

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 028**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/06** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2002 E 10003378 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 2208784**

54 Título: **Inhibidores de la proliferación celular que contienen anticuerpo anti-glicano 3**

30 Prioridad:

**22.06.2001 JP 2001189443**

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

**25.03.2013**

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)  
5-1, Ukima 5-chome Kita-ku  
Tokyo 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

**ABURATANI, HIROYUKI;  
NAKAMURA, TETSUO y  
TSUCHIYA, MASAYUKI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 399 028 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**

Inhibidores de la proliferación celular que contienen anticuerpo anti-glipicano 3.

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un inhibidor del crecimiento celular que contiene un anticuerpo anti-glipicano 3 como ingrediente activo.

**Antecedentes de la invención**

10 Se ha informado de que la familia de los glipicanos esta presente como una nueva familia de proteoglicanos de heparán sulfato que están presentes en las superficies celulares. Hasta la fecha, se ha informado sobre los 5 tipos de glipicanos (glipicano 1, glipicano 2, glipicano 3, glipicano 4 y glipicano 5) como miembros de la familia de los glipicanos. Estos miembros de la familia tienen las proteínas nucleares de tamaño uniforme (aproximadamente 60 kDa), comparten secuencias de cisteína específicas y bien conservadas, y se unen a las membranas celulares a través de anclas de glicosil fosfatidil inositol (GPI).

15 Se ha identificado un gen "Dally" (con "división anormalmente retrasada") por medio de la selección de genes de una variante de *Drosophila melanogaster* que tiene un patrón de división celular anormal en el desarrollo del sistema nervioso central. Se sabe que el ADNc de "Dally" representa un marco de lectura abierto (ORF) que codifica un producto que tiene una secuencia que muestra homología (una homología del 24 al 26%) con un proteoglicano transmembrana (GRIP) de un vertebrado que contiene todas las características de un glipicano. Se ha sugerido que el gen dally interviene en la regulación del mecanismo del receptor de dpp (decapentaplegia). Esto sugiere que el glipicano de un mamífero puede regular la transducción de señales entre TGF y BMP. Se ha sugerido  
20 específicamente que el glipicano puede funcionar como un receptor común para algunos de los factores de crecimiento de unión a heparina (por ejemplo, EGF, PDGF, BMP2 y FGF).

25 Se ha aislado glipicano 3 como un transcrito en condiciones de regulación del desarrollo en intestino de rata (Filmus, J., Church, J. G., y Buick, R.n. (1988) *Mol. Cell Biol.*8, 4243-4249), y después se ha identificado como OCT-5, un proteoglicano de heparán sulfato unido a GPI de la familia de los glipicanos, que tiene una proteína nuclear con un peso molecular de 69 kDa (Filmus, J., Shi, W., Wong, Z. M y Wong, M.J. (1995) *Biochem. J.* 311, 561565). También en seres humanos se ha aislado un gen que codifica glipicano 3 como MXR-7 a partir de una línea celular de cáncer gástrico humano (Hermann Lage et al., *Gene* 188 (1997) 151-156). Se ha notificado que el glipicano 3 forma un complejo de proteína-proteína con un factor de crecimiento 2 de tipo insulínico para regular la acción del factor de crecimiento (Pilia, G. et al. (1996) *Nat. Genet.* 12, 241-247). Este informe sugiere que el glipicano 3 no siempre  
30 interacciona con el factor de crecimiento que tiene la cadena de heparán sulfato.

Existe un informe que sugiere que el glipicano 3 puede utilizarse como un marcador de cáncer hepático (Hey-Chi Hsu et al., *CANCER RESEARCH* 57, 5179-5184 (1997). Sin embargo, no hay ningún descubrimiento que indique una relación clara entre el glipicano 3 y la proliferación de células de carcinoma.

35 Además, también se ha sugerido que el glipicano puede funcionar como un receptor para endostatina que puede actuar como un inhibidor de la vascularización (*Molecular Cell* (2001), 7, 811-822). Sin embargo, todavía no se ha esclarecido la relación entre esta función y la proliferación celular.

Como se ha descrito más arriba, se ha sugerido la implicación del glipicano 3 en la proliferación celular. Sin embargo, no se conoce el mecanismo de proliferación celular y similar, y nunca se ha intentado la aplicación del glipicano 3 para la regulación de la proliferación celular.

**40 Compendio de la Invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un inhibidor del crecimiento celular que contenga un anticuerpo anti-glipicano 3 como ingrediente activo.

45 Como resultado de estudios profundos, los autores de la presente invención han completado la presente invención por medio del descubrimiento de que el anticuerpo anti-glipicano 3 ejerce actividad inhibidora de la proliferación celular por ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) y actividad CDC (citotoxicidad dependiente de complemento). Además, también se ha pronosticado que los anticuerpos anti-glipicano 3 ejercen actividad inhibidora de la proliferación celular por inhibición de la acción de un factor de crecimiento. Además, los anticuerpos anti-glipicano 3 también pueden ejercer actividad inhibidora de la proliferación celular por medio de la unión a sustancias citotóxicas tales como un isótopo radiactivo, un agente quimioterapéutico o una toxina derivada de bacterias.

50 La presente invención es como sigue:

(1) Un anti-glipicano 3 para uso en el tratamiento del cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, leucemia, linfoma y cáncer de páncreas.

(2) Un anticuerpo de acuerdo con el apartado (1), en donde el cáncer es cáncer de pulmón.

(3) Un anticuerpo de acuerdo con los apartados (1) o (2) en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

5 (4) Un anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los apartados (1) a (3), en donde el anticuerpo tiene una actividad citotóxica.

(5) Un anticuerpo de acuerdo con el apartado (4), en donde la actividad citotóxica es citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

(6) Un anticuerpo de acuerdo con el apartado (4), en donde la actividad citotóxica es citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

10 (7) El uso de un anticuerpo anti-glipicano 3 en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento del cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, leucemia, linfoma y cáncer de páncreas.

En la invención, el anti-glipicano 3 puede actuar como un inhibidor del crecimiento celular.

15 El anti-glipicano 3 puede tener actividad citotóxica. La actividad citotóxica puede ser dependiente de anticuerpos citotoxicidad mediada por células (ADCC) o actividad de complemento-dependiente de la actividad de citotoxicidad (CDC).

20 El anticuerpo anti-glipicano 3 puede actuar como inhibidor del crecimiento celular de uno cualquiera de los apartados (1) a (3), en donde las células son células de carcinoma. Las células pueden seleccionarse del grupo que consiste en células de cáncer de pulmón, células de cáncer de colon, células cancerosas mamarias, células de cáncer de próstata, células de leucemia, células de linfoma y células de cáncer de páncreas.

En un caso, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otro caso, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

La presente invención se describirá en detalle a continuación.

25 Los ejemplos del anticuerpo anti-glipicano 3 para su uso en la presente invención incluyen un anticuerpo conocido tal como un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano (documento WO 96/33735), un anticuerpo quimérico (Publicación de la Patente JP (Kokai) N° 4-228089 A (1992)) o un anticuerpo de ratón, así como anticuerpos de la presente invención. Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal y preferiblemente es un anticuerpo monoclonal.

30 El anticuerpo anti-glipicano 3 que se usa en la presente invención puede tener cualquier origen, puede ser de cualquier tipo (monoclonal o policlonal) y puede estar en cualquier forma, siempre que sea capaz de inhibir la proliferación celular.

#### 1. Anticuerpo anti-glipicano 3

35 El anticuerpo anti-glipicano 3 que se usa en la presente invención puede obtenerse por medios conocidos como un anticuerpo monoclonal o policlonal. Un anticuerpo anti-glipicano 3 particularmente preferido usado en la presente invención es un anticuerpo monoclonal procedente de un mamífero. Los ejemplos del anticuerpo monoclonal procedente de un mamífero incluyen un anticuerpo producido por un hibridoma y un anticuerpo producido por un hospedador transformado usando un vector de expresión que contiene el gen del anticuerpo por técnicas de ingeniería genética. Este anticuerpo se une a glipicano 3 para inhibir la proliferación celular.

40 Un ejemplo de dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal producido por el clon de hibridoma de la presente invención.

#### 2. Hibridoma productor de anticuerpos

45 Un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales puede prepararse básicamente usando técnicas conocidas tales como las que se indican a continuación. Es decir, el hibridoma puede prepararse realizando inmunización usando glipicano 3 como inmunógeno de acuerdo con un método de inmunización convencional, haciendo que los inmunocitos obtenidos de esta manera se fusionen con células parentales conocidas mediante un método de fusión celular convencional y después seleccionando células productoras de anticuerpos monoclonales por un método de selección convencional.

En concreto, se pueden preparar anticuerpos monoclonales como se indica a continuación.

50 En primer lugar se obtiene glipicano 3 humano para utilizarlo como inmunógeno para obtener anticuerpos expresando el gen de glipicano 3 (MXR7) (secuencia de aminoácidos) como se describe por Lage, H. et al (Gene

188 (1997), 151-156). En concreto, la secuencia génica que codifica glipicano 3 se inserta en un sistema de vector de expresión conocido, se utiliza para transformar una célula hospedadora apropiada y a continuación se purifica una proteína glipicano 3 humana diana humana por un método conocido a partir de las células hospedadoras o del sobrenadante del cultivo.

- 5 A continuación, esta proteína glipicano 3 purificada se usa como un inmunógeno. Como alternativa, el péptido parcial de glipicano 3 se puede utilizar como antígeno de sensibilización. En este momento, el péptido parcial puede obtenerse por síntesis química a partir de la secuencia de aminoácidos del glipicano 3 humano.

10 El anticuerpo anti-glipicano 3 inhibe la actividad de proliferación celular con la acción ADCC, la acción CDC y la actividad de un factor de crecimiento. Además, el anticuerpo anti-glipicano 3 inhibe la proliferación celular por unión a una sustancia citotóxica tal como un radioisótopo, un agente quimioterapéutico o una toxina procedente de bacterias. Por lo tanto, en la presente invención, un epítipo presente en una molécula de glipicano 3 que se reconoce por el anticuerpo anti-glipicano 3 no está limitado a un epítipo particular. El anticuerpo anti-glipicano 3 puede reconocer cualquier epítipo, siempre que el epítipo esté presente en una molécula de glipicano 3. Por consiguiente, como antígeno para preparar el anticuerpo anti-glipicano 3 de la presente invención puede usarse cualquier fragmento, siempre que contenga el epítipo de una molécula de glipicano 3.

15 El mamífero que se va a inmunizar con un inmunógeno no está limitado específicamente y se selecciona preferiblemente considerando la compatibilidad con la célula parental que se va a utilizar para la fusión celular. Por ejemplo, generalmente se usan roedores tales como ratones, ratas, hámsteres, conejos o monos.

20 Los animales se inmunizan con un inmunógeno de acuerdo con un método conocido. Por ejemplo, la inmunización se realiza por un método general en el que en un mamífero se inyecta un inmunógeno por vía intraperitoneal o subcutánea. En concreto, un inmunógeno se diluye o se suspende en un volumen apropiado de PBS (solución salina tamponada con fosfato), solución salina fisiológica o similar; si es necesario, se mezcla con el producto un volumen apropiado de un adyuvante convencional tal como coadyuvante completo de Freund; se realiza la emulsión; y a continuación la solución se administra a mamíferos varias veces cada 4 a 21 días. Además, también se puede usar un vehículo apropiado para la inmunización con un inmunógeno.

25 Los mamíferos se inmunizan como se ha descrito anteriormente y a continuación se confirma el aumento del título del anticuerpo deseado en el suero. Posteriormente, se recogen los inmunocitos de los mamíferos y después se someten a fusión celular. Un inmunocito preferido es concretamente un esplenocito.

30 Como célula acompañante que se va a fusionar con el inmunocito anterior se usa una célula de mieloma de mamífero. Los ejemplos de una línea celular de una célula de mieloma que se usa preferiblemente en la presente memoria incluyen diversas líneas celulares conocidas tales como P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G. y Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270), FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21), S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323) y R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133).

35 La fusión celular de los inmunocitos anteriores con células de mieloma se puede realizar básicamente de acuerdo con un método conocido, por ejemplo, el método de Kohler y Milstein et al (Kohler, G. y Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46).

40 Más concretamente, la fusión celular anterior se realiza en una solución de cultivo de nutrición convencional en presencia, por ejemplo, de un acelerador de la fusión celular. Como acelerador de la fusión celular se usa, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), virus hemaglutinante de Japón (HVJ) o similares. Si se desea, también puede usarse un adyuvante tal como dimetilsulfóxido mediante adición para mejorar adicionalmente la eficacia de la fusión.

45 Puede establecerse para su uso en la presente memoria cualquier proporción entre inmunocitos y células de mieloma. Por ejemplo, es preferible que el número de inmunocitos sea de 1 a 10 veces mayor que el de las células de mieloma. En cuanto a la solución de cultivo que se va a utilizar para la fusión celular anterior puede usarse, por ejemplo, una solución de cultivo RPMI1640 o una solución de cultivo MEM que es apropiada para el crecimiento de la línea celular de mieloma anterior, u otras soluciones de cultivo convencionales que se usan para este tipo de cultivo celular. Además, puede usarse un líquido sérico tal como suero bovino fetal (FCS) en combinación con dichas soluciones.

50 La fusión celular se realiza mezclando suficientemente ciertas cantidades de los inmunocitos anteriores y células de mieloma en la solución de cultivo anterior, añadiendo una solución de PEG (por ejemplo, con un peso molecular medio de aproximadamente 1000 a 6000) (una concentración general del 30 al 60% (p/v)) precalentada a aproximadamente 37°C y después mezclando la solución hasta formar las células fusionadas diana (hibridomas). Con posterioridad, se añade sucesivamente una solución de cultivo apropiada y después se repite una etapa de eliminación del sobrenadante por centrifugación para retirar de esta manera los reactivos para la fusión celular o similares que no son favorables para el crecimiento de los hibridomas.

Los hibridomas obtenidos de esta manera se seleccionan cultivándolos en una solución de cultivo selectiva convencional tal como una solución de cultivo HAT (una solución de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo en la solución de cultivo HAT anterior se continúa durante un periodo de tiempo suficiente para que mueran las células (células no fusionadas) distintas de los hibridomas diana (normalmente, de varios días a varias semanas). Posteriormente, se realiza un método de dilución limitante convencional para seleccionar y generar hibridomas monoclonales que produzcan un anticuerpo diana.

Además de un método con el que se obtienen los hibridomas anteriores inmunizando animales no humanos con antígenos, también pueden obtenerse anticuerpos humanos deseados que tienen actividad de unión a glipicano 3 (véase la Publicación de Patente japonesa (Kokoku) N° 1-59878 B (1989)) sensibilizando linfocitos humanos in vitro con glipicano 3, y haciendo que los linfocitos sensibilizados se fusionen con las células de mieloma de origen humano que tienen un potencial de división permanente. Por otra parte, el glipicano 3 como antígeno se administra a un animal transgénico que tiene todos los repertorios de un gen de anticuerpo humano para obtener células productoras de anticuerpo anti-glipicano 3 y después pueden obtenerse los anticuerpos humanos para el glipicano 3 a partir de las células productoras de anticuerpo anti-glipicano 3 (véanse las Publicaciones de Patente Internacionales Núm. WO 94/25585, WO 93/12227, WO92/03918 y WO 94/02602).

Los hibridomas preparados de esta manera que producen anticuerpos monoclonales pueden cultivarse con pases sucesivos en una solución de cultivo convencional o pueden almacenarse durante un largo periodo en nitrógeno líquido.

Un ejemplo de un método que se emplea para obtener anticuerpos monoclonales a partir de los hibridomas implica cultivar los hibridomas y obtener anticuerpos monoclonales en el sobrenadante de cultivo de acuerdo con un método convencional. Otro método implica administrar los hibridomas a mamíferos que son compatibles con los hibridomas para hacer que proliferen y para obtener anticuerpos monoclonales en el líquido ascítico. El primer método es adecuado para obtener anticuerpos de alta pureza. Por otro lado, el segundo método es adecuado para la producción de anticuerpos en grandes cantidades.

### 3. Anticuerpo recombinante

Un anticuerpo monoclonal que se puede usar en la presente invención es un anticuerpo monoclonal recombinante que se prepara conando el gen de anticuerpo del hibridoma, incorporando el gen en un vector apropiado, introduciendo el vector en un hospedador y después haciendo que el hospedador produzca los anticuerpos monoclonales recombinantes por técnicas de ingeniería genética (por ejemplo, véase Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 1990). En concreto, el ARNm que codifica la región variable (V) de un anticuerpo anti-glipicano 3 se aísla a partir de un hibridoma que produce el anticuerpo anti-glipicano 3. El ARNm se aísla por un método conocido tal como un método de ultracentrifugación de guanidina (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299) o un método AGPC (Chomczynski, P et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159), preparándose de esta manera ARN total. Después, se prepara el ARNm diana usando un kit de purificación de ARNm (Pharmacia) o similar. Además, el ARNm también puede prepararse directamente usando un kit de purificación de ARNm QuickPrep (Pharmacia).

El ADNc de la región V del anticuerpo se sintetiza usando la transcriptasa inversa del ARNm obtenido de esta manera. EL ADNc se sintetiza usando un kit de síntesis de ADNc de primera cadena de transcriptasa inversa AMV (SEIKAGAKU CORPORATION) o similar. Además, para sintetizar y amplificar el ADNc pueden emplearse, por ejemplo, un equipo 5-Ampli FINDER RACE (Clontech) y el método 5-RACE que usa PCR (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002, Belyavsky, A. et al. Nucleic Acids Res (1989) 17, 2919-2932).

Se purifica un fragmento de ADN diana a partir del producto de PCR obtenido de esta manera y a continuación se liga al ADN del vector. Además, se prepara un vector recombinante a partir del producto y después el vector se introduce en Escherichia coli o similar de forma consecutiva, posteriormente se seleccionan las colonias preparándose de esta forma el vector recombinante deseado. La secuencia de nucleótidos del ADN diana después se confirma mediante un método conocido, tal como un método de terminación de cadena con didesoxinucleótido.

Después de obtener una cadena de ADN que codifica la región V del anticuerpo anti-glipicano 3 diana, este ADN se incorpora en un vector de expresión de contiene un ADN que codifica la región constante (región C) del anticuerpo deseado.

Para producir los anticuerpos anti-glipicano 3 usados en la presente invención, el gen del anticuerpo se incorpora en un vector de expresión de manera que el gen se exprese bajo la regulación de la región control de expresión del gen, por ejemplo, un potenciador y un promotor. Después, se transforma una célula hospedadora con el vector de expresión, haciendo que el hospedador exprese el anticuerpo.

Un gen de anticuerpo se puede expresar incorporando un ADN que codifica la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo o un ADN que codifica la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo por separado en vectores de expresión, y después transformando simultáneamente una célula hospedadora con los vectores; o incorporando ADN que codifican la cadena-H y la cadena-L en un solo vector de expresión y luego transformando una célula hospedadora

con el vector (véase el documento WO 94/11523).

Además de la célula hospedadora anterior, también puede usarse un animal transgénico para producir un anticuerpo recombinante. Por ejemplo, un gen de anticuerpo se inserta en un gen que codifica una proteína (por ejemplo, caseína  $\beta$  de cabra) que se produce exclusivamente en la leche, preparándose de esta manera como un gen fusionado. Un fragmento de ADN que contiene el gen fusionado en el que se ha insertado el gen del anticuerpo se inyecta en un embrión de cabra y luego dicho embrión se introduce en una cabra hembra. Los anticuerpos deseados pueden obtenerse a partir de la leche producida por la cabra transgénica o la descendencia nacida de la cabra que ha aceptado el embrión. Además, para aumentar el volumen de leche que contiene el anticuerpo deseado producido por la cabra transgénica, pueden administrarse hormonas para la cabra transgénica (Ebert, K. M. et al., *Bio/Technology* (1994) 12, 699-702).

#### 4. Anticuerpo alterado

En la presente invención, además del anticuerpo anterior, pueden usarse anticuerpos recombinantes de genes alterados artificialmente tales como anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados para, por ejemplo, reducir la heteroantigenicidad contra un ser humano. Estos anticuerpos alterados pueden producirse usando un método conocido.

Se pueden obtener anticuerpos quiméricos ligando el ADN que codifica la región V del anticuerpo anterior a un ADN que codifica la región C del anticuerpo humano, incorporando el producto en un vector de expresión y después introduciendo el vector en un hospedador para hacer que el hospedador produzca los anticuerpos. Usando este método conocido, pueden obtenerse anticuerpos quiméricos útiles en la presente invención.

Los anticuerpos humanizados también se denominan anticuerpos humanos reformados, que se preparan injertando una CDR (región determinante de complementariedad) de un mamífero distinto de un ser humano, tal como un ratón, en la CDR de un anticuerpo humano. También se conoce la técnica general de recombinación génica (véase la Publicación de Solicitud de Patente Europea Núm. EP 125023 y el documento WO 96/02576).

En concreto, la secuencia de ADN se sintetiza por el método de PCR usando como cebadores varios oligonucleótidos que se han preparado para tener una parte que solapa con las regiones terminales tanto de la CDR de anticuerpo de ratón como de la región flanqueante (FR) de un anticuerpo humano (véase el método descrito en el documento WO 98/133388).

Se selecciona la región flanqueante ligada a la CDR que tiene un buen sitio de unión a antígeno. Si es necesario se pueden sustituir aminoácidos de la región flanqueante en la región variable del anticuerpo de manera que la CDR de un anticuerpo humano reformado forme un sitio de unión al antígeno adecuado (Sato, K. et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856).

Se utilizan regiones de un anticuerpo humano para las regiones C de un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado. Por ejemplo, para la cadena H pueden usarse Cy1, Cy2, Cy3 o Cy4C, y para la cadena L, Ck o Cl. Además, para mejorar la estabilidad de los anticuerpos o la producción de los mismos, puede modificarse la región C del anticuerpo humano.

Un anticuerpo quimérico consiste en la región variable de un anticuerpo procedente de un mamífero distinto de un ser humano y una región constante procedente de un anticuerpo humano. Sin embargo, un anticuerpo humanizado consiste en la CDR de un anticuerpo procedente de un mamífero distinto de un ser humano y la región flanqueante y región C procedentes de un anticuerpo humano. Puesto que el anticuerpo humanizado se diseña de tal manera que la antigenicidad sea baja en el cuerpo humano, éste es útil como ingrediente activo de un agente terapéutico de la presente invención.

#### 5. Anticuerpo modificado

El anticuerpo usado en la presente invención no está limitado a la molécula entera siempre que se una al glicoproteína 3 y suprima la proliferación celular, y puede ser un fragmento del anticuerpo o un producto modificado del mismo. Se incluyen tanto un anticuerpo bivalente como un anticuerpo monovalente. Los ejemplos del fragmento de un anticuerpo incluyen Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fab/c que tiene un Fab y un Fc completo y un Fv monocatenario (svFv) donde el Fv de la cadena H o la cadena L se une con un enlazador apropiado. En concreto, se sintetiza un fragmento de anticuerpo tratando el anticuerpo con una enzima tal como papaína o pepsina, o se construyen genes que codifican estos fragmentos de anticuerpo, los genes se introducen en vectores de expresión y después los genes se expresan por células hospedadoras adecuadas (véase, por ejemplo, Co., M.S. et al., *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976, Better, M. & Horwitz, A. H. *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Plueckthun, A. & Skerra, A. *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Lamoyi, E., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 652-663, Rousseaux, J. et al., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 663-669 y Bird, R. E. et al., *TIBTECH* (1991) 9, 132137).

Se obtiene un scFv por unión de la región V de la cadena H y la región V de la cadena L de anticuerpos. En los scFv, la región V de la cadena H y la región V de la cadena L se unen a través de un enlazador, o preferiblemente

un enlazador peptídico (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883). La región V de la cadena H y la región V de la cadena L de scFv pueden proceder de cualquiera de los anticuerpos descritos en esta memoria descriptiva. Como enlazador peptídico para unir las regiones V, por ejemplo, se usa cualquier péptido monocatenario que comprende de 12 a 19 residuos de aminoácidos.

5 Un ADN que codifica scFv puede obtenerse como se indica a continuación. La amplificación se realiza por el método de PCR usando como moldes el ADN completo o las porciones de ADN que codifican secuencias de aminoácidos deseadas (de un ADN que codifica la cadena H o la región V de la cadena H del anticuerpo anterior y un ADN que codifica la cadena L o la región V de la cadena L), y usando un par de cebadores que especifica los dos extremos. Después se realiza la amplificación mediante el uso combinado de un ADN que codifica una parte del enlazador  
10 peptídico y un par de cebadores que especifica que los dos extremos se unan respectivamente a la cadena H y la cadena L.

Además, una vez que se ha preparado un ADN que codifica scFv, pueden obtenerse vectores de expresión que contienen los ADN y hospedadores transformados con los vectores de expresión de acuerdo con el método convencional. Además, mediante el uso del hospedador, pueden obtenerse scFv de acuerdo con el método  
15 convencional.

Estos fragmentos de anticuerpo pueden producirse usando hospedadores obteniendo los genes de los mismos de una forma similar al método anterior y causando después la expresión de los genes. El "anticuerpo" de la presente invención también incluye estos fragmentos de anticuerpo.

Como anticuerpo modificado, pueden usarse anticuerpos anti-glipicano unidos al polietilenglicol (PEG) o una de  
20 diversas moléculas tales como una sustancia citotóxica. El "anticuerpo" de la presente invención también comprende estos anticuerpos modificados. Dicho anticuerpo modificado se puede obtener modificando químicamente al anticuerpo obtenido. Además, ya se ha establecido en la técnica un método de modificación de anticuerpos.

Además, el anticuerpo usado en la presente invención puede ser un anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico puede tener sitios de unión a antígeno que reconocen un epítipo diferente en una molécula de glipicano  
25 3. Como alternativa, un sitio de unión a antígeno puede reconocer glipicano 3 y el otro sitio de unión a antígeno puede reconocer una sustancia citotóxica tal como un agente quimioterapéutico, toxinas derivadas de células, una sustancia radiactiva o similar. En este caso, una sustancia citotóxica se deja actuar directamente en una célula que expresa glipicano 3 para dañar específicamente las células tumorales, de manera que pueda reprimirse la proliferación de las células tumorales. Un anticuerpo biespecífico puede prepararse por unión de pares H-L de dos  
30 tipos de anticuerpos, y también puede obtenerse por fusión de hibridomas que producen diferentes anticuerpos monoclonales para preparar células fusionadas productoras de anticuerpos biespecíficos. Además, un anticuerpo biespecífico también puede prepararse por técnicas de ingeniería genética.

6. Expresión y producción de un anticuerpo recombinante o anticuerpo modificado.

Los genes de anticuerpo construidos como se ha descrito anteriormente pueden expresarse y por lo tanto obtenerse  
35 por un método conocido. En el caso de células de mamífero, un gen puede expresarse por medio de la unión funcional a un promotor útil que se emplea generalmente del gen de anticuerpo a expresar, y por unión a una señal de poliA cadena abajo en posición 3' del mismo. Un promotor/potenciador es, por ejemplo, el promotor/potenciador temprano inmediato del citomegalovirus humano.

Además, los ejemplos de otros promotores/potenciadores que se pueden usar en la presente invención para la  
40 expresión de anticuerpos incluyen un promotor/potenciador de un virus tal como retrovirus, un virus de polioma, un adenovirus o un virus de simio 40 (SV40), o un promotor/potenciador derivado de células de mamífero tal como el factor de elongación humano 1a (HEF1a).

Cuando se usa un promotor/potenciador de SV40, la expresión génica puede realizarse fácilmente por el método de Mulligan et al (Nature (1979) 277, 108) y cuando se usa un promotor/potenciador de HEF1a, la expresión génica  
45 puede realizarse fácilmente por el método de Mizushima et al (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322).

En el caso de Escherichia coli, se unen de manera funcional un promotor útil que se usa generalmente, una  
50 secuencia señal para la secreción del anticuerpo y el gen del anticuerpo a expresar, de manera que pueda expresarse el gen. Los ejemplos de un promotor incluyen un promotor lacZ y un promotor araB. Cuando se usa el promotor lacZ, el gen de anticuerpo se puede expresar por el método de Ward et al (Nature (1098) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427), o cuando se usa el promotor araB, el gen de anticuerpo se puede expresar por el método de Better et al (1988) 240, 1041-1043).

Como secuencia señal para la secreción de anticuerpo puede usarse una secuencia señal pelB (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) cuando el anticuerpo se produce en el periplasma de Escherichia coli. Después se  
55 aíslan los anticuerpos producidos en el periplasma, se repliega la estructura del anticuerpo de manera apropiada y se utiliza.

Un origen de replicación que se puede usar procede de un SV40, un poliomavirus, un adenovirus, un papilomavirus bovino (BPV) o similares. Además, para amplificar el número de copias génicas en un sistema de células hospedadoras, un vector de expresión puede contener un gen de aminoglucósido transferasa (APH), un gen de timidina quinasa (TK), un gen de xantina guanina fosforribosiltransferasa de *Escherichia coli* (Ecogpt), un gen de dihidrofolato reductasa (dhfr) o similar como marcador de selección.

Para producir los anticuerpos usados en la presente invención se usa cualquier sistema de expresión, tal como un sistema de células eucariotas o un sistema de células procariotas. Los ejemplos de células eucariotas incluyen células animales tales como células de un sistema de células de mamífero establecido o un sistema de células de insecto, células de hongos filamentosos y células de levadura. Los ejemplos de células procariotas incluyen células bacterianas tales como células *Escherichia coli*.

Preferiblemente, los anticuerpos que se usan en la presente invención se expresan en células de mamífero tales como células CHO, COS, de mieloma, BHK, Vero o HeLa.

Después, una célula hospedadora transformada se cultiva in vitro o in vivo de manera que la célula hospedadora produzca un anticuerpo diana. Las células hospedadoras se cultivan de acuerdo con un método conocido. Por ejemplo, como solución de cultivo pueden usarse DMEM, MEM, RPMI1640, IMDM o similares. Se puede usar combinado un fluido sérico tal como suero bovino fetal (FCS).

#### 7. Separación y purificación de anticuerpo

Los anticuerpos expresados y producidos como se ha descrito anteriormente pueden aislarse de las células o animales hospedadores y purificarse a un nivel uniforme. El aislamiento y purificación de los anticuerpos que se van a utilizar en la presente invención pueden realizarse usando columnas de afinidad. Un ejemplo de una columna que usa una columna de proteína A es Hyper D, POROS, Sepharose F.F. (Farmacia). Se pueden usar otros métodos convencionales de aislamiento y purificación que se emplean para proteínas y no hay limitación con respecto a su uso. Por ejemplo, además de la columna de afinidad anterior pueden seleccionarse de manera apropiada y combinarse para uso una columna de cromatografía, un filtro, ultrafiltración, un método de desplazamiento salino, diálisis y similares, de manera que los anticuerpos pueden aislarse y purificarse (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

#### 8. Confirmación de la actividad del anticuerpo

Pueden emplearse medios conocidos para someter a ensayar la actividad de unión a antígenos del anticuerpo que se usa en la presente invención (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) y la actividad para inhibir la unión del receptor al ligando (Harada, A. et al., International Immunology (1993)5, 681-690).

Como método para medir la actividad de unión a antígeno del anticuerpo anti-glipicano 3 usado en la presente invención pueden emplearse ELISA (ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima), EIA (inmunoensayo enzimático), RIA (radioinmunoensayo) o la técnica de anticuerpos fluorescentes. Por ejemplo, cuando se emplea el inmunoensayo enzimático, a una placa recubierta con glipicano 3 se le añade una muestra que contiene anticuerpos anti-glipicano 3, tal como el sobrenadante de cultivo de células productoras de anticuerpos anti-glipicano 3 o anticuerpos purificados. Después se añade un anticuerpo secundario marcado con una enzima tal como fosfatasa alcalina. La placa después se incuba y posteriormente se lava, se añade un sustrato enzimático tal como ácido p-nitrofenil fosfórico y después se mide la absorbancia, de manera que puede evaluarse la actividad de unión al antígeno.

Para confirmar la actividad del anticuerpo usado en la presente invención se mide la actividad de neutralización de un anticuerpo anti-glipicano

#### 9. Actividad citotóxica

Los anticuerpos usados en la presente invención tienen actividad ADCC o actividad CDC como actividad citotóxica.

La actividad ADCC puede medirse mezclando células efectoras, células diana y anticuerpos anti-glipicano 3 y después examinando el grado de ADCC. Como células efectoras pueden usarse, por ejemplo, esplenocitos de ratón, sangre periférica humana o monocitos aislados a partir de la médula ósea. Como células diana pueden usarse, por ejemplo, líneas celulares humanas establecidas tales como la línea celular humana de cáncer hepático HuH-7. Las células diana previamente se marcan con <sup>51</sup>Cr, se añaden anticuerpos antiglipicano 3 a las células y después se realiza la incubación. A continuación se añaden células efectoras en una relación apropiada entre dichas células y las células diana y después se realiza una incubación. Después de la incubación se recoge el sobrenadante y se cuenta la radiactividad en el sobrenadante, de forma que puede medirse la actividad ADCC.

La actividad CDC puede medirse mezclando las células diana marcadas anteriores y los anticuerpos anti-glipicano 3, añadiendo complementos, realizando la incubación, cultivando y después contando la radiactividad en el sobrenadante.

Los anticuerpos necesitan una porción Fc para ejercer la actividad citotóxica. Cuando el inhibidor del crecimiento celular de la presente invención utiliza la actividad citotóxica de un anticuerpo, es necesario que anticuerpo antiglipicano 3 usado en la presente invención contenga la porción Fc.

10. Inhibición de la vascularización

5 El anticuerpo anti-glipicano 3 de la presente invención se puede utilizar para inhibir la vascularización.

11. Método de administración y preparación farmacéutica

El inhibidor del crecimiento celular de la presente invención se usa para tratar o mejorar cánceres seleccionados del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, leucemia, linfoma y cáncer de páncreas.

10 Los ejemplos preferidos de las células de carcinoma diana del inhibidor del crecimiento celular de la presente invención son células de cáncer de pulmón, células de cáncer de colon, células de cáncer de mama, células de cáncer de próstata, células de leucemia, células de linfoma y células de cáncer pancreático.

15 La dosis eficaz se selecciona del intervalo de 0,001 mg a 1000 mg por kg de peso corporal por administración. Como alternativa, puede seleccionarse una dosis en el intervalo de 0,01 a 100.000 mg/peso corporal por paciente. Sin embargo, la dosis del agente terapéutico que contiene los anticuerpos antiglipicano 3 de la presente invención no se limita a estas dosis.

Además, en cuanto al momento de dosificación del agente terapéutico de la presente invención, el agente puede administrarse antes o después del inicio de los síntomas clínicos de una enfermedad.

20 El agente terapéutico que contiene los anticuerpos anti-glipicano 3 como ingrediente activo de la presente invención puede formularse de acuerdo con métodos convencionales (Remingtons Pharmaceutical Science, última edición, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A) y puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable y un aditivo conjuntamente.

25 Los ejemplos de dichos vehículos y aditivos farmacéuticos incluyen agua, un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable, colágeno, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polímero carboxivinílico, carboximetilcelulosa sódica, poliácido acrílico, alginato sódico, dextrano soluble en agua, carboximetilalmidón sódico, pectina, metil celulosa, etil celulosa, goma xantana, goma arábica, caseína, agar, polietilenglicol, diglicerina, glicerina, propilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, albúmina de suero humano (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, y un tensioactivo que sea aceptable como aditivo farmacéutico.

30 De acuerdo con la forma de dosificación del agente terapéutico de la presente invención se selecciona uno o una combinación apropiada de los aditivos anteriores, pero la invención no se limita por esto. Por ejemplo, el agente que puede usarse como preparación farmacéutica para inyección puede prepararse disolviendo anticuerpos anti-glipicano 3 purificados en un disolvente tal como una solución fisiológica salina, un tampón o una solución de glucosa, y añadiendo a continuación un inhibidor de la adsorción tal como Tween80, Tween20, gelatina o albúmina de suero humano a la solución. Como alternativa, puede usarse un agente liofilizado para preparar una forma de dosificación que se disuelve para la reconstitución antes del uso. Como excipiente para la liofilización puede usarse un alcohol de azúcar o sacáridos, tales como manitol o glucosa.

**Breve Descripción de los Dibujos**

La Fig. 1 muestra la actividad ADCC en células HuH-7 de anticuerpos anti-glipicano 3 (K6534).

La Fig. 2 muestra la actividad CDC en células HuH-7 de anticuerpos anti-glipicano 3 (K6511).

40 La Fig. 3 muestra la expresión de glipicano en células HuH-7.

La Fig. 4A muestra los resultados de un análisis FACS de la expresión de GPC3 por líneas celulares de cáncer pulmonar humano. Son los resultados de análisis con anticuerpos anti-glipicano 3 (K6534).

La Fig. 4B muestra los resultados del análisis FACS de la expresión de GPC3 por líneas celulares de leucemia humana. Son los resultados de análisis con anticuerpos anti-glipicano 3 (K6534).

45 La Fig. 4C muestra los resultados del análisis FACS de la expresión de GPC3 por líneas celulares de linfoma humano. Son los resultados de análisis con anticuerpos anti-glipicano 3 (K6534).

La Fig. 4D muestra los resultados del análisis FACS de la expresión de GPC3 por líneas celulares de cáncer de colon humano. Son los resultados de análisis con anticuerpos anti-glipicano 3 (K6534).

50 La Fig. 4E muestra los resultados del análisis FACS de la expresión de GPC3 por líneas celulares de cáncer de mama humano. Son los resultados de análisis con anticuerpos anti-glipicano 3 (K6534).

La Fig. 4F muestra los resultados del análisis FACS de la expresión de GPC3 por líneas celulares de cáncer de próstata humano. Son los resultados de análisis con anticuerpos anti-glipicano 3 (K6534).

5 La Fig. 4G muestra los resultados del análisis FACS de la expresión de GPC3 por la línea celular de cáncer pancreático humano y la línea celular de cáncer hepático humano. Son los resultados de análisis con anticuerpos antiglipicano 3 (K6534).

### Mejor Modo de Llevar a cabo la Invención

La presente invención se describirá adicionalmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, el alcance técnico de la presente invención no se limita por estos ejemplos o similares.

#### Ejemplo 1 Preparación de anticuerpo monoclonal contra el péptido sintético glipicano-3

10 Se sintetizó un péptido que tenía una secuencia de aminoácidos (del 355° al 371° aminoácido) (RQYRSAYPEDLFIDKK) de la proteína glipicano-3 humana. El péptido sintético se unió a hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH) usando un agente de entrecruzamiento del tipo de maleinimida benzoiloxi succinimida (MBS), preparándose de esta manera un inmunógeno. Se inmunizaron ratones (BALB/c, hembras, de 6 semanas de edad) 3 veces con el inmunógeno a 100 µg/ratón. Se sometieron a ensayo los títulos de anticuerpo en suero. Un método  
15 empleado como método de ensayo de título de anticuerpos implica hacer que el suero diluido reaccione con los péptidos (0,5 µg) inmovilizados en una placa, realizar la reacción con anticuerpos anti-ratón marcados con HRP, añadir un sustrato y después medir la absorbancia a 450 nm del color desarrollado del color desarrollado de esta manera (un método ELISA en fase sólida de péptidos). Después de confirmar los títulos de anticuerpo, se recogieron los esplenocitos y después se fusionaron (Köhler, G, Milstein, C: Nature, 256: 495 (1975)) con células de mieloma (P3/X63-Ag8), preparándose de esta manera hibridomas. Después se purificaron anticuerpos monoclonales  
20 producidos por cinco tipos de hibridomas. La actividad de unión al péptido se midió usando el método ELISA en fase sólida de péptidos y después se seleccionaron anticuerpos IgG1 (en lo sucesivo K6534) y anticuerpos IgG3 (en lo sucesivo K6511) que tenían alta actividad de unión.

#### Ejemplo 2 Inhibición de la proliferación celular usando anticuerpo anti-glipicano 3

25 Se midieron la actividad ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) y la actividad CDC (citotoxicidad dependiente de complemento) de acuerdo con el método de Current Protocols in Immunology; capítulo 7 Immunologic studies in humans, Editor, John E, Cologan et al., John Wiley & Sons, Inc., 1993.

##### 1. Preparación de células efectoras

30 Se extrajo el bazo a partir de un ratón CBA/N (8 semanas de edad, macho) y después se aislaron los esplenocitos en medio RPMI1640 (GIBCO). Las células se lavaron en el mismo medio que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS, HyClone) y después se preparó una concentración celular a 5x10<sup>6</sup>/ml, preparándose de esta manera las células efectoras.

##### 2. Preparación de solución de complemento

35 Se diluyó complemento de cría de conejo (CEDARLANE) 10 veces en medio DMEM que contenía FBS al 10% (GIBCO), preparándose de esta manera una solución de complemento.

##### 3. Preparación de células diana

40 Se cultivó una línea de células de cáncer hepático humano HuH-7 (Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) N° JCRB0403, Human Science Research Support Bank (Human Science Kenkyu Shien Bank)) con 0,2 mCi de 51Cr-cromato sódico (Amersham Pharmacia Biotech) en medio DMEM que contenía FBS al 10% a 37°C durante 1 hora, realizándose de esta manera el marcaje radiactivo. Después del marcaje radiactivo, las células se lavaron 3 veces en medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% y se preparó una concentración celular a 2x10<sup>5</sup>/ml, obteniéndose de esta manera las células diana.

##### 4. Medición de la actividad ADCC

45 Se añadieron 50 µl de las células diana y de anticuerpos anti-glipicano 3 (K6534) a una placa de fondo en U de 96 pocillos (Beckton Dickinson) y después se dejaron reaccionar en hielo durante 15 minutos. Después se añadieron 100 µl de células efectoras y posteriormente se cultivaron dentro de un incubador con gas dióxido de carbono durante 4 horas. La concentración final de los anticuerpos se preparó a 0 ó 10 µg/ml. Después del cultivo, se recogieron 100 µl del sobrenadante y después se midió la radiactividad usando un contador gamma (COBRA II AUTO-GAMMA, MODELO D5005, Packard Instrument Company). La actividad citotóxica (%) se calculó usando la  
50 fórmula (A-C)/(B-C)x100. Aquí "A" representa la radiactividad (cpm) en cada muestra, "B" representa la radiactividad (cpm) en una muestra suplementada con NP-40 al 1% (Nacalai Tesque) y "C" representa la radioactividad (cpm) en una muestra que contiene sólo células diana. El experimento se realizó por duplicado y se calcularon los valores medios.

## 5. Medición de la actividad CDC

Se añadieron 50 µl de las células diana y de anticuerpos anti-glipicano 3 (K6511) a una placa de fondo en U de 96 pocillos (Beckton Dickinson) y después se dejaron reaccionar en hielo durante 15 minutos. Posteriormente se añadieron 100 µl de una solución de complemento, seguido de 4 horas de cultivo en un incubador con gas dióxido de carbono. La concentración final del anticuerpo fue de 0 ó 3 µg/ml. Después del cultivo, se recogieron 100 µl del sobrenadante y posteriormente se midió la radiactividad usando un contador gamma. La actividad citotóxica (%) se calculó de la misma manera que en el punto en "4. Medición de la actividad ADCC". El experimento se realizó por duplicado y se calcularon los valores medios.

La Figura 1 muestra la actividad ADCC y la Figura 2 muestra la actividad CDC. Estos resultados revelaron que los anticuerpos anti-glipicano 3 ejercen actividad ADCC y actividad CDC en una línea de células de cáncer hepático humano HuH-7 y de esta manera inhiben la proliferación celular.

## Ejemplo 3 Medición del nivel de expresión de glipicano en células HuH-7

Se suspendieron aproximadamente 5x10<sup>5</sup> células HuH-7 en 100 µl de FACS/PBS (preparado disolviendo 1 g de albúmina de suero bovino (SIGMA) en 1 L de CellWASH (Beckton Dickinson)). Después se añadieron anticuerpos anti-glipicano 3 (K6511) o IgG2a de ratón (Biogenesis) como anticuerpos de control a 25 µg/ml y posteriormente la solución se dejó en reposo en hielo durante 30 minutos. Después de lavar con FACS/PBS, el producto se suspendió en 100 µl de FACS/PBS. Se añadieron 4 µl de Ig de cabra anti-ratón FITC (Becton Dickinson) y después la solución se dejó en reposo en hielo durante 30 minutos.

Después de lavar dos veces con FACS/PBS, el producto se suspendió en 1 ml de FACS/PBS. La intensidad de fluorescencia de las células se midió usando un citómetro de flujo (EPICS XL, BECKMAN COULTER).

La Figura 3 muestra el resultado de la citometría de flujo. Se expresó glipicano 3 en células HuH-7, lo cual sugiere que los anticuerpos anti-glipicano 3 se unen al glipicano 3 expresado en las células inhibiendo de esta manera la proliferación celular (Fig. 3).

## Ejemplo 4 Análisis de la expresión de GPC3 en un panel de células de carcinoma usando FCM.

Se analizó la expresión de glipicano 3 (GPC3) por líneas celulares de cáncer humano (pulmón, colon, recto, mamario, próstata, leucemia, linfoma, mieloma, páncreas e hígado) usando FCM.

Las células se cultivaron durante 2 días y después se sometieron a ensayo. Las células adheridas se recogieron usando Tripsina-EDTA (Nº de Cat. 25300-054, Lote 14210, GIBCO) que se había diluido 10 veces con tampón de disociación celular (Nº de Cat. 13150-016, Lote 1098554, GIBCO). Las células recogidas se dejaron reaccionar en hielo con anticuerpos anti-glipicano 3 (K6534, 600 µg/ml) o anticuerpos mIgG2a como control negativo (Biogenesis,

M-IgG2a-i, Lote EA990719A, 1 mg/ml) (concentración final de anticuerpo de 10 µg/ml). Después de lavarse, las células se dejaron reaccionar con anticuerpo Ig anti-ratón marcado con FITC (Núm. de Cat. 349031, BD PharMingen) en hielo (2 µl/ensayo). Después de lavar las células, se midió la intensidad de 5 fluorescencia usando un citómetro de flujo (EPICS XL, BECKMAN COULTER). Como resultado, se confirmó la expresión de GPC3 en las líneas de células de cáncer de pulmón (A549, NCI-H460, NCI-H23, NCI-H226, DMS114, EKVX, HOP-62 y NCI-H322 M); las líneas de células de leucemia P30/OHK, BALL-1, THP-1 y P39/TSU), las líneas de células de linfoma (MLMA, Ramos y U937); las líneas de células de cáncer de colon (SW480, COLO205, LoVo y SW837), la líneas de células de cáncer de mama (MDA-MB-231, SK-BR-3 y MDA-MB468), las líneas de células de cáncer de próstata (LNCaP y 22Rv1), la línea de células de cáncer pancreático (MIAPaCa-2) y la línea de células de cáncer hepático (hígado) (HepG2). Basándose en estos resultados, se concluye que el inhibidor del crecimiento celular de la presente invención es útil para tratar el cáncer de pulmón, el cáncer de colon, el cáncer de mama, el cáncer de próstata, la leucemia, el linfoma, el cáncer pancreático y similares.

**Aplicabilidad Industrial**

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un anticuerpo antiglipicano 3 para su uso en el tratamiento del cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, leucemia, linfoma y cáncer de páncreas.

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> INHIBIDORES DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR QUE CONTIENENE UN ANTICUERPO ANTI-GLIPLICANO 3

5 <130> N90727C

<150> JP 2001-189443 <151> 2001-06-22

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> F

10 <211> Fñ

<212> ÚÜV

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético basado en los aminoácidos 355 a 371 de la proteína glicicano 3 humana

15 <400> F

Arg	Gln	Tyr	Arg	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Asp	Leu	Phe	Ile	Asp	Lys
1				5					10					15	

Lys

**REIVINDICACIONES**

1. Un anti-glicoproteína 3 para su uso en el tratamiento de cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, leucemia, linfoma y cáncer de páncreas.
2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer es cáncer de pulmón.
- 5 3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.
4. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo tiene una actividad citotóxica.
- 10 5. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la actividad citotóxica es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).
6. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la actividad citotóxica es la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).
- 15 7. El uso de un anti-glicoproteína 3 en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento del cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, leucemia, linfoma y cáncer de páncreas.

FIG. 1

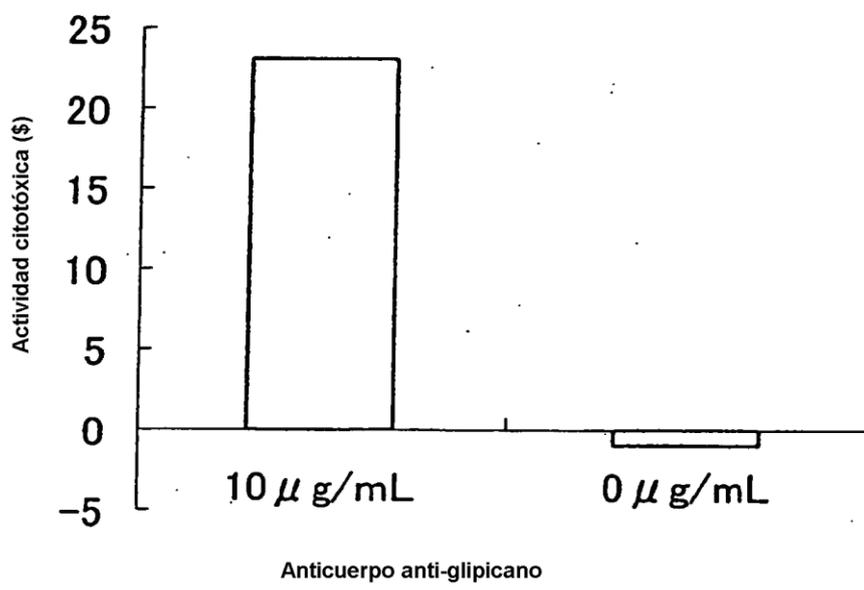


FIG. 2

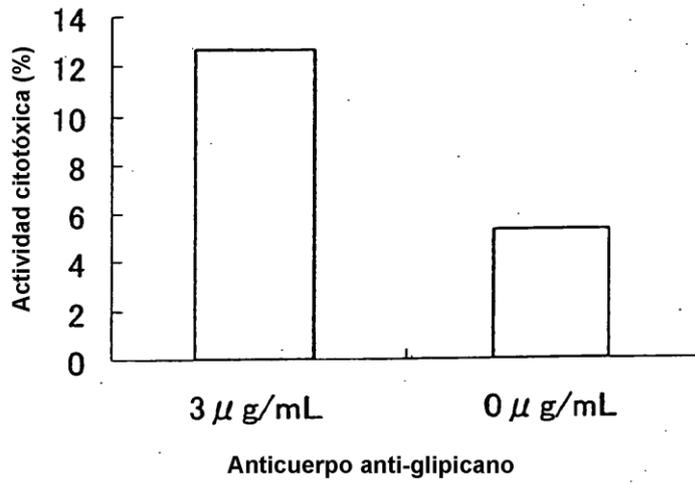


FIG. 3

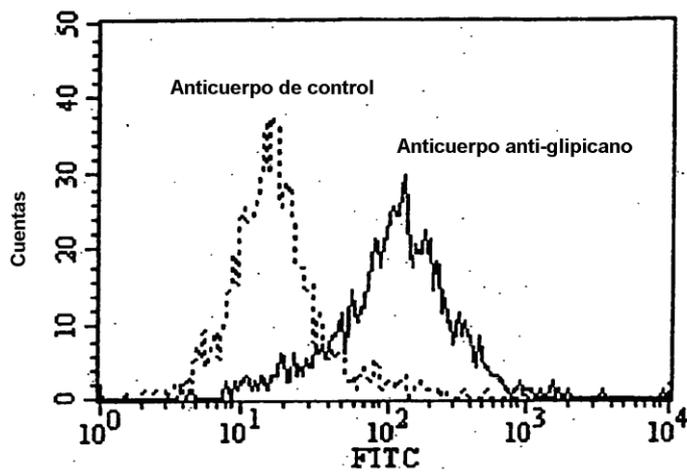


FIG. 4A

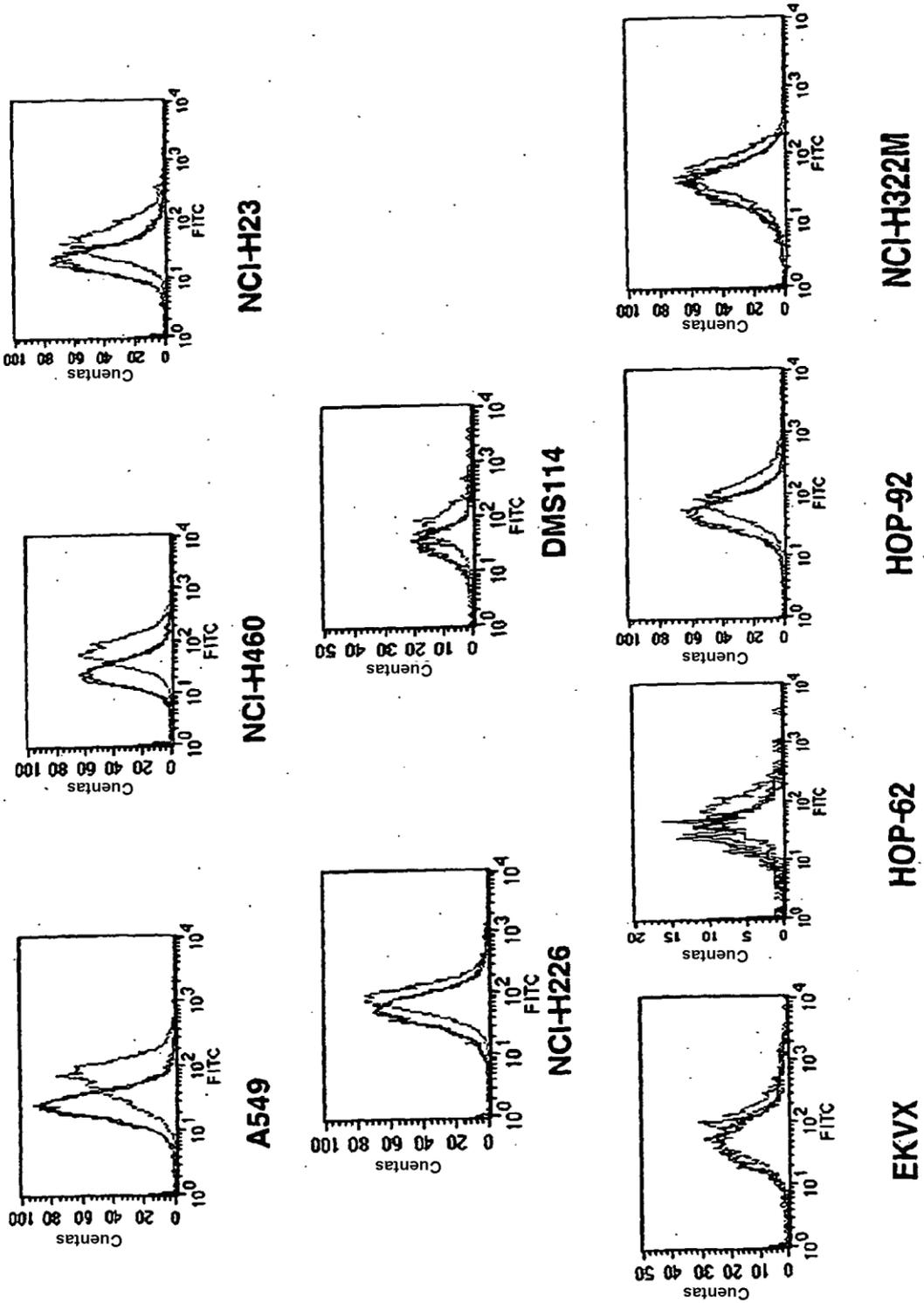


FIG. 4B

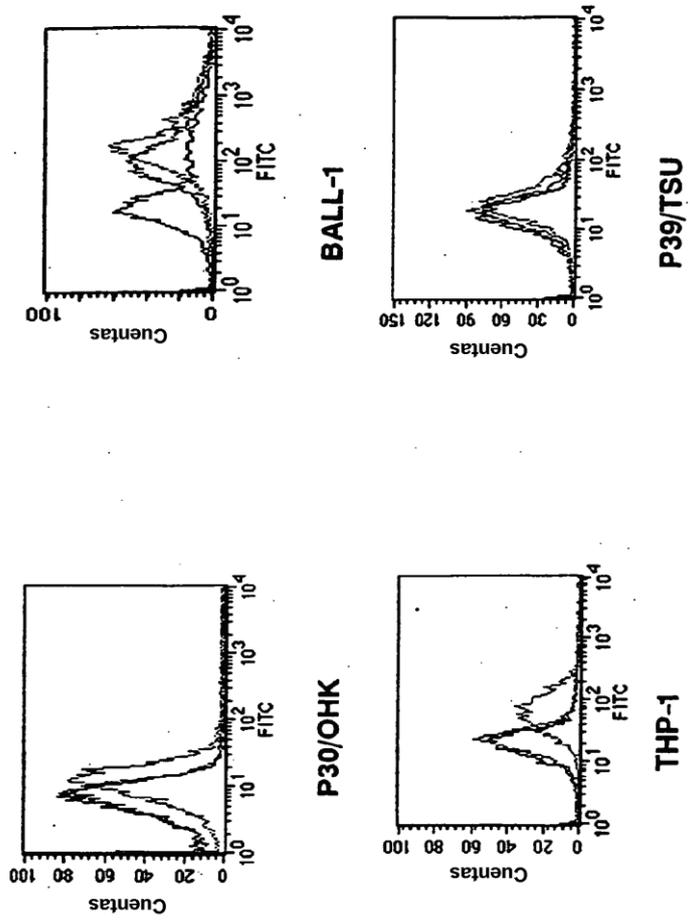
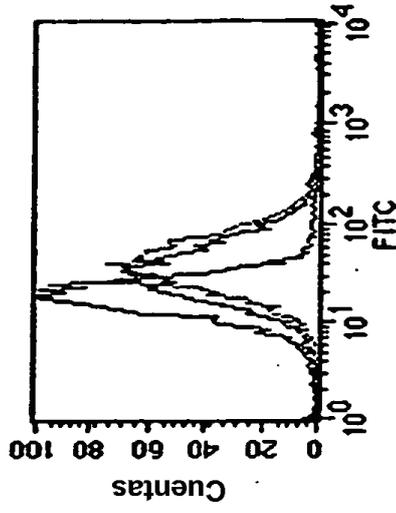
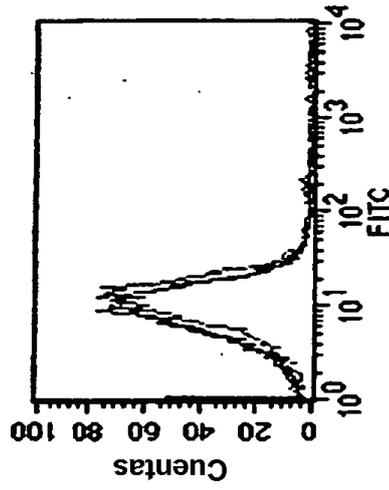


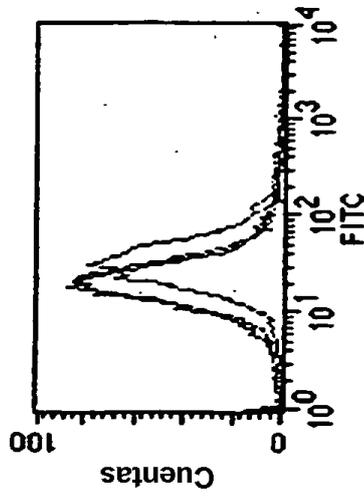
FIG. 4C



U-937



Ramos



MLMA

FIG. 4D

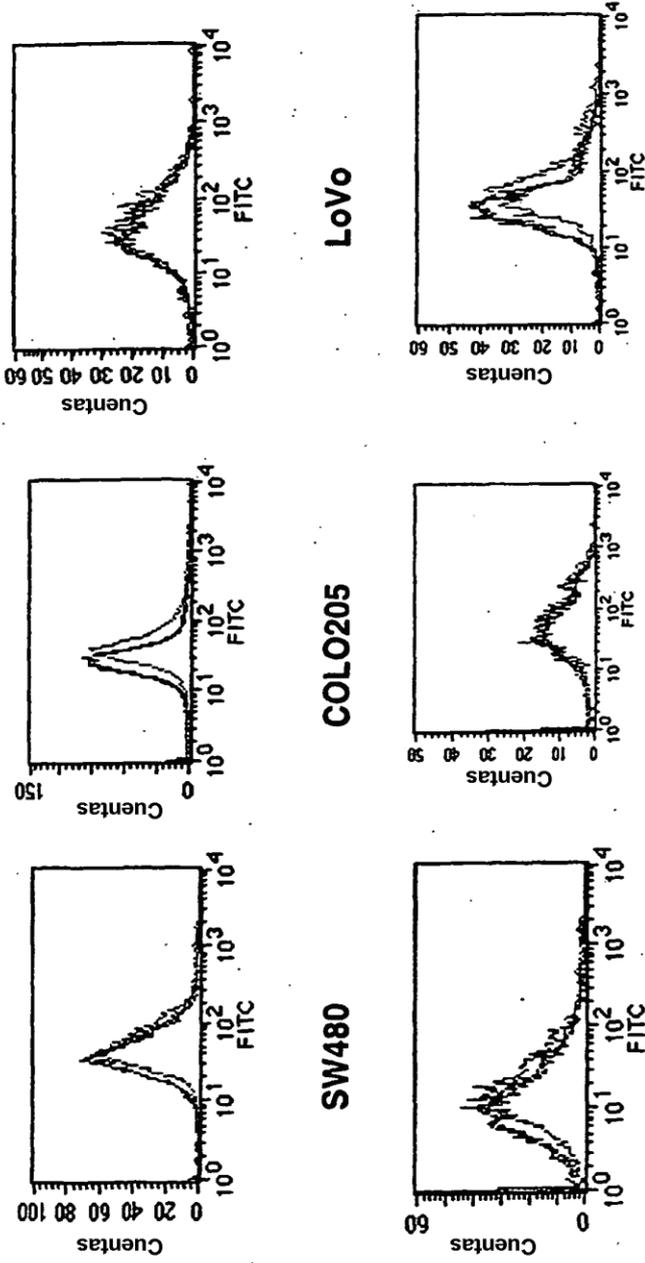
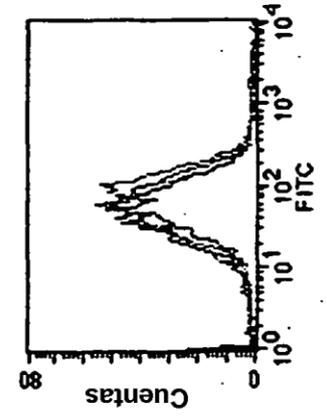
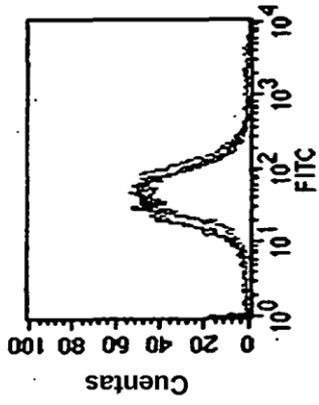


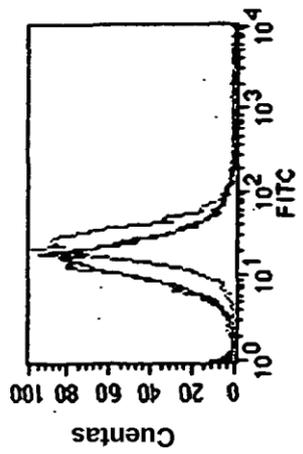
FIG. 4E



**MDA-MB-468**

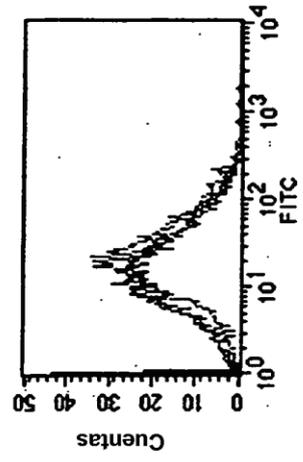


**SK-BR-3**

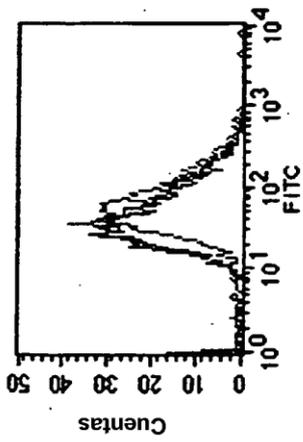


**MDA-MB-231**

FIG. 4F

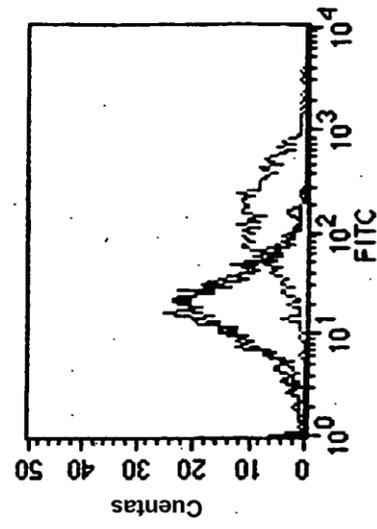


22Rv1

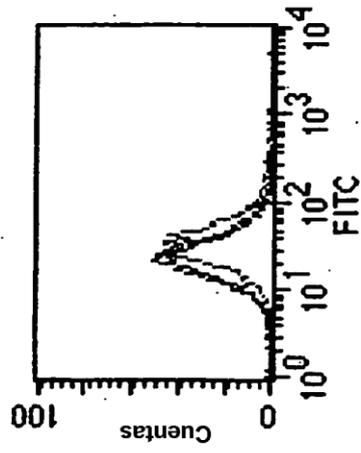


LNCaP

FIG. 4G



**HepG2 (Cáncer hepático)**



**MIA PaCa-2 (Cáncer pancreático)**