2-AB purificadas. Las cadenas de azúcar marcadas con 2-AB purificadas se trataron con  $\beta$ -galactosidasa (Seikagaku Kogyo Co., Ltd.) para preparar cadenas de azúcar marcadas con 2-AB agalactosiladas que se analizaron como se describe más abajo.

##### (2) Análisis de las cadenas de azúcar marcadas con 2-AB agalactosiladas mediante HPLC en fase normal

Las cadenas de azúcar marcadas con 2-AB agalactosiladas preparadas mediante el método descrito más arriba, las cadenas liberadas del anticuerpo de la presente invención producido por las células FTP-KO y el anticuerpo producido por las células CHO (control), se analizaron mediante HPLC en fase normal con una columna con amida TSKgel Amide-80 (TOSOH Corp.) y se compararon los cromatogramas. Se realizó la siguiente evaluación con respecto al anticuerpo producido por las células CHO: G(0) estuvo presente como componente principal de las cadenas de azúcar, mientras G(0)-Fuc carente de fucosa representaba aproximadamente un 4% de las cadenas de azúcar totales, evaluado mediante el cálculo a partir de la proporción del área del pico. En el caso del anticuerpo producido por las células FTP-KO, G(0)-Fuc fue el componente principal. Para todas las líneas celulares productoras de anticuerpo, al menos 90% de las cadenas de azúcar totales en el anticuerpo producido fueron cadenas de azúcar libres de fucosa, evaluado calculando a partir de la proporción del área del pico.

Tabla 1.

Proporciones relativas de cada cadena de azúcar estimadas a partir del análisis mediante HPLC en fase normal para cadenas de azúcar marcadas con 2-AB agalactosiladas				
cadena de azúcar	CHO	FTP-KO-a	FTP-KO-b	FTP-KO-c
G(0)-Fuc	4,0%	92,4%	92,5%	93,2%
G(0)	96,0%	7,6%	7,5%	6,8%

**Ejemplo 5****Establecimiento de líneas celulares que expresan establemente el anticuerpo H0L0 humanizado y anticuerpos modificados con mutaciones puntuales**

Se clonaron los genes que codifican el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) (anticuerpos modificados procedentes del anticuerpo H0L0 producidos mediante el método descrito en el Ejemplo 1) o el anticuerpo H0L0 sometido a modificaciones en un vector de expresión. En la clonación, los genes que codificaban la cadena pesada y la cadena ligera se insertaron en diferentes vectores de expresión con el fin de expresar cada gen que codificaba la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo. Se seleccionaron dos vectores de expresión para proporcionar una combinación deseada de los genes que codificaban la cadena pesada y la cadena ligera como se ha descrito anteriormente, se digirieron con PvuI y se transfectaron mediante electroporación en la línea celular FTP-KO producida en el Ejemplo de Referencia 2.

Los transformantes que producen establemente el anticuerpo H0L0 o un anticuerpo modificado se prepararon mediante electroporación utilizando Gene Pulser II (BioRad). Se mezclaron 0,75 mL de células CHO ( $1 \times 10^7$  células/mL) suspendidas en PBS con 10  $\mu$ g de cada uno de los ADN de los plásmido de expresión que proporcionaban la combinación deseada de cadena pesada y cadena ligera, y la mezcla se dejó reposar sobre hielo durante 10 minutos. La mezcla se transfirió a una cubeta Gene Pulser II y se aplicó un pulso eléctrico de 1,5 kV a una capacitancia de 25  $\mu$ FD. La mezcla pulsada se incubó durante 10 minutos a la temperatura ambiente y se suspendió en medio CHO-S-SFMII/HT al 1%/PS al 1%. Se añadieron 100  $\mu$ L de la suspensión diluida (5 veces, 10 veces, y 50 veces, elaborada en el mismo medio) a cada pocillo de las placas de cultivo de 96 pocillos. Las placas se incubaron durante 24 horas en una incubadora con CO<sub>2</sub> mantenida a CO<sub>2</sub> al 5%. Después, se añadió geneticina (Gibco) a cada pocillo a una concentración final de 500  $\mu$ g/mL y se añadió zeocina (Invitrogen) a cada pocillo a una concentración final de 600  $\mu$ g/mL. Las placas se incubaron durante 2 semanas. Las colonias de células transformadas que mostraban resistencia a geneticina y zeocina se seleccionaron adicionalmente por medio de subcultivo en el mismo medio que contenía 500  $\mu$ g/mL de geneticina (Gibco) y 600  $\mu$ g/mL de zeocina (Invitrogen). El sobrenadante del cultivo de las células transformadas seleccionadas de esta manera se evaluó para determinar la concentración de anticuerpo utilizando BiacoreQ (BIACORE) para establecer las líneas celulares transformantes que expresaban el anticuerpo deseado a un nivel elevado. Se midió la concentración de anticuerpo en el sobrenadante de cultivo de acuerdo con las instrucciones proporcionadas con BiacoreQ (BIACORE). La línea celular establecida de este modo se cultivó en medio CHO-S-SFMII (Invitrogen) que contenía 500  $\mu$ g/ml de Geneticina (Invitrogen) y 600  $\mu$ g/ml de Zeocina (Invitrogen). Después de cultivar durante un periodo de tiempo apropiado, se recogió el sobrenadante de cultivo, y se purificó utilizando una columna de rProteinA-Sepharose (GE Healthcare). El anticuerpo purificado se concentró con Amicon Ultra-4 (MILLIPORE) y se sometió a intercambio de tampón sobre una columna PD-10 Desalting (Amersham Biosciences) con tampón de ácido acético 20 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 200 mM. El anticuerpo purificado se cuantificó mediante absorción a 280 nm en ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop) o DU-600 Spectrophotometer (BECKMAN). La concentración de anticuerpo se calculó con el método RACE.

**Ejemplo 6****Eficacia terapéutica en un modelo in vivo del anticuerpo H0L0 humanizado y los anticuerpos modificados mediante mutaciones puntuales****(1) Mantenimiento de la línea celular utilizada para el trasplante en el modelo in vivo**

Se utilizaron células HepG2 (ATCC). Las células HepG2 se mantuvieron mediante subcultivo en medio esencial mínimo de Eagle (Sigma) que contenía piruvato de sodio (Invitrogen) a 1 mmol/L de MEM y aminoácidos no esenciales (Invitrogen) a 1 mmol/L de MEM (este medio es referido como medio de subcultivo).

**(2) Preparación de un modelo de ratón con células HepG2 transplantadas**

Utilizando una solución que contenía medio de subcultivo y Matriz MATRIGEL (BD Bioscience) a 1 : 1, se preparó una suspensión de células HepG2 a  $5 \times 10^7$  células/mL. Se transplantaron subcutáneamente 100  $\mu$ L de la suspensión celular ( $5 \times 10^6$  células/ratón) en la región abdominal de ratones SCID (macho, 5 semanas de edad,

CLEA Japón, Inc.). El día anterior al trasplante de células, los ratones recibieron 100 µL de anticuerpo anti-asialo GM1 (el contenido de 1 vial se disolvió en 5 mL de la solución anteriormente mencionada, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) mediante administración interperitoneal. Se calculó el volumen tumoral de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$\text{volumen tumoral} = \text{diámetro grande} \times \text{diámetro pequeño} \times \text{diámetro pequeño} / 2$$

Cuando el volumen tumoral medio alcanzó de 130 a 330 mm<sup>3</sup>, se utilizó el ratón como modelo.

### (3) Preparación de la muestra de administración que contiene el anticuerpo de ensayo

Las muestras de administración que contenían anticuerpo H0L0, anticuerpo Hu2.2Lu2.2, o anticuerpo Hd1.8Ld1.6 a 0,5 mg/mL (5 mg/kg grupo) o 0,1 mg/mL (1 mg/kg grupo) se prepararon con solución salina fisiológica el día de la administración.

### (4) Administración de la muestra de administración que contiene el anticuerpo

La muestra de administración preparada de acuerdo con el apartado (3) se administró a una dosis de 10 mL/kg a través de la vena de la cola al modelo de ratón preparado en el apartado (2) una vez por semana durante tres semanas comenzando 27 días después del trasplante de células HepG2. Como control negativo, se administró solución salina fisiológica a una dosis de 10 mL/kg a través de la vena de la cola una vez por semana durante tres semanas. Todos los grupos contenían 5 animales, y cada administración que contenía anticuerpo de ensayo se administró a un grupo respectivo. Aproximadamente al mismo tiempo de la administración, se recogió sangre venosa de 3 animales de cada grupo y se analizó para determinar la concentración en plasma murino del anticuerpo. Específicamente, se recogió sangre de una vena dorsal de la pata en dos momentos: 0,5 horas después de la administración inicial e inmediatamente antes de la segunda administración. Se trataron 20 µL de sangre recogida con heparina y el plasma se aisló mediante centrifugación.

### (5) Evaluación de la actividad anti-tumoral de los anticuerpos de ensayo

Se evaluó la actividad anti-tumoral de cada anticuerpo de ensayo en el modelo de ratón de cáncer de hígado humano transplantado. Se midió el volumen tumoral una semana después del último día de administración de muestra. Los resultados se muestran en la Figura 7. El anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) mostró una eficacia terapéutica más fuerte, mientras el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) mostró una eficacia terapéutica débil.

### (6) Concentraciones en plasma de los anticuerpos de ensayo

Se midió la concentración del anticuerpo de ensayo en plasma murino por medio de un método basado en ELISA descrito en el Ejemplo 1. Se prepararon muestras patrón a una concentración en plasma de 12,8, 6,4, 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, y 0,2 µg/mL. Las muestras patrón y las muestras de ensayo de plasma murino (adecuadamente diluidas a la concentración deseada) se añadieron a las inmunoplaquetas (Nunc-ImmunoPlate, MaxiSorp (Nalge Nunc International)) sobre las cuales se encuentra inmovilizado el núcleo de glicoproteína 3 soluble (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), y se incubaron las placas durante 1 hora a la temperatura ambiente. Se añadieron Goat Anti-Human IgG-BIOT (Southern Biotechnology Associates) y después producto conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics) y se llevó a cabo una reacción cromogénica utilizando BluePhos Microwell Phosphatase Substrates System (Kirkegaard & Perry Laboratories) como sustrato. Utilizando un lector de microplaca, se determinó el color de la solución de reacción de cada pocillo midiendo la absorbancia de la solución de reacción a 650 nm. La concentración de anticuerpo en plasma murino se calculó después utilizando el soporte lógico analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices) con referencia a la curva patrón preparada con los valores de absorbancia obtenidos de las muestras patrón.

Las concentraciones en plasma murino después de 30 minutos y 7 días desde la administración se muestran en la Figura 8. Se observó una concentración de anticuerpo más alta en el plasma murino después de 7 días desde la administración del anticuerpo de ensayo que tenía valor de pl más bajos para ambas dosis de administración sometidas a ensayo.

## Ejemplo 7

### Actividad ADCC de los anticuerpos de ensayo medida utilizando monocitos de sangre periférica humana como célula efectora

Se sometió a ensayo la actividad ADCC de los anticuerpos de ensayo como se describe más abajo utilizando monocitos de sangre periférica humana (referidos como PBMC) como células efectoras.

**(1) Preparación de una solución de PBMC humanos**

Utilizando una jeringa previamente cargada con 200  $\mu\text{L}$  de una solución de 1000 unidades/mL de heparina (Novo Heparin Injection 5000 Units, Novo Nordisk), se recogieron 50 mL de sangre periférica de un voluntario sano (macho adulto) de Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha. La sangre se diluyó dos veces con PBS(-), se dividió en 4 partes iguales, y se introdujo en un tubo de separación de linfocitos Leucosep (Greiner Bio-one) que se había cargado previamente con 15 mL de Ficoll-Paque PLUS y se sometió a centrifugación. El tubo de separación cargado con la sangre periférica se centrifugó durante 10 minutos a la temperatura ambiente a 2150 rpm, y se recogió la capa con la fracción de monocitos. Las células contenidas en la capa se lavaron una vez con Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (Sigma) que contenía FBS al 10% (referido más abajo como FBS al 10%/D-MEM) y se suspendieron en FBS al 10%/D-MEM a una densidad celular de  $5 \times 10^6/\text{mL}$ . La suspensión celular se sometió al siguiente experimento como solución de PBMC humanos.

**(2) Preparación de células diana**

Se despegaron las células HepG2 de la placa y se sembraron en una placa con el fondo en U de 96 pocillos a  $1 \times 10^4$  células/pocillo. La placa se incubó durante la noche a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora con  $\text{CO}_2$  al 5%. Al día siguiente, se añadió  $\text{Cr}^{51}$  de 5,55 MBq a cada pocillo de la placa y la placa se incubó durante 3 horas a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora con  $\text{CO}_2$  al 5%. Las células HepG2 contenidas en los pocillos de la placa se utilizaron como células diana en el análisis de actividad ADCC descrito más abajo.

**(3) Análisis de liberación de cromo (actividad ADCC)**

Se evaluó la actividad ADCC a partir de la liberación específica de cromo mediante el método de liberación de cromo. Las células diana preparadas en el apartado (2) se lavaron con el medio, y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de cada anticuerpo (anticuerpo H0L0, anticuerpo Hu2.2Lu2.2, o anticuerpo Hd1.8Ld1.6) a una concentración de 0, 0,004, 0,04, 0,4, 4, o 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La placa se hizo reaccionar durante 15 minutos a la temperatura ambiente, y se retiró la solución de anticuerpo. Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de medio de subcultivo a cada pocillo y la placa se incubó durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora con  $\text{CO}_2$  al 5%. Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de la solución de PBMC humanos preparadas como en el apartado (1) a cada pocillo ( $5 \times 10^5$  células/pocillo), y la placa se incubó durante 3 horas a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora con  $\text{CO}_2$  al 5% y se centrifugó. Se midió la radiactividad en 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cultivo en cada pocillo de la placa por medio de un contador gamma. Se determinó la tasa de liberación específica de cromo de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$\text{Tasa de liberación específica de cromo (\%)} = (A - C) \times 100 / (B - C)$$

donde A representa el valor medio de la radiactividad (cpm) de los 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cultivo en cada pocillo; B representa el valor medio de la radiactividad (cpm) de los 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cultivo en los pocillos en los que se habían añadido 100  $\mu\text{L}$  de solución acuosa de NP-40 al 2% (Nonidet P-40, Nacalai Tesque) y 50  $\mu\text{L}$  de medio FBS al 10%/D-MEM a las células diana; y C representa el valor medio de la radiactividad (cpm) de 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cultivo en los pocillos en los que se habían añadido 150  $\mu\text{L}$  de medio FBS al 10%/D-MEM a las células diana. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, y se calcularon el valor medio y la desviación típica de la tasa de liberación específica de cromo (%), que es el reflejo de la actividad ADCC para el anticuerpo, a partir de los resultados del ensayo.

**(4) Evaluación de la actividad ADCC de los anticuerpos de ensayo**

Los resultados de la evaluación de la actividad ADCC mostrada por las PBMC humanos a través del anticuerpo de ensayo revelaron que todos los anticuerpos de ensayo mostraban actividad ADCC. Los resultados se muestran en la Figura 9. El ensayo sobre la diferencia significativa reveló que no se observaba ninguna diferencia significativa entre los anticuerpos de ensayo a cualquiera de las concentraciones sometidas a ensayo en la tasa de liberación específica de cromo de los anticuerpos de ensayo. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando SAS Preclinical Package (SAS Institute Inc.). Estos resultados demostraron que no había diferencia entre las actividades ADCC de los anticuerpos de ensayo con el pl modificado.

**Ejemplo 8****Preparación y caracterización del anticuerpo con el pl modificado mediante mutación puntual****(1) Selección de los sitios de modificación para disminuir el pl**

Para mejorar la actividad supresora de tumores del anticuerpo Hd1.8Ld1.6, se seleccionaron los sitios de modificación para determinar la capacidad de disminuir el valor del pl de la región variable. Se encontraron residuos de aminoácido que implicaban la disminución del valor del pl de la región variable, que se resumen en la Tabla 2 (cadena pesada) y en la Tabla 3 (cadena ligera). Los ejemplos específicos de estas modificaciones para disminuir el valor del pl son el anticuerpo pH7pL14 y el anticuerpo pH7pL16. Estos anticuerpos con modificación del pl se

prepararon como sigue.

Los sitios de modificación se crearon por medio de Assemble PCR. Se sintetizaron oligo ADN diseñados basándose en las secuencias efectora y antisentido que contenían la modificación. Se utilizó en la PCR un par de un oligo ADN antisentido que contenía el sitio de la modificación y un oligo ADN efector que correspondía al vector que portaba el gen que se iba a modificar, o un par de un oligo ADN efector que contenía el sitio de la modificación y un oligo ADN antisentido que correspondía al vector que portaba el gen que se iba a modificar con PrimeSTAR (TAKARA) para obtener los fragmentos del lado 5' y del lado 3' que contenían el sitio de la modificación. Los dos fragmentos se conectaron utilizando Assemble PCR para preparar cada mutante.

El mutante obtenido de este modo se insertó en un vector de expresión lo que permite la expresión del gen insertado en células animales. La secuencia de nucleótidos del vector de expresión se determinó mediante un método conocido en la técnica. La introducción de la mutación puntual se confirmó por medio de la secuencia de nucleótidos del ADN plasmídico. El gen que contenía la mutación puntual se clonó en un vector de expresión lo que permite la expresión del gen insertado en células animales. La expresión y purificación del anticuerpo se realizaron de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1 o un método similar.

Partiendo de Hd1.8, la glutamina 61<sup>a</sup> (Q) (de acuerdo con la numeración de Kabat) presente en la CDR1 de Hd1.8 fue sustituida por ácido glutámico (E) para preparar pH7 (SEQ ID NO: 27). Partiendo de Ld1.6, la arginina 24<sup>a</sup> (R) (de acuerdo con la numeración de Kabat) presente en la CDR1 de Ld1.6 fue sustituida por glutamina (Q), la glutamina 37<sup>a</sup> (Q) fue sustituida por leucina (L), la alanina 43<sup>a</sup> (A) fue sustituida por serina (S), la arginina 45<sup>a</sup> (R) fue sustituida por glutamina (Q), la treonina 74<sup>a</sup> (T) fue sustituida por lisina (K), la serina 77<sup>a</sup> (S) fue sustituida por arginina (R), la leucina 78<sup>a</sup> (L) fue sustituida por valina (V), y la glutamina 79<sup>a</sup> (Q) fue sustituida por ácido glutámico (E), cada una presente en la FR2 y FR3, para preparar pL14 (SEQ ID NO: 28) .

Partiendo de pL14, la leucina 104<sup>a</sup> (L) (de acuerdo con la numeración de Kabat) fue sustituida por valina (V), la lisina 107<sup>a</sup> (K) fue sustituida por ácido glutámico (E), cada una presente en la FR4 de pL14, para preparar pL16 (SEQ ID NO: 29).

### **(2) Medición del valor de pl de los anticuerpos con el pl modificado mediante mutación puntual**

Se midieron los valores del anticuerpo Hd1.8Ld1.6, el anticuerpo pH7pL14 y el anticuerpo pH7pL16 mediante electroforesis con PhastGel IEF 4-6.5 (GE Healthcare) utilizando el método descrito en el Ejemplo 1 o un método similar. Los valores de pl del anticuerpo Hd1.8Ld1.6, el anticuerpo pH7pL14 y el anticuerpo pH7pL16 fueron 7,47, 7,07 y 6,52, respectivamente, indicando que los valores de pl del anticuerpo pH7pL14 y el anticuerpo pH7pL16 eran inferiores al del anticuerpo Hd1.8Ld1.6 en 0,4 y 0,95, respectivamente.

### **(3) Medición del valor de Tm de los anticuerpos con el pl modificado mediante mutación puntual**

Se midieron los valores de Tm de Fabs obtenidos del anticuerpo Hd1.8Ld1.6, el anticuerpo pH7pL14 y el anticuerpo pH7pL16 con VP-DSC (Micro Cal) utilizando un método similar al del Ejemplo 1. En este experimento, se utilizó PBS como solución de diálisis, y la concentración del anticuerpo en la solución de ensayo para la medición de DSC se ajustó a 25-100 µg/ml. El barrido DSC se ajustó de 20°C a 115°C a la velocidad de barrido de aproximadamente 4K/min, con la solución de referencia (solución de diálisis) y la solución de ensayo para la medición DSC. La temperatura del punto medio de desnaturalización térmica de los Fabs del anticuerpo Hd1.8Ld1.6, pH7pL14 y el anticuerpo pH7pL16 fue de 77,5, 78,0 y 74,7 °C, respectivamente.

### **(4) Evaluación de la actividad de unión al antígeno de anticuerpos con el pl modificado mediante mutación puntual mediante ELISA competitivo**

Se midió la actividad de unión al antígeno glicicano 3 de cada anticuerpo con el pl modificado mediante mutación puntual utilizando el método descrito en el Ejemplo 1 (Figura 10). Se demostró que la actividad de unión a glicicano 3 del anticuerpo pH7pL14 y el anticuerpo pH7pL16 era comparativa a la del anticuerpo H0L0.

## **Ejemplo 9**

### **Preparación de anticuerpo con el pl modificado mediante mutación puntual utilizando la línea celular FTP-KO**

Se introdujo el vector de expresión que portaba el gen que codificaba cada el anticuerpo con el pl modificado mediante mutación puntual preparado en el Ejemplo 8 en las células de la línea celular FTP-KO preparada en el Ejemplo de referencia 2 utilizando Polietilimina (Polysciences Inc.), y se expresó el anticuerpo. El anticuerpo modificado se purificó a partir del sobrenadante de cultivo celular utilizando rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences). La solución de anticuerpo purificado se preparó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 5 y se midió la concentración de anticuerpo.

**Ejemplo 10****Eficacia terapéutica en un modelo *in vivo* de anticuerpo GC33 humanizado y anticuerpos con el pl modificado mediante mutación puntual****(1) Mantenimiento de la línea celular utilizada para el trasplante en el modelo *in vivo***

Se utilizaron células Hep G2 (ATCC). Las células Hep G2 se mantuvieron mediante subcultivo en Medio Esencial Mínimo de Eagle (SIGMA) con un suplemento de FBS al 10%, 1 mmol/l de MEM de Piruvato de Sodio (Invitrogen), y 1 mmol/l de MEM de aminoácidos no esenciales (Invitrogen) (referido como medio de subcultivo).

**(2) Preparación de modelo de ratón con células HepG2 transplantadas**

Utilizando una solución que contenía medio de subcultivo y MATRIGEL Matrix (BD Bioscience) a 1 : 1, se preparó una suspensión de células HepG2 a  $5 \times 10^7$  células/mL. Se transplantaron subcutáneamente 100  $\mu$ L de la suspensión celular ( $5 \times 10^6$  células/ratón) a la región abdominal de ratones SCID (macho, 5 semanas de edad, CLEA Japón, Inc.). El día anterior al trasplante celular, los ratones recibieron 100  $\mu$ L de anticuerpo anti-asialo GM1 (el contenido de 1 vial se disolvió en 5 mL de la solución, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) mediante administración intraperitoneal. El volumen del tumor se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula.

volumen del tumor = diámetro grande x diámetro pequeño x diámetro pequeño / 2

Cuando el tamaño medio del tumor alcanzó 400 mm<sup>3</sup>, se utilizó el ratón como modelo.

**(3) Preparación de la muestra de administración que contiene el anticuerpo de ensayo**

Las muestras de administración que contenían anticuerpo H0L0, anticuerpo, Hd1.8Ld1.6, anticuerpo pH7pL14 o anticuerpo pH7pL16 a 0,1 mg/mL (1 mg/kg grupo) se prepararon con solución salina fisiológica el día de la administración.

**(4) Administración de la muestra de administración que contiene el anticuerpo**

La muestra de administración preparada de acuerdo con el apartado (3) se administró a una dosis de 10 mL/kg a través de la vena de la cola en el modelo de ratón preparado en el apartado (2) una vez por semana durante cinco semanas comenzando 34 días después del trasplante con células HepG2. Como control negativo, se administró solución salina fisiológica a una dosis de 10 mL/kg a través de la vena de la cola una vez por semana durante cinco semanas. Todos los grupos contenían 5 animales, y cada muestra de administración que contenía anticuerpo de ensayo se administró a un grupo respectivo. Aproximadamente en el mismo momento de la administración, se recogió sangre venosa de 3 animales de cada grupo y se analizó para determinar la concentración del anticuerpo en plasma murino. Específicamente, se recogió sangre de una vena dorsal de la pata en dos momentos puntuales: 0,5 horas después de la administración inicial e inmediatamente antes de la segunda administración. Se trataron 20  $\mu$ L de sangre recogida con heparina y el plasma se aisló mediante centrifugación.

**(5) Evaluación de la actividad anti-tumoral de los anticuerpos de ensayo**

Se evaluó la actividad anti-tumoral de cada anticuerpo de ensayo en el modelo de ratón de cáncer de hígado humano transplantado. Se midió el volumen tumoral una semana después del último día de administración de la muestra. Como se muestra en la Figura 11, se encontró una eficacia terapéutica más fuerte en el anticuerpo pH7pL14 y el anticuerpo pH7pL16 en comparación con el anticuerpo H0L0 y el anticuerpo Hd1.8Ld1.6.

**Ejemplo 11****Ensayo PK del anticuerpo GC33 humanizado y anticuerpos con mutaciones puntuales utilizando un modelo *in vivo*****(1) Preparación de muestra de administración que contiene anticuerpo de ensayo**

Se prepararon muestras de administración que contenían anticuerpo H0L0, anticuerpo Hd1.8Ld1.6, anticuerpo pH7pL14, anticuerpo pH7pL16 o anticuerpo pH7M85pL16 a 0,5 mg/mL (5 mg/kg grupo) con solución salina fisiológica el día de la administración.

**(2) Administración de la muestra que contiene anticuerpo**

Se administró la muestra de administración preparada de acuerdo con el apartado (1) a una dosis de 10 mL/kg a través de la vena de la cola al ratón C.B-17/Icr-scid. Todos los grupos contenían 3 animales, y cada muestra de administración que contenía anticuerpo de ensayo se administró a un grupo respectivo. Se recogió sangre venosa de los animales y se analizó para determinar la concentración en plasma murino de anticuerpo. Específicamente, se

recogió sangre de una vena dorsal de la para en siete momentos puntuales: 0,5 horas, 2 horas, 8 horas, 24 horas, 72 horas, 168 horas después de la administración inicial. Se trataron 20 µL de sangre recogida con heparina y se aisló el plasma mediante centrifugación.

### 5 (3) Concentraciones en plasma de los anticuerpos de ensayo

Se midió la concentración de anticuerpo de ensayo en plasma murino mediante un método basado en ELISA descrito en el Ejemplo 6. Se prepararon muestras patrón a una concentración en plasma de 12,8, 6,4, 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, y 0,2 µg/mL. Las muestras patrón y las muestras de ensayo de plasma murino (adecuadamente diluidas a una concentración deseada) se añadieron a inmunoplaquetas (Nunc-ImmunoPlate, MaxiSorp (Nalge Nunc International)) sobre las cuales estaba inmovilizado núcleo de glicoproteína 3 soluble (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), y las plaquetas se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente. Se añadieron Anti-IgG Humana-BIOT de Cabra (Southern Biotechnology Associates) y después se añadió producto conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics), y se llevó a cabo una reacción cromogénica utilizando BluePhos Microwell Phosphatase Substrates System (Kirkegaard & Perry Laboratories) como sustrato. Utilizando un lector de microplaca, se determinó el color de la solución de reacción en cada pocillo midiendo la absorbancia de la solución de reacción a 650 nm. Después se calculó la concentración en plasma murino utilizando el soporte lógico analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices) con referencia a la curva patrón preparada con los valores de absorbancia obtenidos a partir de las muestras patrón.

Las concentraciones en plasma murino después de la administración se muestran en la Figura 12. Se observó una concentración de anticuerpo superior en el plasma de ratones que habían recibido el anticuerpo de ensayo que tenía un pl menor.

### 25 Ejemplo 12

#### Actividad ADCC de los anticuerpos de ensayo utilizando monocitos de sangre periférica humana como célula efectora

Se sometió a ensayo la actividad ADCC de los anticuerpos de ensayo como se describe más abajo utilizando monocitos de sangre periférica humana (referidos como PBMC) como células efectoras.

#### (1) Preparación de solución de PBMC humanos

Utilizando una jeringa previamente cargada con 200 µL de una solución de heparina de 1000 unidades/mL (Novo Heparin Injection 5000 Unidades, Novo Nordisk), se recogieron 50 mL de sangre periférica de un voluntario sano (adulto varón) de Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha. La sangre se diluyó dos veces con PBS(-), se dividió en 4 partes iguales y se introdujo en un tubo de separación de linfocitos Leucosep (Greiner Bio-one) que se había cargado previamente con 15 mL de Ficoll-Paque PLUS y se sometió a centrifugación. El tubo de separación cargado previamente con la sangre periférica se centrifugó durante 10 minutos a la temperatura ambiente a 2150 rpm, y se recogió la capa con la fracción de monocitos. Las células contenidas en la capa se lavaron una vez con Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (Sigma) que contenía FBS al 10% (referido más abajo como FBS al 10%/D-MEM) y se suspendieron en FBS al 10%/D-MEM a una densidad celular de  $5 \times 10^6$ /mL. La suspensión celular se sometió al siguiente experimento como solución de PBMC humanos.

#### 45 (2) Preparación de células diana

Se despegaron las células HepG2 de una placa y se sembraron en una placa con el fondo en U de 96 pocillos a  $1 \times 10^4$  células/pocillo. La placa se incubó durante la noche a 37°C en una incubadora con CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se añadió Cr<sup>51</sup> de 5,55 MBq a cada pocillo de la placa y la placa se incubó durante 3 horas a 37°C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%. Las células HepG2 contenidas en los pocillos de la placa se utilizaron como células diana en el análisis de la actividad ADCC como se describe más abajo.

#### (3) Análisis de liberación de cromo (actividad ADCC)

Se evaluó la actividad ADCC a partir de la tasa de liberación específica de cromo determinada mediante el método de liberación de cromo. Las células diana preparadas como en el apartado (2) se lavaron con medio, y se añadieron 100 µL de cada anticuerpo (anticuerpo H0L0, anticuerpo Hd1.8Ld1.6, anticuerpo pH7pL14 o anticuerpo pH7pL16) a una concentración de 0, 0,004, 0,04, 0,4, 4, o 40 µg/mL. La placa se hizo reaccionar durante 15 minutos a la temperatura ambiente, y se retiró la solución de anticuerpo. Se añadieron 100 µL de medio de subcultivo a cada pocillo y la placa se incubó durante 1 hora a 37°C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%. Se añadieron 100 µL de la solución de PBMC humanos preparada como en el apartado (1) a cada pocillo ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) y la placa se incubó durante 4 horas a 37°C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%, y se centrifugó. Se midió la radiactividad en 100 µL del sobrenadante de cultivo en cada pocillo de la placa por medio de un contador gamma. La tasa de liberación específica de cromo se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula.

Tasa de liberación específica de cromo (%) =  $(A - C) \times 100 / (B - C)$

donde A representa el valor medio de la radiactividad (cpm) de los 100  $\mu$ L de sobrenadante de cultivo en cada pocillo; B representa el valor medio de la radiactividad (cpm) de los 100  $\mu$ L de sobrenadante de cultivo en los pocillos en los que se habían añadido 100  $\mu$ L de solución acuosa de NP-40 al 2% (Nonidet P-40, Nacalai Tesque) y 50  $\mu$ L de medio FBS al 10%/D-MEM a las células diana; y C representa el valor medio de la radiactividad (cpm) de 100  $\mu$ L de sobrenadante de cultivo en los pocillos en los que se habían añadido 150  $\mu$ L de medio FBS al 10%/D-MEM a las células diana. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, y se calcularon el valor medio y la desviación típica de la tasa de liberación específica de cromo (%), que es el reflejo de la actividad ADCC para el anticuerpo, a partir de los resultados del ensayo.

#### 5 (4) Evaluación de la actividad ADCC de los anticuerpos de ensayo

Los resultados de la evaluación de la actividad ADCC mostrada por los PBMC humanos a través del anticuerpo de ensayo revelaron que todos los anticuerpos de ensayo mostraban actividad ADCC. Los resultados se muestran en la Figura 13. El ensayo de diferencia significativa reveló que no se observaba diferencia significativa a ninguna de las concentraciones sometidas a ensayo entre los anticuerpos de ensayo y el anticuerpo H0L0 de control en la tasa de liberación específica de cromo de los anticuerpos. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando SAS Preclinical Package (SAS Institute Inc.). Estos resultados demostraron que no había diferencia entre las actividades ADCC de los anticuerpos de ensayo con el pl modificado.

#### 20 Ejemplo 13

**Preparación y evaluación de anticuerpos modificados capaces de disminuir el valor de pl de la región constante**

##### 25 (1) Selección de los sitios de modificación para disminuir el valor de pl de la región constante

IgG1 $\Delta$ GK (SEQ ID NO: 32) es la región constante de IgG1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 31, que carece de la Gly 446<sup>a</sup> y de la Lys 447<sup>a</sup> (de acuerdo con la numeración EU) de la región constante de IgG1. La delección de estos dos residuos de aminoácido permite disminuir la heterogeneidad causada por región constante terminal de la cadena pesada de un anticuerpo.

El anticuerpo se modificó para que tuviera un descenso en el valor de pl en la región constante sustituyendo algunos de los residuos de aminoácido de IgG1 $\Delta$ GK por los correspondientes residuos de aminoácido de la secuencia de la región constante de IgG4 humana de acuerdo con la numeración EU.

Específicamente, la histidina 268<sup>a</sup> (H) de IgG1 $\Delta$ GK (de acuerdo con la numeración EU) fue sustituida por la glutamina (Q) de la secuencia IgG4, la lisina 274<sup>a</sup> (K) fue sustituida por glutamina (Q), la arginina 355<sup>a</sup> (R) fue sustituida por glutamina (Q), el ácido aspártico 356<sup>a</sup> (D) fue sustituido por ácido glutámico (E), la leucina 358<sup>a</sup> (L) fue sustituida por metionina (M), y la glutamina 419<sup>a</sup> (Q) fue sustituida por ácido glutámico (E). Estas sustituciones contienen una secuencia de 9-12 aminoácidos que puede servir como epítipo de las células T solamente derivadas de una región constante humana y de este modo se espera que tengan un menor riesgo de inmunogenicidad. Estas 6 modificaciones fueron introducidas en IgG1 $\Delta$ GK para obtener M85 (SEQ ID NO: 33).

La región constante M85 se combinó con la región variable pH7 y H0 para preparar pH7M85 (SEQ ID NO: 34) y H0M85 (SEQ ID NO: 35), respectivamente. El anticuerpo H0M85L0 se preparó a partir de H0M85 como cadena pesada y L0 como cadena ligera, y el pH7M85pL16 se preparó a partir de pH7M85 como cadena pesada y pL16 como cadena ligera. Asimismo, el anticuerpo H0L0 y el anticuerpo pH7pL16 que tienen la región constante de IgG1 se prepararon como en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 8. Los anticuerpos H0M85L0, pH7M85pL16, H0L0, y pH7pL16 se expresaron en la línea celular FTP-KO o en células HEK293, y se purificaron como se describe en el Ejemplo 1 o 9.

##### 50 (2) Medición del valor de pl de anticuerpos con pl modificado en la región constante

Se midió el valor de pl del anticuerpo H0L0, el anticuerpo H0M85L0, el anticuerpo pH7pL16, y el anticuerpo pH7M85pL16 mediante electroforesis con PhastGel IEF 4-6.5 (GE Healthcare) en las mismas condiciones de electroforesis utilizando un método similar al descrito en el Ejemplo 1. Los valores de pl del anticuerpo H0L0, el anticuerpo H0M85L0, el anticuerpo pH7pL16 y el anticuerpo pH7M85pL16 fueron 8,85, 8,16, 6,52 y 5,78, respectivamente, indicando que la modificación en la región constante contribuye a disminuir adicionalmente el valor de pl sin afectar a la inmunogenicidad del anticuerpo.

##### 60 (3) Evaluación de la actividad de unión de los anticuerpos con el pl modificado en la región constante mediante ELISA competitivo

Se midió la actividad de unión al antígeno de cada anticuerpo con el pl modificado en la región constante utilizando el método descrito en el Ejemplo 1 (Figura 14). Se demostró que la actividad de unión a glicoproteína 3 del anticuerpo H0L0, el anticuerpo H0M85L0, el anticuerpo pH7pL16, el anticuerpo pH7M85pL16 era aproximadamente la misma.

**Ejemplo 14****Actividad ADCC de los anticuerpos con pl modificado en la región constante utilizando monocitos de sangre periférica humana como células efectoras**

5 Se sometió a ensayo la actividad ADCC del anticuerpo pH7pL16 y el anticuerpo pH7M85pL16 utilizando el método descrito en el Ejemplo 12. Los resultados se muestran en la Figura 15. El ensayo de diferencia significativa reveló que no se observaba diferencia significativa entre los anticuerpos de ensayo a cualquiera de las concentraciones sometidas a ensayo en la tasa de liberación específica de cromo de los anticuerpos de ensayo. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando SAS Preclinical Package (SAS Institute Inc.). Estos resultados demostraron  
10 que no había diferencia entre las actividades ADCC del anticuerpo pH7pL16 y el anticuerpo pH7M85pL16.

**LISTA DE SECUENCIAS**

15 <110> Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha  
 <120> Anticuerpos Anti-Glipicano 3 con una Cinética en Plasma Mejorada  
 <130> PCG-9023WO  
 <150> JP 2007-256063  
 <151> 2007-09-28  
 <160> 35  
 20 <170> PatentIn versión 3.1  
 <210> 1  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Cadena H de anticuerpo humanizado  
 <400>  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 20 25 30  
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115  
 <210> 2  
 30 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cadena H de anticuerpo humanizado  
 35 <400>  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 20 25 30  
 Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115  
 <210> 3  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena H de anticuerpo humanizado

<400>

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
      20      25      30
Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met
      35      40      45
Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Ser Phe
      50      55      60
Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
      100      105      110
Val Ser Ser
      115
```

5 <210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cadena H de anticuerpo humanizado

<400>

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
      20      25      30
Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
      35      40      45
Gly Ala Leu Asn Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
      50      55      60
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
      100      105      110
Val Ser Ser
      115
```

15 <210> 5

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena H de anticuerpo humanizado

<400>

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
      20      25      30
Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile
      35      40      45
Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Ser Phe
      50      55      60
Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
      100      105      110
Val Ser Ser
      115
```

20 <210> 6

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena H de anticuerpo humanizado

25 <210> 6

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena H de anticuerpo humanizado

ES 2 394 471 T3

<400>

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Ala Ile Asn Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 7

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena L de anticuerpo humanizado

<400>

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

10 <210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Cadena L de anticuerpo humanizado

<400>

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 35 40 45  
 Pro Arg 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

20 <210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Cadena L de anticuerpo humanizado

<400>

ES 2 394 471 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln 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 Thr Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 10

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena L de anticuerpo humanizado

<400>

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Arg Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Cadena L de anticuerpo humanizado

<400>

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 35 40 45  
 Pro Arg 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 Thr Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Cadena L de anticuerpo humanizado

<400>

ES 2 394 471 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Arg Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 35 40 45  
 Pro Arg 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 13

<211> 545

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400>

Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser  
 1 5 10 15  
 Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro  
 20 25 30  
 Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys  
 35 40 45  
 Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn  
 50 55 60  
 Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile  
 65 70 75 80  
 Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg  
 85 90 95  
 His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser  
 100 105 110  
 Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val  
 115 120 125  
 Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn  
 130 135 140  
 Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn  
 145 150 155 160  
 Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly  
 165 170 175  
 Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met  
 180 185 190  
 Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala  
 195 200 205  
 Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe  
 210 215 220

ES 2 394 471 T3

Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr  
 225 230 235 240  
 Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val  
 245 250 255  
 Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp  
 260 265 270  
 Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg  
 275 280 285  
 Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His  
 290 295 300  
 Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr  
 305 310 315 320  
 Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala  
 325 330 335  
 Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala  
 340 345 350  
 His Val Glu His Glu Glu Thr Leu Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile  
 355 360 365  
 Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr  
 370 375 380  
 Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn  
 385 390 395 400  
 Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly  
 405 410 415  
 Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu  
 420 425 430  
 Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu  
 435 440 445  
 Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu  
 450 455 460  
 Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ala Gly Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu  
 465 470 475 480  
 Cys Ile Gly Gly Ala Gly Asp Gly Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu  
 485 490 495  
 Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro  
 500 505 510  
 Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe  
 515 520 525  
 His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys His His His His His  
 530 535 540

His  
 545

<210> 14

<211> 32

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400>

ggatcctgcg catgaaaaag cctgaactca cc

32

10 <210> 15

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Cebador

<400>

gcggccgcct attccttgc cctcggacg

29

<210> 16

<211> 10939

20 <212> ADN

<213> Cricetulus griseus

<400>

# ES 2 394 471 T3

gagctcaatt	aaccctcact	aaagggagtc	gactcgatcc	tttacagaaa	acttgcaaac	60
cctcttgag	tagaaaaagta	gtagtatctg	acacaagtat	cagcaaaatg	caaacttctc	120
cccatcccca	gaaaaccatt	ataaaaacc	ccatactta	tgcccaactg	tagtgateata	180
ttatttatga	tttattaaaa	cttgcttaag	gattcagaaa	gcaaagtcag	ccttaagcta	240
tagagacca	gcagtcagtg	gtggtacaca	cctttaatcc	caggactcag	gattaagaag	300
tagacggacc	tctgttagtt	caagtctacc	attacctaca	caagagtga	gagtaaccga	360
tctcatgcct	ttgatccag	cagctgggat	catgtgcatt	caatcccagc	attcgggagt	420
tataaagac	aggagcaag	tctcagagct	ggcattcatt	ctccagccac	atlgaggata	480
ggaaaacatt	gaagtgcag	gatgctgagg	agaggcagca	gtttgaggtt	tggtagaacc	540
aggatcacct	tttggctga	ggtagagtaa	gaactgtggc	tggctgcttt	gcttttctga	600
tcttcagctt	gaagcttga	ctccaatatt	tgtctctggg	tctattatta	tcatgttaca	660
cctaacttta	aagctgatt	acgcaagaca	gtttaggtg	gacctttctt	tctgcccac	720
cagttcccaa	ataactgaca	cggagactca	atattaatta	taaatgattg	gttaatagct	780
cagcttgtt	actggctaac	tcttacattt	taaattaact	catttccatc	cctttacttg	840
ctgccatgtg	gttcatggct	tgttcaagtc	ctgcttcttc	tgtctctggc	tggtgatgcc	900
tctggtctg	ccctttatcc	cagaattctc	ctagtctggc	tctcctgccc	agctataggc	960
cagtcagctg	tttattaac	aatgagaata	atacatattt	atagtgtaca	aagattgctc	1020
ctcaacaccc	aattttttat	gtgcaacctg	agaatctgga	ctcattgccc	tcatgcttgc	1080
agaggcgca	cccttaccca	ctaagccacc	tttctagccc	tgttgctttt	gttttttgag	1140
acaggtcca	ctatgtagcc	caggctggcc	tcaaaactgac	cattctcctg	cctaaacctc	1200
ccgaacactg	gaattataat	caaggctac	ctgcctggc	attttcacac	ttttatttcc	1260
tggctgagtc	cattgacttt	acactcatca	agggtgaacc	agttggagtt	taattacagt	1320
gccaatcgca	ctgaatccca	cataatcaaa	caacttcaag	gaagcaaaaa	accagttttt	1380
cctgaagatc	aatgtcagct	tgctgtatc	agaatagacc	cccgaaaaaa	ggcaaatgct	1440
tgataaccaa	tttctctta	ttgttcaatc	ccctgctgct	gtgtgtaagc	tctgagaaa	1500
ggacagtaag	gggacattca	tgatcagaga	aagagcccca	actccccccc	cagccccacc	1560
cccaccctgt	ccacagctcg	ttggtttggt	ttccccctgg	ctgacaccca	gaaatcacia	1620
cataatcacc	taggtcactg	taacaagttc	ctttctggaa	aatgctacaa	atgatattgg	1680
taacatgagt	aatgaataat	caactggatc	caactcccct	gtgacccagc	aatgttttcc	1740
gtgggtgctc	ccttcccag	ctgcagccct	gacatgtacc	ttaaaaagcc	tcccctggag	1800
gacagaattt	tgtgggtact	atagtgttct	cacaaatact	tcccctaata	cccttactta	1860
gttaccataa	ataacatgca	gcccctgggt	aggcacacag	ggctccaatg	tacagtttct	1920
cagacactgc	aggaaccttc	ctctcctaat	gcagcactgg	tctcttcagg	ctggacagca	1980
ggaaccata	ccactccaat	cctagtgtgg	agtagagctg	tctacgaaaa	ccagcagatc	2040
tatagctaaa	tgtgtttcaa	ttttatgctt	tgacaaattg	tactgacccc	acccccaccc	2100
cttccccctt	gctgtgctg	gaattgaacc	caggaccttg	tgcattgccag	gcaagtactc	2160
taacactgag	ctatagcccc	aatctttcat	ccaagtctct	atgtgtgccc	acactcgctt	2220
tttattttga	gacaaaaggt	tcttattttg	agataaggtc	tactatgttt	gccttgactt	2280
tttttttttt	ttttttttga	acttttgacc	ttcctacctc	agctgagact	acaagtcttt	2340
taccatcagg	cccggctgat	ggtaaaataa	cagtatttga	aatagtttaa	acacatcctc	2400
ttaatggtca	accacacaat	ttccgaaatg	ttgctggctc	agtctggggc	aaacctgtcc	2460
gccccacat	tgggtgctagg	aagaaagcac	agacaagtag	ccctcccagc	tcaggagtaa	2520
aagacctgga	gggggtggcc	cacttcggtc	aagttcacgg	gatggggagg	ggtaccctcc	2580
tccagtagtg	gtggatattg	gcagttcctc	caccgacgcc	ctctggaagc	acctgcttgg	2640
accogcaaa	ccaggaatgc	agcttctcca	agggactcgc	cagcgagggt	aacaggacag	2700
aggcgtccca	agagggctgg	ggcgaaggg	ggaagacagg	gtcggcctta	gatagggcaa	2760
aggccctct	ggctgtgttc	ccgggtaac	cgccccacca	cgcttgagc	ccgacgtggc	2820
gagcgatggg	gacagcgagc	aggaagtcgt	actggggagg	gccgcgtagc	agatgcagcc	2880
gagggcgcg	ctgccaggta	cacccgaggg	caccgcgggg	gtgagcgcca	ggtccctgaa	2940
ccagccaggc	ctccagagcc	gagtcggcg	gaccgacggt	acgttctgga	atgggaaggg	3000
atccgggaca	ccgaattgct	gcattgaggg	gctcagaggt	tctgatgtgg	gagtcagaa	3060
agggttttat	ctaccggagg	tgatgtgact	tccggcctct	ggaagtgtctg	ttggagtctc	3120
tgggaccttg	ggtcctctcg	actaggtttg	gaaggggtga	aataggggta	gggagaaagg	3180
agaggactgc	agcaatgtct	tcccgaacga	cctgggttcg	ggaggggtcg	aaggacaagg	3240
ggctgttg	gggggtcttc	agacgcgag	gggtgggtatt	ctatcttctg	ggaagatggt	3300
gtcgatgcac	ttgaccaagt	ctagtcgac	tgaagaggct	aggggaacag	acagtgagag	3360
aggatggtgg	agggagtggc	agaaccttc	cagaaactgg	gagaggctct	agcacctgca	3420
acccttccc	tggcctccgg	ggagtcccag	aagagggcag	gacctggac	acaggtgcat	3480
tctgcccgc	gcctccggc	ctggcgaag	tgccgctct	tgaggccgc	gggaggcca	3540

ES 2 394 471 T3

gacgcgcc	cgagagctg	gcccttaag	gctacccgga	ggcgtgtcag	gaaatgccc	3600
ctgagccc	ccctcccga	acgcgccc	agactggca	agctgagacg	gaactcggaa	3660
ctagcactcg	gtcgcggcc	tcgggtgaggc	cttgccccc	ccatgcctct	gtcattgccc	3720
ctcgggccc	ctccctgaac	ctccgtgacc	gccctgcagt	cctccctccc	cccttcgac	3780
tcggcgccg	cttccggcg	ctccccgagc	ccgccctcca	cgtagcccac	acctccctct	3840
cggcgctccg	cttcccacgc	ggtcccgcac	ctgttctttc	ctcctccacc	ctgcccttct	3900
gtccctctcc	cttctttct	cccctcgact	cgccctatt	aggcaacagc	ccctgtggtc	3960
cagccggcca	tggtgtcaa	ggctcacacc	cttagctagg	ccccttctcc	cttccctggg	4020
tcttgtctca	tgaccccctg	cccccccgg	gagcgagcgc	gatgtggagc	agtgcctctg	4080
gcaagcagaa	cttacccca	gccatgtgac	aattgaaggc	tgtaccccca	gacctaaca	4140
tcttggagcc	ctgtagacca	gggagtgtt	ctggccgtgg	ggtgacctag	ctcttctacc	4200
accatgaaca	gggcccctct	gaagcggctc	aggatcctgc	gcatggcgct	gactggaggc	4260
ttccactgca	ctgaggggc	agatgaagac	agcaggaaca	agccgtttct	gctgcccggc	4320
ctgcagatcg	cgctggctgc	ctctctctac	tgggtcacct	ccatctccat	ggtattctct	4380
aacaagtacc	tgctggacag	cccctccctg	cagctggata	cccctatctt	cgctcactttc	4440
taccaatgcc	tggtgacctc	tctgtctgtc	aagggcctca	gactctggc	cacctgctgc	4500
ccctggaccg	tgactctccc	caccctgaac	ctggacctta	aggtggcccg	cagcgtgctg	4560
ccactgtcgg	tagtcttcat	tggcatgata	agtttcaata	acctctgcct	caagtacgta	4620
ggggtggcct	tctacaacgt	ggggcctcctg	ctcaccaccg	tgttcaatgt	gcttctgtcc	4680
tacctgctgc	tcaaacagac	cacttctctc	tatgcccctgc	tcacatgtgg	catcatcatt	4740
ggtagtggg	gcccggggc	tgtggagca	agatgggcat	cgaactgaag	ccctaaagg	4800
caacactgta	ggtaccttta	cttactgtcc	caggctccct	gcatcagcag	ttacaggaag	4860
agccctgtag	aaaacaata	acttccttat	ggtcattcaa	caagttagg	accagccag	4920
ggtgaaaata	atgtagcag	caactacagc	aaagatggct	ctcgccactt	gcatgattaa	4980
aatgtcccag	gtactcagat	ctaagcattg	gatccacatt	aactcaacta	atccctatta	5040
caaggtaaaa	tatatccgaa	ttttacagag	ggaaaaccaa	ggcacagaga	ggctaagtag	5100
cttgaccag	atcacacagc	taataatcac	tgacatagct	gggatttaaa	cataagcagt	5160
tacctccata	gatcacacta	tgaccaccat	gccactgttc	cttctcaaga	gttccaggat	5220
cctgtctgtc	cagttctctt	taaagaggac	aacacatctg	acattgttac	cttgaggtaa	5280
catttgaaat	agtgggtaga	catatgtttt	aagttttatt	cttacttttt	atgtgtgtgt	5340
gtttgggggg	ccaccacagt	gtatgggtgg	agataagggg	acaacttaag	aattggtcct	5400
ttctcccacc	acatgggtgc	tgaggctctga	actcaggtea	tcaggattgg	cacaaatccc	5460
tttaccact	gagccatttc	actgttccaa	tatatgtgtg	cttttaagag	gctttaacta	5520
ttttcccaga	tgtgaatgtc	ctgctgatca	ttatcccctt	ttaccggaa	gccctctggg	5580
aggtgccatc	cctgtgtctg	tctgcataca	aatgggaaa	ctgcaactca	gagaacaag	5640
gctacttgcc	agggcccac	aagtaagata	ggctgggatg	ccatcccaga	ctggccacac	5700
ttccctggct	gtcttcaag	ccagtttact	ttgttctctg	ccattggaag	ttagcatggt	5760
gcagtcaaac	acaataacta	caggccaaaa	gtgcttttaa	attaaagtca	gatgaacttt	5820
taaacatcca	gagctcctca	actgcaggag	ttacaacctg	attctgcaac	catctttgca	5880
gtgcccggta	gtcatatgta	gctagaggct	cttggttagg	acagcatgtg	ttaggaaca	5940
tctggcccgt	agatcattga	attgagtgc	tgctgggtga	caaagaccaa	ggcatccggt	6000
ccctgagagt	cctgggcaag	cagcaatgtg	accttcattt	gtacctactc	aggttcttta	6060
tctgtcctgt	ttgacctact	tagtctcctc	tgggtctctc	gaggcccagg	ctgggtactc	6120
tggatgtcag	gatcaggcca	atgocgacat	ctgccttaga	aatgtccccc	tgggttagca	6180
gctcctgaat	ccatcgtaaa	agggctgga	ccagggagga	gtcagataaa	aaagtgcag	6240
cactggggga	ctccatgggg	aactcccacc	tgccccaca	catccatcct	aagagaactg	6300
gtattccttg	tttctcttt	gtcctacaag	gcacctggg	atcccacttc	agtctcccag	6360
ccttgccagg	gtagagggc	atgagcctcc	ttgtgggaa	tttagatgca	agaaggata	6420
gtcactagag	aacctgagct	cagatcccca	aagtaaccag	tacctgatag	tgaggcagct	6480
gagaaccgca	gcagcctgcc	tgagtggctg	aactctgcgg	cctccggaac	tgccccaac	6540
tgttgggtct	cctcttctct	cctcctgtga	gggagggccc	atctctgata	agtgtgtgg	6600
ggactctaga	gtagggagga	ggaggagcaa	tctaaagcag	ccttactgag	aagtccttgc	6660
tggcatgtgg	ctgcctgagg	agtacagact	gggaacacc	atgtgaatga	gtaaggtttt	6720
tcctgaaggc	catggggagc	cacggaggaa	aatcatttta	gttacaagac	aaagagtaga	6780
ttggttaaca	tgaggagca	gacatggccc	caattttcat	agatgaagga	aattggaact	6840
cagagaggtt	aagtaacttc	tcccaaatag	ctcagcttca	aaatcacaga	acagtcagag	6900
tctagatctc	tctgatgctt	gtgatggctc	tgccattcca	tgttctgat	ccctgtggca	6960
tcagtaagcc	cttaccttgt	gggaatgcag	gatctaaatg	aagagaggaa	gtgctggccc	7020
catgctgtgg	tctgaaaagc	tatgcaggct	ctttgagcag	agagtgacc	acaagtgaat	7080
agagtccat	gagactcaaa	gcaacatcca	cccttaagca	gctctaacca	aatgctcaca	7140
ctgaggagc	caaagccaag	ttagagtctt	gtgcttgccc	aaggtcactt	tgccctggccc	7200

ES 2 394 471 T3

tcctcctata gcacccgtgt tatcctatag ccctcattac agtgattaca attataatta 7260  
gagaggtaac agggccacac tgcctctaca cattcccctg ctagattgta gctgggagag 7320  
ggggagatgt aggtggctgg gggagtgggga gggaaagatgc agattttcat tctgggctct 7380  
actccctcag ccattttttg gtgtgggagt tagacttttg atatgttgat gatgaggtaa 7440  
gggccacaga acagtctgaa ctgtggatc agaatcctgt ccctcctcct ctctcctcat 7500  
ccctcttcac ctgtcactc ctctgtctgc tacaggtggt ttctggctgg gtatagacca 7560  
agagggagct gagggcacc tgtcccctcat aggcaccatc ttcggggtgc tggccagcct 7620  
ctgcgtctcc ctcaatgcca tctataccaa gaaggtgctc ccagcagtg gacaacagcat 7680  
ctggcgcta accttctata acaatgtcaa tgcctgtgtg ctcttcttgc ccctgatggt 7740  
tctgctgggt gagctccgtg ccctccttga ctttgcctcat ctgtacagtg cccactctg 7800  
gctcatgatg acgctgggtg gcctcttcg ctttgccatt ggctatgtga caggactgca 7860  
gatcaaatc accagtcccc tgaccacaaa tgtatcagc acagccaagg cctgtgcgca 7920  
gacagtgctg tacacaaggt acaatgtcaa gactaagagc ttctgtggt ggacaagcaa 7980  
cctgatggtg ctgggtggct cctcagccta tacctgggtc aggggctggg agatgcagaa 8040  
gacccaagag gacccaagct ccaaagaggg tgagaagagt gctattgggg tgtgagctc 8100  
ttcagggacc tgggactgaa cccaagtggg gcctacacag cactgaaggc ttcccatgga 8160  
gctagccagt gcggcctctg gcaatctgtg ttacatcctc ctgggaatat gatctaagag 8220  
gagccagggt ctttctctgt aatgtcagaa agctgccaaa tctcctgtct gcccatctt 8280  
gttttgggaa aaccctacca ggaatggcac ccctacctgc ctctcctag agcctgtcta 8340  
cctccatac atctctgggg ttgggaccag ctgacgcctt aaggggctgg attgatgaag 8400  
tgatgtctc tacacaaggt agatgggttg tgcctccact aatggaagg atttgggtga 8460  
ccccacacct ctgggatcca gggcaggtag agtagtagct taggtgctat taacatcagg 8520  
aacacctcag cctgcctttg aagggaaagt ggagcttggc caagggagga aatggccatt 8580  
ctgccctctt cagtgtggat gagtatggca gacctgttca tggcagctgc accctgggg 8640  
ggctgatac aaaaacttca cctctgcatt tcataattgc agctctagaa cgggggagag 8700  
ccacacatct ttacaggtt aagtaggtg atgagctcct ccgcagtccc taaccccagc 8760  
tttacctgcc tggcttccct tggcccagct acctagctgt actcccttct tgtactctc 8820  
tcttctcctg catggcctcc cccaacacct ccactctgcag gcaggaagt gagtccact 8880  
gtaacctctg ttcccatgac agagcccttt gaatacctga acccctcatg acagtaagag 8940  
acatttatgt tctctggggc tggggctgaa ggagcccact ggttctcact tagcctatct 9000  
ggctcctgtc aaaaaaaaa aaaaagaaaa aaaaaagca taaccaagt tactaagaac 9060  
agaagtgggt ttataacgt ctggggcagc aaagcccaga tgaagggacc catcgaccct 9120  
ctctgtccat atcctcagc tcagagaagta caggcaagct cctttaaacc tcatatagga 9180  
acactagcct cactcatgag ggttttactc catgacctgt caacctcaa gccttcaaca 9240  
tgaggactcc aacgtaaat tggggacaga agcactcaga ccatacccca gcaccacacc 9300  
ctcctaacct cagggtagct gtcatctctc tagtctctc tcttgggct ttagaacccc 9360  
catttctctg gggtaattgc tgatgttttt gtccctgtca taaaaagatg gagagactgt 9420  
gtccagcctt tgattctac ttccataaat cccaggttct aatgaagttt gtggggcctg 9480  
atgcctgag ttgtatgtga tttaataata aaaaagcaag atacagcatg tgtgtggact 9540  
gagtgagggc cacagggatc taaaagccaa gtgtgagggg acccagctac agcaggcagc 9600  
atcctgagcc tggaaatctc tcaggacaag aattctccat atacctacct actctgggga 9660  
gtaggtggcc agagttcaag cttcccttag taccaactac cactggctgt gctcttactg 9720  
aaggcagaca tggcactgag tgctgtccat ctgtcactca tctccacagc cattccta 9780  
gtgtgggtg ggagccaatc caaaaccca ttttcagata aggacacagg ctccagagag 9840  
cttgtgtgga gaaaagtgc agcagaattc agagagctgg gtctcctgca gcaacctgga 9900  
ctgcagcag ccacagtgt tgtcacacag cacatactca aaagaatgcc agccccctca 9960  
gcctagatg cctggccttt ctttcagatg aggaagagg tcaaagctgt tagcttgccc 10020  
accatgatg cacatacatg accaacagct tgagggaggg aggtactg tggctcccag 10080  
cctgagaggt gggacaccca aatgtattag gtccttgaat cagggtgac cttgtgattc 10140  
agtcactcct accagaatgc tggggaaatg ggatgccaaa ggcaaaggag gctttctaa 10200  
gtgtgggtga agataggcat ttctgcttcc atgtacacct gtgagcagag taggaaggcc 10260  
ctgtggagaa tatatccacc aaaccagtag ccctcctcctg cagtgggtga atactgccac 10320  
cctatacccc atgcaagc cagtgaacc acccaacca caacatctag agaaattaca 10380  
ggctaccta agcctctaaa ttgtggagaa actcgacatg cgcacgattc ctaacctgct 10440  
agcctagggt gcgggtgga taatttaagg aaactgggtt ttcttataga atcgaggct 10500  
ccatgaagtc accctgacaa gaggtcagca atagccagca gcagtggcta ctccaaagcc 10560  
tccagacaga gcaccctgtg aatgtacctt attctcacat ctgggtgtct ataggtgtga 10620  
ctgggtcaga tgtcaccag gccattgcaa tggccctta tggccatggg gtgttgggat 10680  
agcagccaag cagctcccat gctgagatac tgcctgcagt agactgatgg ataagaaaac 10740  
aaggcccaaa atgttttctt tccagacttg atcttcttct gttcaaaaaat gctgttttcc 10800  
cttaaacttg ccaaaccca ttgttttgca gttgagggaa ataaggcata gaaagattaa 10860  
aggaagtctc tgaggttaca gagcaaaagta ctggcttcac ctgaaataga cagggtgtgc 10920  
ctgatcctga tttgagctc 10939

<210> 17

<211> 33

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400>

10 atgcatgccca ccatgaaaa gctgaactc acc

33

<210> 18

<211> 28

ES 2 394 471 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 5 <400>  
 ggatcccagg ctttacactt tatgcttc 28  
 <210> 19  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400>  
 gctgtctgga gtactgtgca tctgc 25  
 15 <210> 20  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 20 <223> Cebador  
 <400>  
 ggaatgcagc ttctcaagg gactcgc 27  
 <210> 21  
 <211> 27  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400>  
 30 tgcacaggt cggagacgct gtcgaac 27  
 <210> 22  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador  
 <400>  
 gcactgtcc gagggcaaag gaatagc 27  
 <210> 23  
 40 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 45 <400>  
 tgtgctggga attgaacca ggac 24  
 <210> 24  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400>  
 ctactgtct gtgcttctt cc 22  
 <210> 25  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 60 <223> Cebador  
 <400>  
 ctcgactcgt ccctattagg caacagc 27  
 <210> 26  
 <211> 27  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador  
 <400>  
 tcagaggcag tggagcctcc agtcagc 27  
 5 <210> 27  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 10 <223> Anticuerpo modificado  
 <400>  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Glu Ser Phe  
 50 55 60  
 Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115  
 <210> 28  
 <211> 112  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Anticuerpo modificado  
 <400>  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ala Ser Glu Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 20 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 <210> 29  
 <211> 112  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Anticuerpo modificado  
 <400>  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ala Ser Glu Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu  
 100 105 110  
 30 <210> 30

ES 2 394 471 T3

<211> 327  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <400>

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110  
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140  
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205  
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240  
 5 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 275 280 285  
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 290 295 300  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 305 310 315 320  
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

<210> 31  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <400>

10

ES 2 394 471 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 32

<211> 328

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Anticuerpo modificado

<400>

ES 2 394 471 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 325

<210> 33

<211> 328

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Anticuerpo modificado

<400>

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

10

ES 2 394 471 T3

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80  
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95  
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110  
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125  
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140  
Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp  
145 150 155  
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175  
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190  
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205  
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220  
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu  
225 230 235 240  
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
245 250 255  
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270  
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
275 280 285  
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn  
290 295 300  
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320  
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
325

<210> 34

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Anticuerpo modificado

<400>

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30  
Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Glu Ser Phe  
50 55 60  
Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110  
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
115 120 125  
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
130 135 140  
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
145 150 155 160

10

ES 2 394 471 T3

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly  
 165 170 175  
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly  
 180 185 190  
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
 195 200 205  
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys  
 210 215 220  
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255  
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 260 265 270  
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285  
 Pro Arg Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300  
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320  
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335  
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350  
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380  
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415  
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440

<210> 35

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Anticuerpo modificado

<400>

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 115 120 125  
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
 130 135 140

10

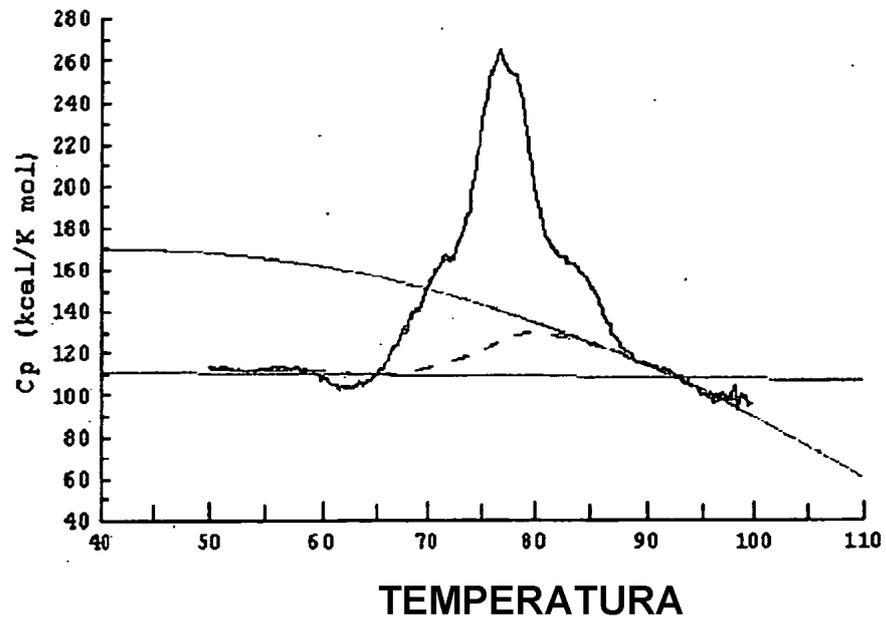
ES 2 394 471 T3

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly  
 165 170 175  
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly  
 180 185 190  
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
 195 200 205  
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys  
 210 215 220  
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255  
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 260 265 270  
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285  
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300  
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320  
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335  
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350  
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380  
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415  
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440

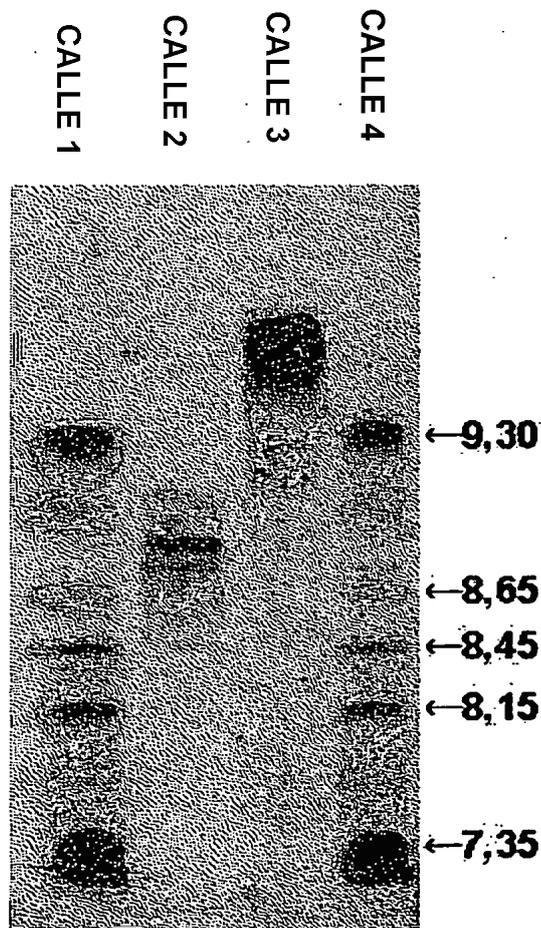
**REIVINDICACIONES**

- 5 **1.** Un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada mostrada en el SEQ ID NO: 27 y una región variable de la cadena ligera mostrada en el SEQ ID NO: 29.
- 2.** El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende una región constante de un anticuerpo humano.
- 10 **3.** El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, donde la región constante comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 32 o el SEQ ID NO: 33.
- 4.** El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el anticuerpo tiene un contenido reducido de fucosa anclada a la región Fc del anticuerpo.
- 15 **5.** Una composición que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 6.** Un agente anticanceroso que comprende como ingrediente activo el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 **7.** El agente anticanceroso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el cáncer es cáncer de hígado.
- 8.** Un ácido nucleico que codifica un polipéptido para el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 25 **9.** Una célula anfitriona que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8.
- 10.** La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 9, donde la célula anfitriona es una célula animal carente de transportador de fucosa, una célula animal con la fucosil-transferasa suprimida, o una célula animal en la cual está modificada una modificación de la cadena de azúcar ramificada compleja.
- 30 **11.** Un método para preparar un anticuerpo que comprende cultivar la célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10 y recuperar un polipéptido del cultivo celular.
- 35 **12.** Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un método para el tratamiento del cáncer.
- 13.** Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde el cáncer es cáncer de hígado.

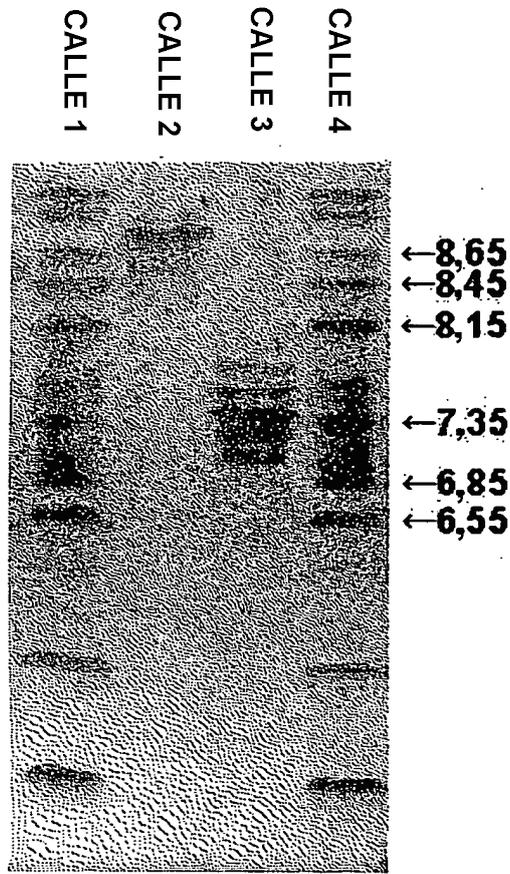
**【FIG. 1】**



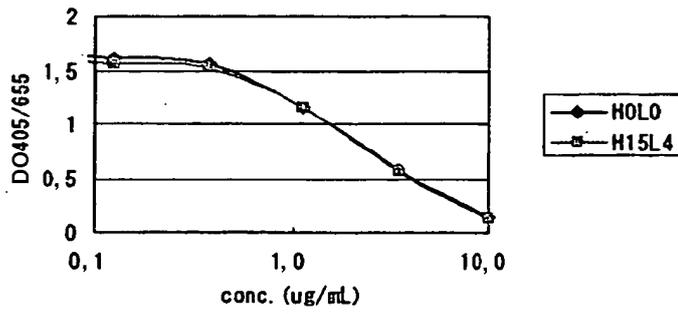
**【FIG. 2】**



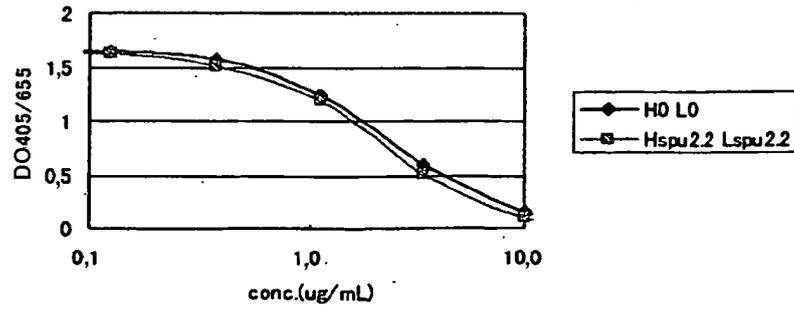
**【FIG. 3】**



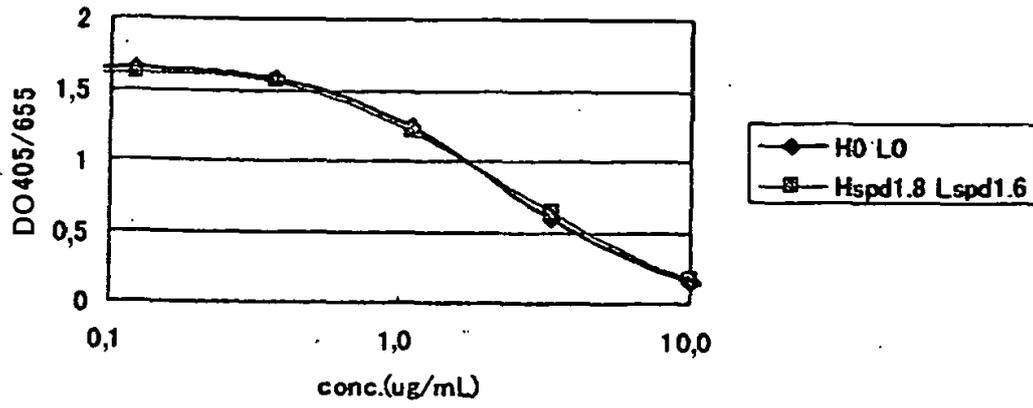
**【FIG. 4】**



**【FIG. 5】**

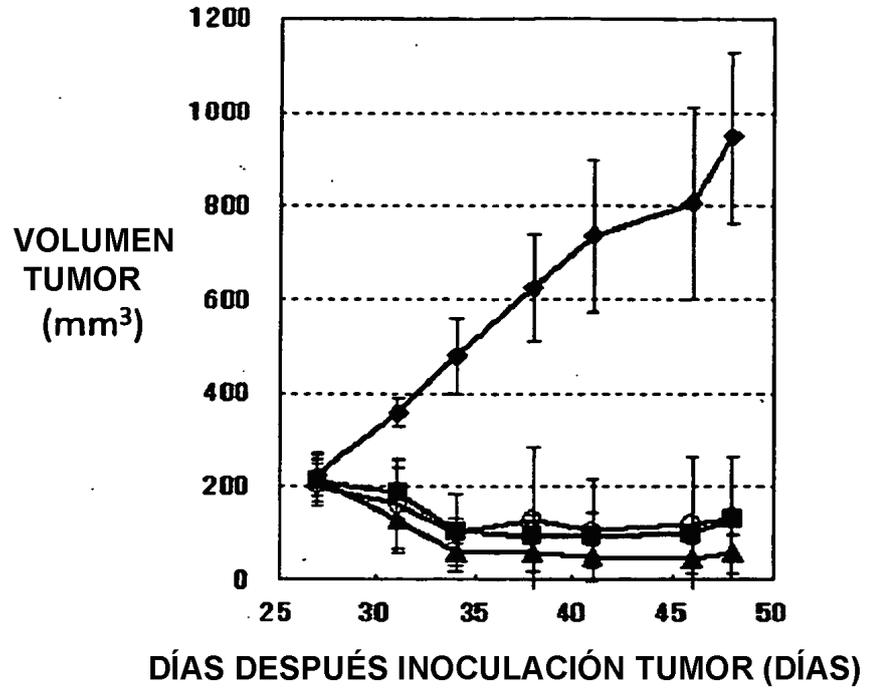


**【FIG. 6】**

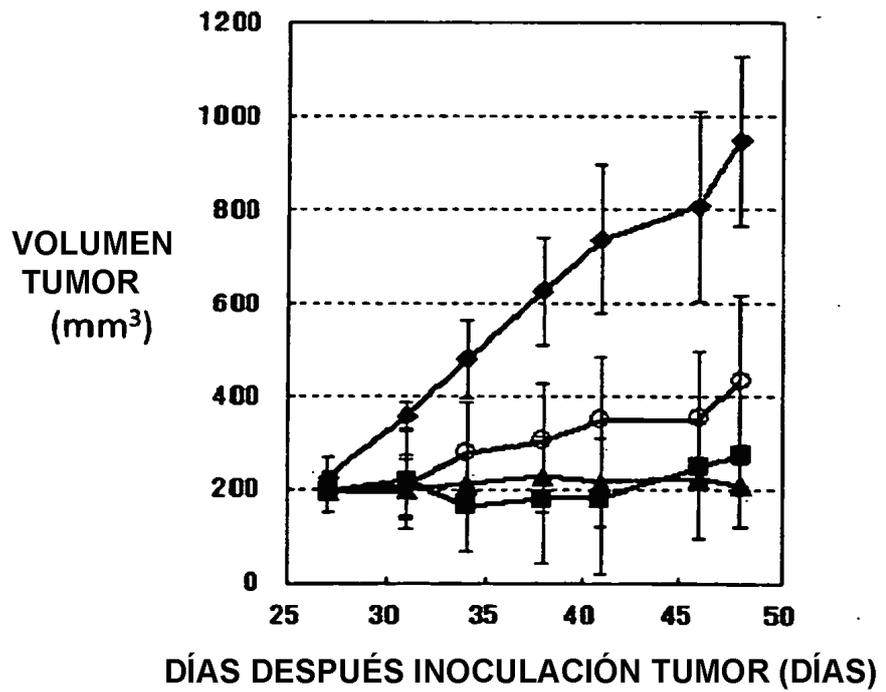


**[FIG. 7]**

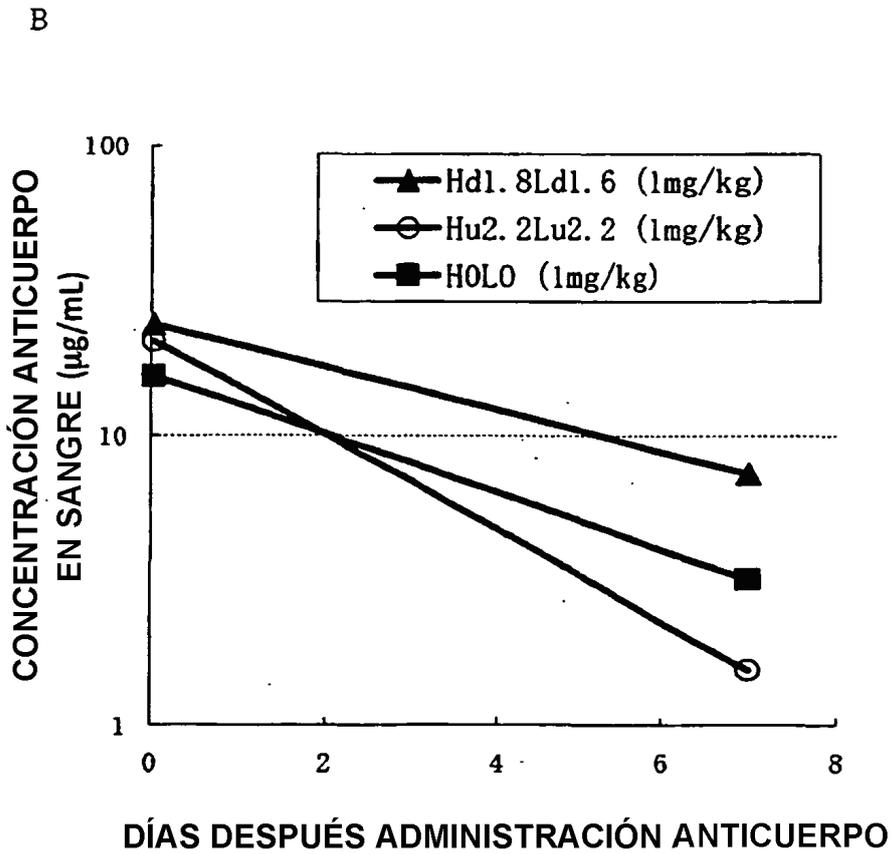
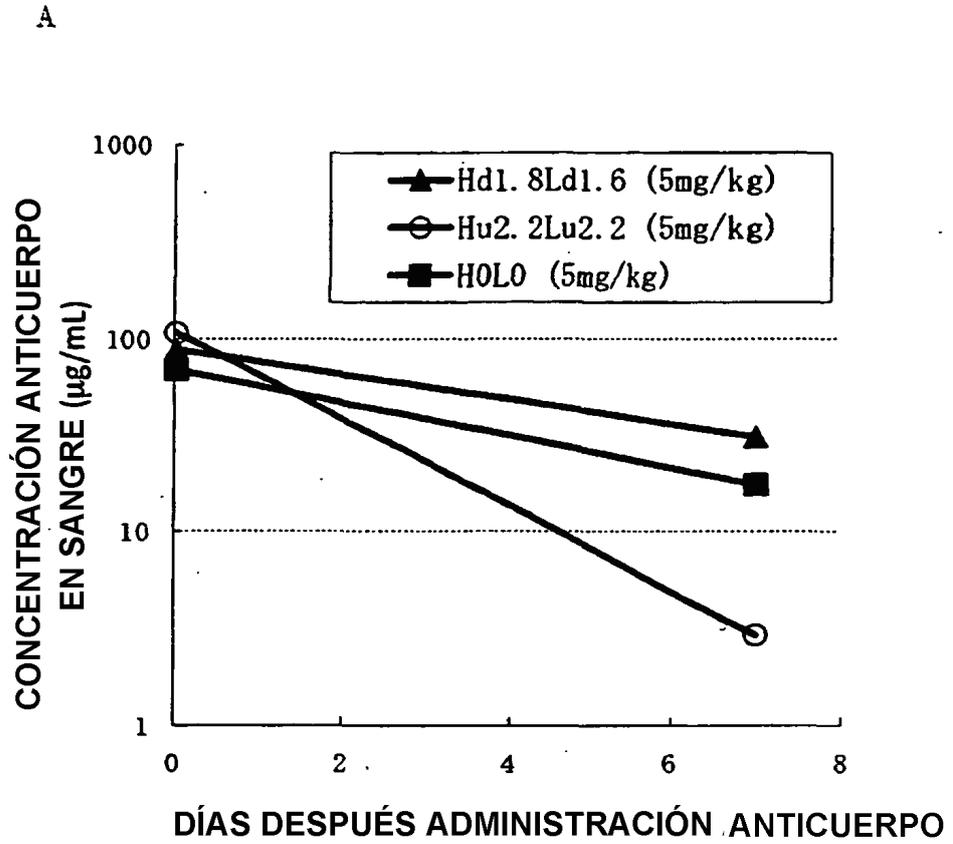
A



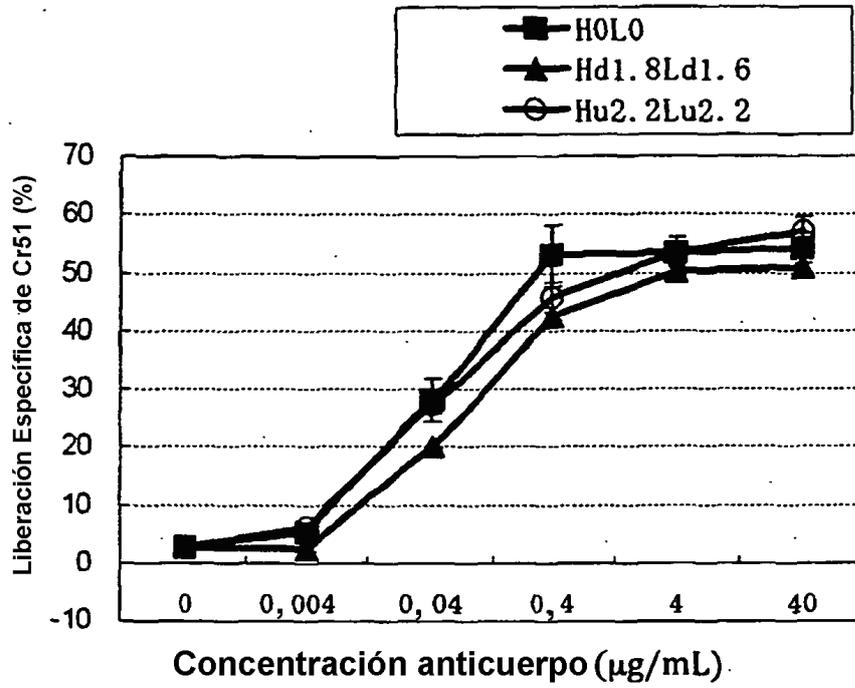
B



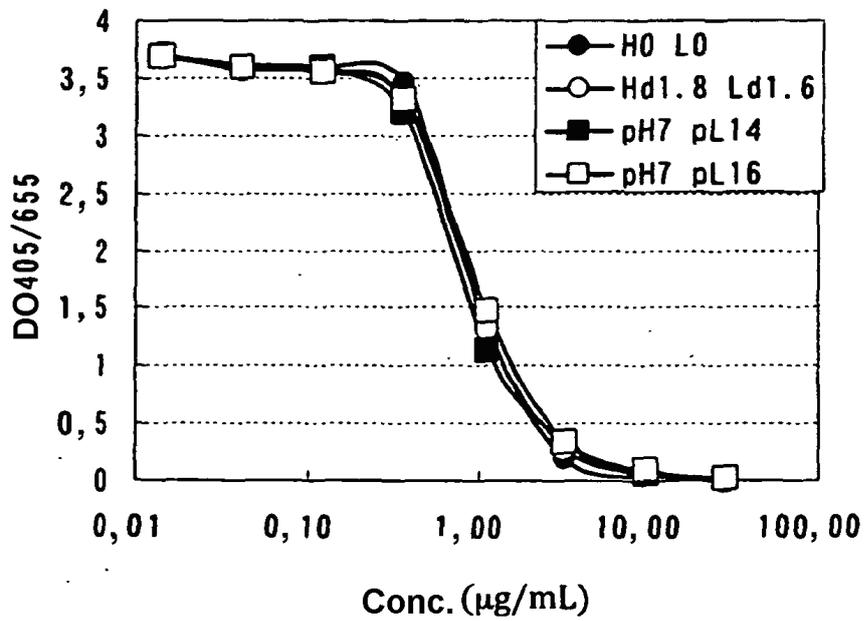
**【FIG. 8】**



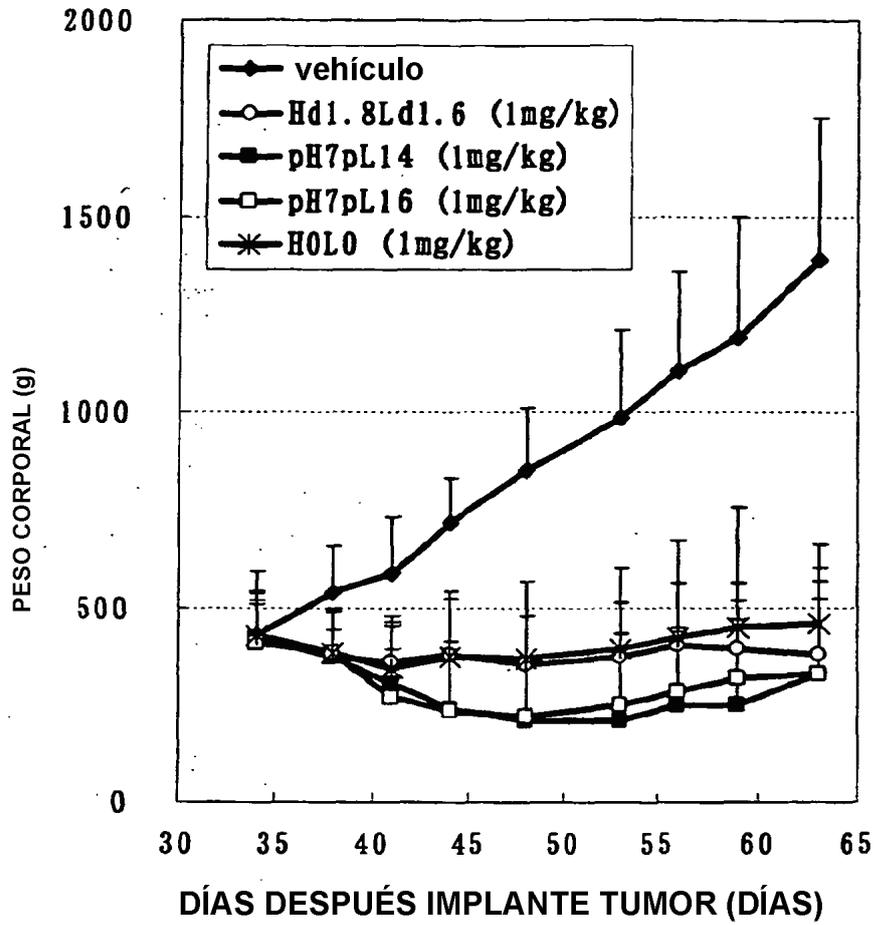
**【FIG. 9】**



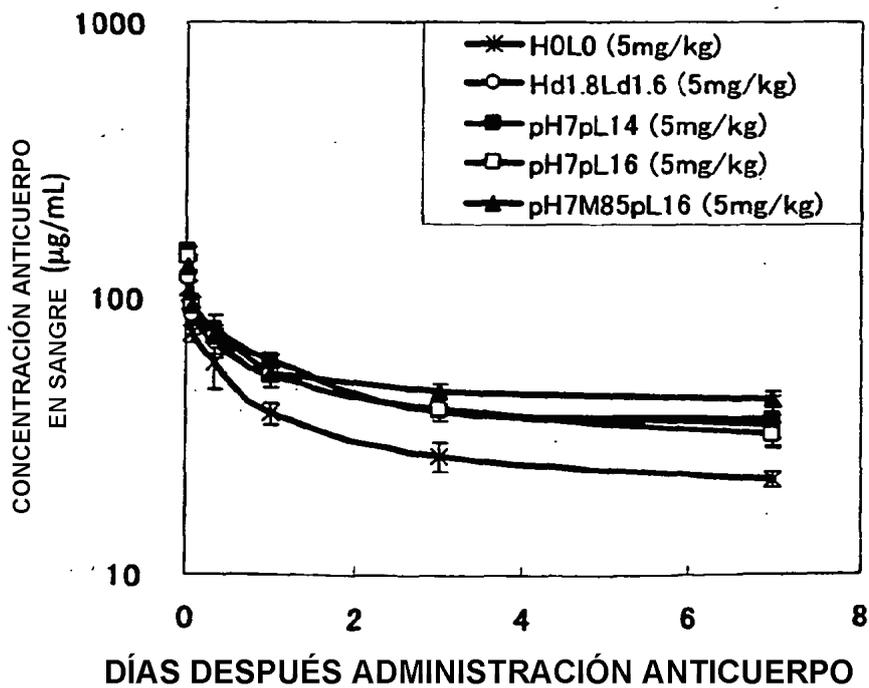
**【FIG. 10】**



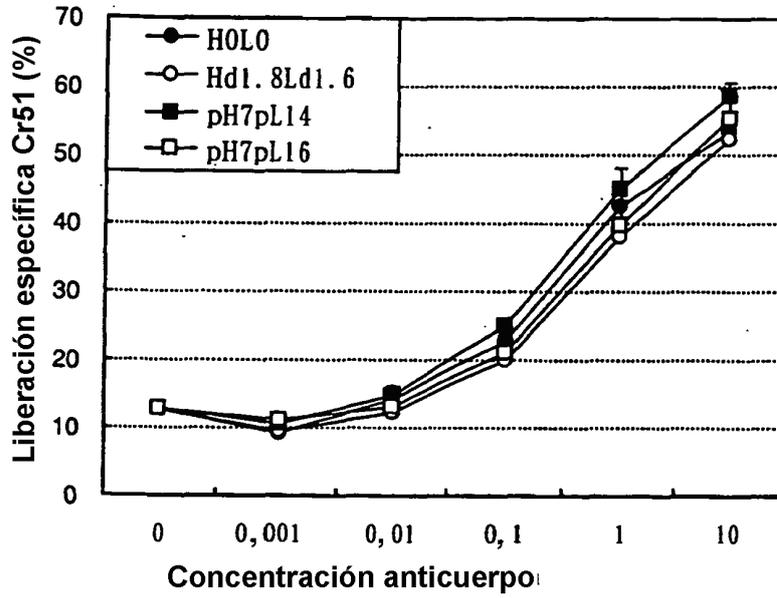
**[FIG. 11]**



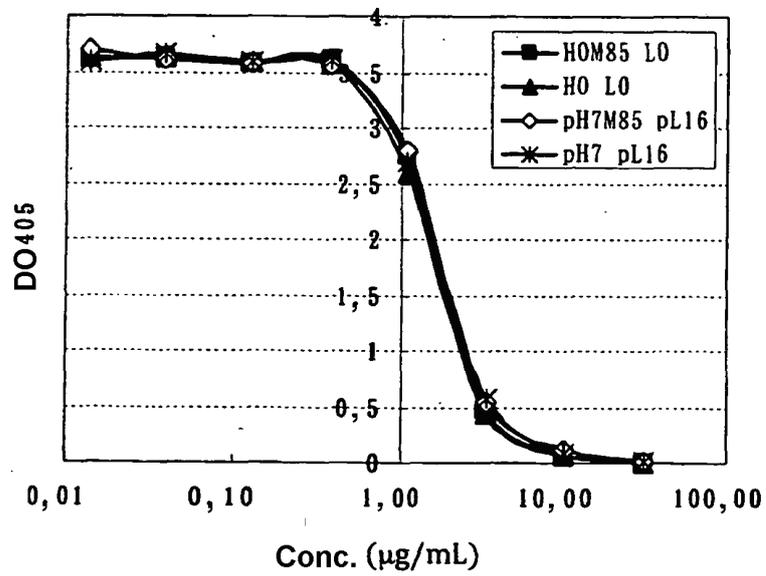
**[FIG. 12]**



【FIG. 13】



【FIG. 14】



**【FIG. 15】**

