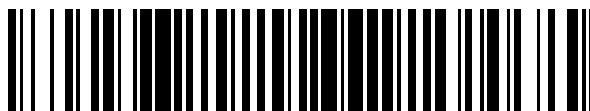


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 898**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2005 E 05780979 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 1800693**

54 Título: **Terapia adyuvante con el uso de anticuerpo anti-glipicano 3**

30 Prioridad:

24.08.2004 JP 2004244273

28.03.2005 JP 2005090945

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

16.09.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KINOSHITA, YASUKO;
SUGIMOTO, MASAMICHI y
OKABE, HISAFUMI

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 422 898 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

Terapia adyuvante con el uso de anticuerpo anti-glipicano 3

5 **Campo Técnico**

La presente invención se refiere a prevenir la reaparición de cáncer de micrometástasis intrahepáticas.

10 **Antecedentes de la Técnica**

10

Se ha indicado que la familia de glipicano es una nueva familia de proteoglicanos de heparán sulfato presente en la superficie celular. Se han presentado cinco especies de glipicanos (glipicano 1, glipicano 2, glipicano 3, glipicano 4 y glipicano 5) como miembros de la familia de glipicano hasta la fecha. Los miembros de esta familia tienen una proteína principal de tamaño uniforme (aproximadamente 60 kDa), comparten una secuencia de cisteínas única y altamente conservada, y están unidos a la membrana celular mediante un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI).

15

20

Se identificó el gen Dally (división anómalamente retardada) mediante exploración genética de mutantes de *Drosophila melanogaster* que tenían un patrón de división celular anómalo durante el desarrollo del sistema nervioso central. Se ha mostrado que el ADNc de Dally tiene una fase abierta de lectura (ORF) que codifica un producto que muestra homología de secuencia (24 a 26% de homología) con proteoglicanos de membrana integral de vertebrados (GRIP) que tienen todas las características de los glipicanos. Se ha sugerido posteriormente que Dally desempeña un papel en la regulación del mecanismo receptor de dpp (decapentaplegia), lo que sugiere la posibilidad de que el glipicano de mamífero module la transducción de señal de TGF y BMP. Es decir, se ha sugerido que el glipicano puede actuar como un correceptor para algunos factores de crecimiento de unión a heparina (por ejemplo, EGF, PDGF, BMP2, FGF).

25

30

Se aisló glipicano 3 como un transcrito regulado por el desarrollo del intestino delgado de rata (Filmus, J., Church, J.G., y Buick, R.N. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 4243-4249). Se identificó después como OCI-5, un proteoglicano de heparán sulfato de tipo anclado a GPI de la familia de glipicano que tiene una proteína principal con un peso molecular de 69 kDa (Filmus, J., Shi, W., Wong, Z.-M., y Wong, M.J. (1995) Biochem. J. 311, 561-565). En seres humanos, se ha aislado también un gen que codifica glipicano 3 como MRX-7 de una línea celular de cáncer de estómago humano (Hermann Lage *et al.*, Gene 188 (1997) 151-156). Se ha indicado que el glipicano 3 forma un complejo proteína-proteína con factor de crecimiento de tipo insulina 2 y que regula la acción de este factor de crecimiento (Pilia, G. *et al.* (1996) Nat. Genet. 12, 241-247). Este informe sugiere que el glipicano 3 no interacciona necesariamente con factores de crecimiento a través de la cadena de heparán sulfato.

35

40

También se indicado que el glipicano 3 puede utilizarse posiblemente como un marcador de carcinoma hepatocelular (Hey-Chi Hsu *et al.*, Cancer Research 57, 5179-5184 (1997)). También se ha indicado que el anticuerpo anti-glipicano 3 muestra una actividad citotóxica contra células de cáncer de hígado y puede ser útil como un agente antineoplásico (documento WO 03/00883).

45

Los documentos WO 04/022739 y EP 1.541.680 A1 se refieren a un anticuerpo contra el péptido N terminal o péptido C terminal de GPC3 solubilizado en sangre.

50

Carter *et al* (2001) Nature Reviews Cancer, 1: 118-129 se refiere a mejorar la eficacia de terapias de cáncer basadas en anticuerpos.

55

Sin embargo, no ha habido informes con respecto a que sea posible usar anticuerpo anti-glipicano 3 para terapia de adyuvante después de un tratamiento de cáncer.

60

Sumario de la invención

65

Como resultado de investigaciones exhaustivas e intensivas, los presentes inventores descubrieron que el anticuerpo anti-glipicano 3 es útil para evitar la reaparición de cáncer de micrometástasis intrahepáticas en un paciente después de tratamiento por resección de cáncer para cáncer de hígado.

70

En consecuencia, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-glipicano 3 para su uso en un método para prevenir la reaparición de cáncer de micrometástasis intrahepática en un paciente después de un tratamiento por resección de cáncer para cáncer de hígado, donde el glipicano 3 se expresa en las células de cáncer de hígado resecaadas.

75

Breve descripción de los dibujos

80

La Figura 1 es un gráfico que muestra el efecto del agente antineoplásico de acuerdo con la presente invención cuando se administra a un modelo de ratón trasplantado por vía intrahepática.

La Figura 2 es un gráfico que muestra el efecto del agente antineoplásico de acuerdo con la presente invención cuando se administra en un estadio temprano a un modelo de ratón trasplantado de forma intrahepática.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención proporciona un anticuerpo anti-glipicano 3 para su uso en un método para prevenir la reaparición de cáncer de micrometástasis intrahepática en un paciente después de un tratamiento por resección de cáncer para cáncer de hígado, donde el glipicano 3 se expresa en las células de cáncer de hígado reseca-

10 El anticuerpo anti-glipicano 3 es preferentemente un anticuerpo monoclonal.

15 El agente antineoplásico de acuerdo con la presente invención se usa en terapia de adyuvante. Incluso en casos en los que se cree que la cirugía de tratamiento de cáncer ha dado como resultado la retirada de las células cancerosas o su muerte, aún pueden permanecer presentes células cancerosas indetectadas. El cáncer puede reaparecer después de un cierto período de tiempo cuando dichas células cancerosas permanecen presentes, y debe seguirse por lo tanto tratamiento de cáncer de un tratamiento para evitar la reaparición del cáncer. Dicho tratamiento se conoce como terapia adyuvante o terapia adyuvante posquirúrgica.

20 Dentro del contexto de la presente invención, el tratamiento de cáncer se refiere a cualquier tratamiento que tenga un objetivo que incluya inhibir el crecimiento de células cancerosas o destruir las células cancerosas o reducir las células cancerosas, tales como resección del cáncer, quimioterapia usando un agente antineoplásico, radioterapia, terapia de inyección de etanol percutáneo, terapia de coagulación térmica de radiofrecuencia percutánea o terapia de embolización arterial transcathéter. En la presente invención el tratamiento de cáncer comprende resección de cáncer para cáncer de hígado. El concepto de "tratamiento posneoplásico" o "tratamiento después de cáncer" se refieren a después de que se hayan llevado a cabo dichos tratamientos. Este concepto de "tratamiento posneoplásico" o "tratamiento después de cáncer" en la presente invención no necesariamente significan que el cáncer se haya curado.

30 El anticuerpo anti-glipicano 3 de acuerdo con la presente invención se administra a un paciente con tratamiento posneoplásico después de determinar si el glipicano 3 se expresa en las células cancerosas de hígado reseca- do. Puede usarse cualquier método para determinar si se expresa glipicano 3. Por ejemplo, la expresión de proteínas de glipicano 3 puede determinarse usando anticuerpo anti-glipicano 3, mientras que la expresión del gen de glipicano 3 puede determinarse mediante, por ejemplo, PCR.

35 El anticuerpo anti-glipicano 3 puede administrarse en cualquier momento después del tratamiento de cáncer, y la administración puede llevarse a cabo inmediatamente después del tratamiento de cáncer o después de cierto intervalo de tiempo. Un momento preferido para la administración en la presente invención es en el intervalo desde después del tratamiento de cáncer hasta la reaparición del cáncer. En el caso de terapia adyuvante posquirúrgica, la administración comienza típicamente en un periodo de 12 semanas o en un periodo de 6 semanas después del tratamiento. La reaparición de cáncer puede diagnosticarse por métodos conocidos por los expertos en la materia; por ejemplo, la aparición de un tumor puede determinarse mediante hallazgos visuales o mediante hallazgos patológicos. La presencia de un tumor puede confirmarse por métodos conocidos por los expertos en la materia, tales como captura de imágenes o métodos basados en un marcador tumoral tal como AFP.

45 El cáncer tratado usando el agente antineoplásico de acuerdo con la presente invención es cáncer de hígado. El hepatocarcinoma es un cáncer particularmente apropiado para tratamiento usando el agente antineoplásico de acuerdo con la presente invención. El cáncer de hígado puede ser cáncer primario o secundario, que incluye carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma intrahepático, adenocarcinoma de conducto biliar, carcinoma hepatocelular combinado y colangiocarcinoma, hepatoblastoma, carcinoma indiferenciado, angiosarcoma, leiomiocarcinoma del hígado y sarcoma indiferenciado.

50 En la presente invención, el anticuerpo anti-glipicano es para su uso en un método para evitar la reaparición de cáncer de micrometástasis intrahepáticas en un paciente después de un tratamiento por resección de cáncer para cáncer de hígado, donde el glipicano 3 se expresa en las células de cáncer de hígado reseca- das.

55 No existen requisitos particulares con respecto al origen, tipo (monoclonal o policlonal) y forma del anticuerpo anti-glipicano 3 usado en la presente invención.

60 El anticuerpo anti-glipicano 3 usado en la presente invención puede obtenerse por un medio conocido en forma de anticuerpo policlonal o monoclonal. El anticuerpo monoclonal de origen mamífero es un anticuerpo anti-glipicano 3 particularmente preferido para su uso en la presente invención. Los ejemplos de anticuerpo monoclonal de origen mamífero incluyen anticuerpo producido por hibridomas y anticuerpo producido por un hospedador que se ha transformado por técnicas de ingeniería genérica con un vector de expresión que contiene el gen de anticuerpo.

65 Puede prepararse un hibridoma productor de anticuerpo monoclonal sustancialmente usando técnicas conocidas como sigue. Puede prepararse un hibridoma por inmunización de un animal de acuerdo con un método de

inmunización convencional usando glipicano 3 como el antígeno sensibilizador; fusionando los inmunocitos resultantes con células compañeras conocidas por una técnica de fusión celular convencional; y después explorando con respecto a células productoras de anticuerpo monoclonal por un procedimiento de exploración convencional.

5 En términos específicos, el anticuerpo monoclonal puede prepararse como sigue. En primer lugar, se obtiene glipicano 3 humano para su uso como el antígeno sensibilizador para producción de anticuerpos induciendo la expresión del glipicano 3 (MXR7) de acuerdo con la secuencia génica/de aminoácidos como se desvela en Lage, H. *et al.*, Gene 188 (1997), 151-156. La secuencia génica y secuencia de aminoácidos de glipicano 3 se muestran, respectivamente, en SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2. Específicamente, la secuencia génica que codifica glipicano 3 se inserta en un sistema de vector de expresión conocido; se transforma una célula hospedadora apropiada; y se purifica posteriormente una proteína de glipicano 3 humana de interés por un método conocido a partir de la célula hospedadora o el sobrenadante de cultivo.

15 Esta proteína de glipicano 3 purificada se usa después como el antígeno sensibilizador. Como alternativa, puede usarse un péptido parcial de glipicano 3 como el antígeno sensibilizador. Dicho péptido parcial puede obtenerse por síntesis química de un péptido de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de glipicano 3 humano.

20 El anticuerpo anti-glipicano 3 mostrará una actividad antineoplásica mediante su actividad citotóxica tal como ADCC o CDC. Además, mostrará una actividad antineoplásica conjugando anticuerpo anti-glipicano 3 con una sustancia citotóxica tal como un radioisótopo, un agente quimioterapéutico, o una toxina derivada de bacteria. El epítipo en la molécula de glipicano 3 que se reconoce por el anticuerpo anti-glipicano 3 no se limita a un epítipo particular. El anticuerpo anti-glipicano 3 puede reconocer cualquier epítipo que esté presente en la molécula de glipicano 3. En consecuencia, puede usarse cualquier fragmento peptídico que contenga un epítipo presente en la molécula de glipicano 3 como el antígeno para preparar el anticuerpo anti-glipicano 3 de la presente invención.

25 El mamífero para inmunizar con el antígeno sensibilizador no está limitado específicamente y se selecciona preferentemente basándose en una consideración de la compatibilidad con la célula compañera que se usará para fusión celular. Por ejemplo, se usan generalmente conejos, monos o roedores tales como ratones, ratas y hámsteres.

30 El animal se inmuniza con el antígeno sensibilizador de acuerdo con técnicas conocidas. Por ejemplo, puede llevarse a cabo inmunización por un método general en el que se inyecta a un mamífero por vía intraperitoneal o vía subcutánea el antígeno sensibilizador. Específicamente, el antígeno sensibilizador se diluye con o se suspende en un volumen apropiado de solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica o similares; una cantidad apropiada de un adyuvante convencional tal como adyuvante completo de Freund se mezcla con la misma según sea necesario; y la mezcla se emulsiona y administra al mamífero durante una pluralidad de momentos cada 4 a 21 días. Además, también puede usarse un vehículo apropiado durante la inmunización con el antígeno sensibilizador.

40 Se usa una célula de mieloma de mamífero como la célula compañera para fusión con el inmunocito anteriormente mencionado. Se usan de forma adecuada diversas líneas celulares conocidas como una célula de mieloma e incluyen, por ejemplo, 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).

50 Los inmunocitos se fusionan con las células de mieloma sustancialmente de acuerdo con procedimientos conocidos, por ejemplo, el procedimiento de Kohler y Milstein *et al.* (Kohler, G. y Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46).

Más específicamente, se lleva a cabo fusión celular en un medio de cultivo nutriente convencional en presencia de, por ejemplo, un promotor de fusión celular. Por ejemplo, puede usarse polietilenglicol (PEG), virus Sendai (también conocido como virus hemaglutinador de Japón o HVJ) o similares como el promotor de fusión celular. Si se desea, también puede añadirse un adyuvante tal como dimetil sulfóxido para potenciar adicionalmente la eficacia de fusión.

60 Los inmunocitos y células de mieloma pueden mezclarse en cualquier proporción. Por ejemplo, es preferible que el número de inmunocitos sea de 1 a 10 veces el número de células de mieloma. Los ejemplos del medio de cultivo usados para la célula incluyen, por ejemplo, medio de cultivo RPMI1640 o medio de cultivo MEM, que son particularmente adecuados para el crecimiento de las líneas celulares de mieloma anteriormente mencionadas, y otros medios de cultivo convencionales que se usan para cultivar células de este tipo. Además puede usarse un complemento del suero tal como suero de ternero fetal (FCS) en combinación.

65 La fusión celular se llevó a cabo mezclando exhaustivamente cantidades prescritas de los inmunocitos y células de mieloma anteriormente mencionados en el medio de cultivo anteriormente mencionado; añadiendo una solución de PEG (por ejemplo, con un peso molecular medio de aproximadamente 1000 a 6000) con una concentración

generalmente del 30 al 60% (p/v) que se ha precalentado a aproximadamente 37 °C; y después mezclándolas para permitir la formación de células fusionadas (hibridomas) de interés. Posteriormente, se añade un medio adecuado y se centrifuga para retirar el sobrenadante. Este procedimiento se repite para retirar el agente de fusión celular y otros materiales desfavorables para el crecimiento del hibridoma.

5 Los hibridomas obtenidos de este modo se seleccionan después cultivándolos en un medio de cultivo de selección convencional tal como medio de cultivo HAT (medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo en este medio de cultivo HAT se continúa durante un periodo de tiempo suficiente para que células (células no fusionadas) distintas de los hibridomas deseados mueran (normalmente de varias días a varias semanas). Un
10 procedimiento de dilución limitante convencional se lleva a cabo después para explorar y monoclonar el hibridoma que produce el anticuerpo deseado.

Además del método anteriormente mencionado para obtener un hibridoma inmunizando un animal humano con antígeno, los anticuerpos humanos deseados que muestran una actividad de unión para glipicano 3 también pueden
15 obtenerse sensibilizando linfocitos humanos para glipicano 3 *in vitro* y fusionando los linfocitos sensibilizados con células de mieloma derivadas de seres humanos que tienen una capacidad de división permanente (véase Publicación de Patente Japonesa N° Hei 1-59878). Además, el glipicano 3 puede administrarse como un antígeno a un animal transgénico que tiene el repertorio completo de genes de anticuerpo humanos; pueden obtenerse
20 posteriormente células que producen anticuerpo anti-glipicano 3; y puede obtenerse humano contra glipicano 3 de células producidas inmortalizando las células productoras de anticuerpo anti-glipicano 3 (véase Publicaciones de Patente Internacional N° WO 94/25585, WO 93/12227, WO 92/03918 y WO 94/02602).

El hibridoma productor de anticuerpo monoclonal preparado de este modo puede cultivarse en serie en un medio de cultivo convencional o puede almacenarse a largo plazo en nitrógeno líquido.

25 Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales del hibridoma, por ejemplo, cultivando el hibridoma por un método convencional y recuperando los anticuerpos monoclonales del sobrenadante de cultivo, o administrando y cultivando el hibridoma en un mamífero compatible con el hibridoma y obteniendo los anticuerpos monoclonales del líquido ascítico. El método anterior es adecuado para obtener anticuerpo de alta pureza, mientras que el segundo método
30 es adecuado para la producción masiva de anticuerpo.

El anticuerpo monoclonal usado en la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal recombinante preparado por técnicas de ingeniería genética clonando el gen de anticuerpo del hibridoma, integrando el gen en un vector apropiado, introduciendo el vector en un hospedador, y provocando que el hospedador produzca el anticuerpo
35 monoclonal recombinante (por ejemplo, véase Vandamme, A. M. *et al.*, Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 1990).

Específicamente, el ARNm que codifica la región variable (V) de un anticuerpo anti-glipicano 3 se aísla de un hibridoma que produce anticuerpo anti-glipicano 3. El ARNm puede aislarse por un método conocido, por ejemplo, por preparación del ARN total por el método de ultracentrifugación de guanidina (Chirgwin, J. M. *et al.*, Biochemistry
40 (1979) 18, 5294-5299) o el método de AGPC (Chomczynski, P. *et al.*, Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159), seguido de preparación del ARNm de interés usando Kit de Purificación de ARNm (Pharmacia) o similares. 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 del ARNm obtenido de este modo usando transcriptasa inversa.
45 Puede llevarse a cabo síntesis de ADNc usando, por ejemplo, un Kit de Síntesis de ADNc de Primera Cadena de Transcriptasa Inversa AMV (Seikagaku Corporation) o similares. También puede llevarse a cabo síntesis de ADNc y amplificación, por ejemplo, mediante el método de 5'-RACE usando un Kit FINDER RACE 5'-Ampli (Clontech) y 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).

50 El fragmento de ADN diana se purifica del producto de PCR obtenido de este modo y después se liga en un ADN de vector para preparar un vector recombinante. El vector se introduce después en, por ejemplo, *E. coli*; y la selección de colonia produce el vector recombinante deseado. La secuencia de nucleótidos del ADN diana se determina después por un método conocido, tal como el método de terminación de cadena de dideoxinucleótidos.

55 Después de haberse obtenido el ADN que codifica la región V del anticuerpo anti-glipicano 3 diana, este ADN se integra en un vector de expresión que contiene ADN que codifica la región constante (región C) del anticuerpo deseado.

60 Para producir el anticuerpo anti-glipicano 3 para su uso en la presente invención, el gen del anticuerpo se integra en un vector de expresión de tal manera que el gen se exprese bajo el control de una región de control de la expresión, por ejemplo, un potenciador y un promotor. A continuación, una célula hospedadora se transforma con el vector de expresión y se induce la expresión del anticuerpo.

65 El gen de anticuerpo puede expresarse integrando ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo (cadena H) y ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo (cadena L) por separado en vectores de expresión y después

transformando simultáneamente una célula hospedadora con estos vectores; o integrando ADN que codifican la cadena H y la cadena L en un único vector de expresión y transformando una célula hospedadora con este vector (véase documento WO 94/11523).

5 Además de una célula hospedadora como se ha descrito anteriormente, un animal transgénico puede usarse para producir anticuerpo recombinante. Por ejemplo, puede prepararse un gen fusionado insertando el gen del anticuerpo en un gen que codifica una proteína (por ejemplo, caseína- β de cabra) que se producirá en la leche. Se inyecta después un fragmento de ADN que contiene el gen fusionado con el gen de anticuerpo insertado en un embrión de cabra y el embrión se introduce en una cabra hembra. El anticuerpo deseado puede obtenerse de la leche producida por la cabra transgénica (o su descendencia) nacida de la cabra que ha recibido el embrión. Además, pueden administrarse hormonas adecuadas a la cabra transgénica para aumentar el volumen de leche producida por la cabra transgénica que contiene el anticuerpo deseado (Ebert, K. M. *et al.*, *Bio/Technology* (1994) 12, 699-702).

10 Además de los anticuerpos citados anteriormente, la presente invención puede hacer uso de anticuerpos genéticamente recombinantes modificados artificialmente, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, para los fines de reducir la heteroantigenicidad para seres humanos. Estos anticuerpos modificados pueden producirse por métodos ya conocidos.

15 Pueden obtenerse anticuerpos quiméricos ligando ADN que codifica la región V del anticuerpo (obtenida como se ha descrito anteriormente) con ADN que codifica la región C del anticuerpo humano, integrando el producto en un vector de expresión y después introduciendo el vector en un hospedador e induciendo la producción. Pueden obtenerse anticuerpos quiméricos útiles para la presente invención por dichos métodos ya conocidos.

20 Se preparan anticuerpos humanizados, que también se denominan anticuerpos humanos reformados, mediante injerto de una región determinante de complementariedad (CDR) de anticuerpo de un mamífero no humano, tal como ratón, en la región determinante de complementariedad de un anticuerpo humano. También se conocen en este campo técnicas de recombinación génica generales para este procedimiento (véase documentos EP 125023 y WO 96/02576).

25 Específicamente, se sintetiza una secuencia de ADN diseñada para ligar la CDR de un anticuerpo de ratón con la región marco conservada (FR) de un anticuerpo humano por PCR usando como cebadores varios oligonucleótidos contruidos para tener regiones que solapen con las regiones terminales tanto de la CDR como la FR (véase el método descrito en el documento WO 98/13388).

30 Se selecciona una región marco conservada en la que la región determinante de complementariedad forma un excelente sitio de unión a antígeno para la región marco de anticuerpo humano ligada con las regiones CDR. Los aminoácidos en la región marco en la región variable de anticuerpo pueden sustituirse según sea necesario para que la región determinante de complementariedad del anticuerpo humano reformado forme un sitio de unión a antígeno apropiado (Sato, K. *et al.*, *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856).

35 Se usan regiones C de anticuerpo humano para las regiones C de anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Por ejemplo, C γ 1, C γ 2, C γ 3 y C γ 4 pueden usarse para la cadena H y C κ y C λ pueden usarse para la cadena L. Además, la región C de anticuerpo humano puede modificarse para mejorar la estabilidad del anticuerpo o su proceso de producción.

40 Un anticuerpo quimérico consiste en la región variable de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y una región constante derivada de un anticuerpo humano, mientras que un anticuerpo humanizado consiste en una región determinante de complementariedad de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y una región marco y región C derivada de un anticuerpo humano. Puesto que el anticuerpo humanizado se diseña para tener una baja antigenicidad en seres humanos, es útil como un principio activo en el agente terapéutico de acuerdo con la presente invención.

45 El anticuerpo usado en la presente invención no se limita a la molécula de anticuerpo completa siempre que pueda unirse al glicoproteína 3 e inhibir la actividad de glicoproteína 3, y por lo tanto abarca fragmentos de anticuerpo y modificaciones de los mismos, así como anticuerpos divalentes y anticuerpos monovalentes. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, F(ab')₂, Fv, Fab/c que tiene un Fab y un Fc completo y Fv de cadena sencilla (scFv) en el que Fv de cadena H o cadena L se liga por un enlazador apropiado. Específicamente, un fragmento de anticuerpo puede producirse tratando un anticuerpo con una enzima tal como papaína o pepsina. Como alternativa, puede construirse un gen que codifique dicho fragmento de anticuerpo e introducirse en vectores de expresión y expresarse por células hospedadoras apropiadas (véase, por ejemplo, Co, M.S. *et al.*, *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976, Better, M. y Horwitz, A. H. *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Plueckthun, A. y 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, Bird, R. E. *et al.*, *TIBTECH* (1991) 9, 132-137).

65

ScFv se obtiene ligando una región V de cadena H y región V de cadena L de anticuerpo. La región V de cadena H y la región V de cadena L se ligan en scFv a través de un enlazador y preferentemente un enlazador peptídico (Huston, J. S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883). La región V de cadena H y región V de cadena L de scFv pueden derivar de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. El enlazador peptídico que liga las regiones V pueden ser, por ejemplo, cualquier péptido monocatenario que comprenda de 12 a 19 restos de aminoácidos.

El ADN que codifica scFV puede obtenerse como sigue. El ADN que codifica la cadena H o región V de cadena H del anticuerpo anteriormente mencionado y ADN que codifica la cadena L o región V de cadena L se amplifican por PCR usando como moldes regiones de ADN que codifican todas o las deseadas de secuencias de aminoácidos de las secuencias anteriormente mencionadas y pares de cebadores que especifican ambos extremos de las mismas. Después se llevó a cabo amplificación adicional con una combinación de ADN que codifica una región enlazadora peptídica y un par de cebadores que define ambos extremos para ligar con la cadena H y cadena L.

Además, una vez que se ha preparado ADN que codifica scFV, puede obtenerse un vector de expresión que contiene este ADN y un hospedador transformado con el vector de expresión de acuerdo con métodos convencionales. El scFV puede obtenerse después por métodos convencionales usando dicho hospedador.

Puede producirse un fragmento de anticuerpo preparando un gen que codifica el fragmento y expresándolo en un hospedador de la misma manera que se ha descrito anteriormente. El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento también abarca estos fragmentos de anticuerpo.

Otro ejemplo de un anticuerpo modificado usado en la invención es anticuerpo anti-glipicano conjugado con cualquiera de diversas moléculas, tales como polietilenglicol (PEG). El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento también abarca estos anticuerpos modificados. Dicho anticuerpo modificado puede prepararse modificando químicamente un anticuerpo obtenido como anteriormente. Ya se han establecido en la técnica métodos de modificación de anticuerpos.

El anticuerpo usado en la presente invención puede ser un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico pueden tener sitios de unión a antígeno que reconocen diferentes epítomos en la molécula de glipicano 3, o un sitio de unión de antígeno puede reconocer el glipicano 3 y el otro sitio de unión a antígeno puede reconocer una sustancia citotóxica tal como un agente quimioterapéutico o toxina derivada de células. Esto permite que la sustancia citotóxica actúe directamente en una célula que expresa glipicano 3, dañando específicamente de este modo células tumorales y suprimiendo la proliferación de células tumorales. Puede prepararse un anticuerpo biespecífico ligando los pares H-L de dos tipos de anticuerpos. También puede obtenerse fusionando hibridomas que producen diferentes anticuerpos monoclonales para preparar células fusionadas productoras de anticuerpos biespecíficos. También pueden prepararse anticuerpos biespecíficos mediante técnicas de ingeniería genética.

Un gen de anticuerpo construido como se ha descrito anteriormente puede expresarse y obtenerse por métodos conocidos. En el caso de células de mamífero, puede expresarse un gen ligando funcionalmente un promotor eficaz usado habitualmente, el gen de anticuerpo para expresar y una señal poliA en su lado cadena abajo 3'. Un ejemplo del promotor/potenciador es promotor/potenciador temprano inmediato de citomegalovirus humano.

Los ejemplos de otros promotores/potenciadores que pueden usarse en la presente invención para expresión del anticuerpo incluyen, por ejemplo, promotor viral/potenciadores de retrovirus, virus de polioma, adenovirus o virus de simio 40 (SV40) y promotor/potenciadores derivados de células de mamífero, tales como factor de elongación humano 1 α (HEF1 α).

Cuando se usa un promotor/potenciador SV40, la expresión génica puede llevarse a cabo fácilmente por el método de Mulligan *et al.* (Nature (1979) 277, 108) y cuando se usa un promotor/potenciador HEF1 α , la expresión génica puede llevarse a cabo fácilmente por el método de Mizushima *et al.* (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322).

En el caso de *E. coli*, la expresión génica puede conseguirse ligando funcionalmente un promotor eficaz usado habitualmente, una secuencia señal para secreción de anticuerpo y el gen de anticuerpo para expresar. El promotor puede ejemplificarse por el promotor lacZ y el promotor araB. Cuando se usa el promotor lacZ, puede conseguirse expresión por el método de Ward *et al.* (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427), y cuando se usa el promotor araB, puede conseguirse expresión por el método de Better *et al.* (Science (1988) 240, 1041-1043).

Con respecto a la secuencia señal para secreción de anticuerpo, la secuencia señal pelB (Lei, S. P. *et al.* J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) puede usarse cuando se produce el anticuerpo en el periplasma de *E. coli*. Después de que se haya aislado el anticuerpo producido en el periplasma, la estructura de anticuerpo se repliega apropiadamente para su uso.

El origen de la aplicación usado en la invención incluye, por ejemplo, los derivados de SV40, virus de polioma, adenovirus o virus de papiloma bovino (BPV). Para amplificar el número de copias génicas en el sistema de célula hospedadora, el vector de expresión puede contener, por ejemplo, en gen de aminoglicósido transferasa (APH), gen

de timidina quinasa (TK), gen de xantina guanina fosforribosiltransferasa de *E. coli* (Ecogpt) o gen de dihidrofolato reductasa (dhfr) como un marcador de selección.

5 Puede usarse cualquier sistema de expresión, por ejemplo, un sistema de células eucariotas o un sistema de células procariotas, para producir el anticuerpo usado en la presente invención. Los ejemplos de células eucariotas incluyen células animales tales como un sistema celular de mamífero establecido o sistema celular de insecto y células de verdaderos hongos filamentosos y células de levadura. Los ejemplos de células procariotas incluyen células bacterianas tales como células de *E. coli*.

10 El anticuerpo usado en la presente invención se expresa preferentemente en células de mamífero tales como células CHO, COS, de mieloma, BHK, Vero o HeLa.

15 La célula hospedadora transformada se cultiva después *in vitro* o *in vivo* para inducir producción del anticuerpo de interés. La célula hospedadora puede cultivarse de acuerdo con métodos conocidos. Por ejemplo, puede usarse DMEM, MEM, RPMI1640 o IMDM como el medio de cultivo. También puede usarse un complemento de suero tal como suero de ternero fetal (FCS).

20 Pueden usarse medios conocidos para ensayar la actividad de unión de antígeno de un anticuerpo usado en la presente invención (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) y para medir su actividad inhibidora de unión ligando-receptor (Harada, A. *et al.*, International Immunology (1993) 5, 681-690).

25 La actividad de unión a antígeno de anticuerpo anti-glicano 3 usado en la presente invención puede medirse usando ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), EIA (inmunoensayo enzimático), RIA (radioinmunoensayo) o una técnica de anticuerpo fluorescente. En un inmunoensayo enzimático, por ejemplo, la actividad de unión a antígeno puede evaluarse añadiendo una muestra que contenga el anticuerpo anti-glicano 3, tal como el sobrenadante de cultivo de células productoras de anticuerpo anti-glicano 3 o el anticuerpo purificado, a una placa recubierta con glicano 3; añadiendo un anticuerpo secundario marcado con una enzima tal como fosfatasa alcalina; incubando y después lavando la placa; añadiendo un sustrato enzimático tal como p-nitrofenil fosfato; y midiendo la absorbancia. La citotoxicidad del anticuerpo usado en la presente invención puede medirse por métodos conocidos por los expertos en la materia.

35 La actividad ADCC puede medirse mezclando células efectoras, células diana y anticuerpo anti-glicano 3 y determinando después el nivel de ADCC. Por ejemplo, pueden usarse esplenocitos de ratón o monocitos aislados de médula ósea o sangre periférica humana como las células efectoras. Los ejemplos de una célula diana incluyen una línea celular establecida humana, tal como la línea celular de hepatoma humano HuH-7. La actividad ADCC puede medirse marcando preliminarmente las células diana con ⁵¹Cr; añadiendo anticuerpo anti-glicano 3 a las células; incubando las células; añadiendo después células efectoras en una relación apropiada con respecto a las células diana; recogiendo el sobrenadante después de incubación; y contando la radioactividad en el sobrenadante.

40 La actividad CDC puede medirse mezclando las células diana marcadas anteriormente mencionadas con anticuerpo anti-glicano 3; añadiendo complemento e incubando; y después contando la radioactividad en el sobrenadante.

45 Puesto que se requiere generalmente una región Fc para que un anticuerpo ejerza citotoxicidad, el anticuerpo anti-glicano 3 usado en la presente invención preferentemente contiene una región Fc en los casos en los que el inhibidor de crecimiento celular de la presente invención utiliza la actividad citotóxica del anticuerpo.

50 El agente antineoplásico de acuerdo con la presente invención es para su uso en un método para prevenir la reaparición de cáncer de micrometástasis intrahepática en un paciente después de un tratamiento por resección de cáncer para cáncer de hígado, donde el glicano 3 se expresa en las células de cáncer de hígado resecaado.

55 La dosis eficaz se selecciona del intervalo de 0,001 mg a 1000 mg por kg de peso corporal por administración. O, puede seleccionarse una dosis del intervalo de 0,01 a 100000 mg/cuerpo por paciente. Sin embargo, la dosis eficaz del agente antineoplásico de acuerdo con la presente invención que contiene anticuerpo anti-glicano 3 no se limita a las dosis anteriormente descritas.

60 El agente antineoplásico de acuerdo con la presente invención generalmente se administra por una vía parenteral, por ejemplo, por inyección (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal) o una vía transdérmica, transmucosa, nasal o pulmonar. También puede administrarse por vía oral.

65 Con respecto al momento de administración del agente antineoplásico de acuerdo con la presente invención, puede administrarse antes o después de la aparición de los síntomas clínicos de la enfermedad. De acuerdo con a, el agente antineoplásico de acuerdo con la presente invención se administra como terapia de adyuvante después de la resección de células de cáncer de hígado.

Un agente terapéutico que comprende el anticuerpo anti-glipicano 3 de acuerdo con la presente invención como un principio activo puede formularse por métodos convencionales (Remington's Pharmaceutical Science, última edición, Mark Publishing Company, Easton, Estados Unidos) y puede contener vehículos y aditivos farmacéuticamente aceptables.

Estos vehículos y aditivos farmacéuticos pueden incluir agua, disolventes orgánicos farmacéuticamente aceptables, colágeno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polímero de carboxivinilo, carboximetil celulosa sódica, poliacrilato sódico, alginato sódico, dextrano soluble en agua, carboximetil almidón sódico, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma de xantano, 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 aceptable como un aditivo farmacéutico.

Dicho aditivo o aditivos pueden seleccionarse de forma apropiada de acuerdo con la forma de dosificación del agente terapéutico de la presente invención, pero no se limita a los enumerados anteriormente. Por ejemplo, puede prepararse una formulación inyectable disolviendo anticuerpo anti-glipicano 3 purificado en un disolvente tal como solución salina fisiológica, tampón o una solución de glucosa, y añadiendo después un inhibidor de adsorción tal como Tween 80, Tween 20, gelatina o albúmina de suero humano a la solución. O, el agente liofilizado puede usarse para preparar una forma de dosificación, que se reconstituye por disolución antes de su uso. Los ejemplos del excipiente usado para liofilizar incluyen alcoholes de azúcares y sacáridos tales como manitol y glucosa.

Ejemplos

La presente invención se describe en más detalle por los ejemplos proporcionados a continuación, pero estos ejemplos no limitan el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Eficacia del anticuerpo anti-glipicano 3 humano de ratón GC33 en modelo de ratón de trasplante intrahepático

(1) Medición de α -fetoproteína (AFP)

La concentración en suero de AFP humana se midió como un marcador tumoral usando un kit de ELISA para medición de AFP humana (Hope Laboratories). El límite de detección por ELISA es de aproximadamente 1 ng/ml y se interpretó que las muestras por debajo del límite de detección eran 1 ng/ml. Para obtener el suero, se recogió sangre en un Separapit S (Sekisui Chemical) mediante recogida de sangre orbital, se permitió que reposara durante 15 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugó durante 20 minutos a $1200 \times g$.

(2) Preparación de modelo de ratón de trasplante intrahepático

Se preparó un modelo de ratón de trasplante intrahepático como sigue. Se ajustaron células HepG2 (ATCC) a 1×10^8 /ml usando medio de Hanks (Sigma). Con anestesia de nembutal, se inyectaron 50 μ l de la suspensión de células HepG2 (5×10^6 /ratón) dentro de la cápsula de hígado de ratones desnudos (Charles River). La concentración de AFP en suero se midió el día 21 después del trasplante, y los animales con el intervalo de 10-100 ng/ml se dividieron en dos grupos ($n = 4$). En este momento, las células de cáncer de hígado (masa tumoral) no se observaron visualmente. Estos animales representan un modelo que porta micrometástasis intrahepáticas que sobreviven después de la resección de hígado.

(3) Administración de anticuerpo

La formulación de administración se preparó el día de la administración diluyendo anticuerpo anti-glipicano 3 humano de ratón GC33 (véase el Ejemplo de Referencia posterior) a 0,5 mg/ml en solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical). La formulación se administró al modelo de ratón anteriormente mencionado a 10 ml/kg a través de la vena de cola los días 21^o y 28^o después del trasplante de tumor. El vehículo de solución salina fisiológica se administró de la misma manera para el control negativo.

(4) Evaluación del efecto antitumoral

El efecto antitumoral se evaluó basándose en la concentración de AFP el día 35^o después del trasplante de tumor. Como se muestra en la Figura 1, la concentración de AFP el día 35^o después de trasplante de tumor fue menor para el grupo que recibió GC33 que para el grupo que recibió vehículo, lo que indica que el anticuerpo de la invención tiene un efecto antitumoral.

Como se ha mostrado en los resultados anteriores, GC33 mostró un efecto antitumoral en el modelo de trasplante intrahepático, lo que sugiere que el anticuerpo de la invención es útil en terapia adyuvante.

Ejemplo 2Ensayo de administración temprana de anticuerpo anti-glicicano 3 humano de ratón GC33 en modelo de ratón de trasplante intrahepático

5

(1) Medición de α -fetoproteína (AFP)

La concentración en suero de AFP humana se midió como un marcador tumoral usando un kit de ELISA para medición de AFP humana (Hope Laboratories). El límite de detección por ELISA es de aproximadamente 1 ng/ml y se considera que las muestras por debajo del límite de detección son 1 ng/ml. Para obtener el suero, se recogió sangre en un Separapit S (Sekisui Chemical) por recogida de sangre orbital, se permitió que reposara durante 15 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugó durante 20 minutos a $1200 \times g$.

10

(2) Preparación de modelo de ratón de trasplante intrahepático

15

Se preparó un modelo de ratón de trasplante intrahepático como sigue. Se ajustaron células HepG2 (ATCC) a 1×10^8 /ml usando medio de Hanks (Sigma). Con anestesia de nembutal, se inyectaron 50 μ l de la suspensión de células HepG2 (5×10^6 /ratón) dentro de la cápsula de hígado de ratones desnudos (Charles River). El día después del trasplante los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos ($n = 10$). Aunque HepG2 estaba presente en el hígado de ratón el día después del trasplante, no se detectó AFP humana en el suero de ratón en ese momento. Estos animales representan un modelo clínicamente más cercano que porta micrometástasis intrahepáticas que permanecen después de la resección de hígado.

20

(3) Administración de anticuerpo

25

La formulación de administración se preparó el día de la administración diluyendo anticuerpo anti-glicicano 3 humano de ratón GC33 (véase el Ejemplo de Referencia posterior) a 0,5 mg/ml en solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical). La formulación se administró al modelo de ratón anteriormente mencionado a 10 ml/kg a través de la vena de cola el día después de trasplante de tumor y el día 7^o después del trasplante de tumor. El vehículo de solución salina fisiológica se administró de la misma manera para el control negativo.

30

(4) Evaluación del efecto antitumoral

El efecto antitumoral se evaluó basándose en la concentración de AFP el día 15^o y 40^o después del trasplante de tumor. Como se muestra en la Figura 2, no se vio un aumento de la concentración de AFP para ninguno de los puntos temporales en el grupo que recibió GC33. Por el contrario, se observó un aumento en la concentración de AFP en el grupo que recibió el vehículo.

35

Como se ha mostrado en los resultados anteriores, también se inhibió el crecimiento tumoral en un modelo en el que se trasplantaron de forma intrahepática células de cáncer de hígado, administrando anticuerpo anti-glicicano 3 humano de ratón GC33 de un estadio temprano en el que no se detectó AFP, lo que indica que el anticuerpo de la invención es útil en terapia adyuvante.

40

Ejemplo de Referencia

45

Preparación de anticuerpo anti-glicicano 3 humano de ratón GC33

Usando como inmunógeno una proteína de fusión (GC-3) de GST y el péptido de la alanina en posición 524 a la lisina en posición 563 de glicicano 3, se inmunizaron tres ratones Balb/c (obtenidos de Charles River Japan) y tres ratones MRL/lpr. En la inmunización inicial, la emulsión preparada con FCA y ajustada a 100 μ g de GC-3 por cabeza se administró por vía subcutánea. Después de dos semanas, se administró por vía subcutánea una emulsión preparada con FIA y ajustada a 50 μ g por cabeza. Después de la quinta inmunización, se inyectaron 50 μ g por cabeza en la vena de la cola de todos los ratones como inmunización final, y después se llevó a cabo fusión celular. El hibridoma se exploró mediante ELISA usando inmunoplasmas en las que se había inmovilizado proteína principal GPC3 soluble (la región hidrófoba de los aminoácidos 564 a 580 en el lado C terminal se suprime). Se seleccionaron clones positivos y se monoclonaron por el método de dilución limitante. De esta manera, se obtuvo el anticuerpo GC33 que mostraba una fuerte actividad de unión para GPC3. La secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena H y cadena L de GC33 se muestran en SEC ID N^o: 3 y SEC ID N^o: 4, respectivamente.

55

60 Aplicabilidad industrial

El agente antineoplásico de acuerdo con la presente invención es útil para prevenir el cáncer y evitar la reaparición de cáncer.

65

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha

5 <120> Terapia adyuvante con el uso de anticuerpos anti-glipicano 3

<130> N100926

<140> EP 05780979.0

10 <141> 23-08-2005

<150> PCT/JP05/15607

<151> 23-08-2005

15 <150> JP 2005-90945

<151> 28-03-2005

<150> JP 2004-244273

<151> 24-08-2004

20 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

25 <211> 1743

<212> ADN

<213> Homo sapiens

30 <400> 1

atggcggga	cggcgcac	cgcgtgcttg	gtggggcga	tgctgctcag	cttggacttc	60
ccgggacagg	cgcagcccc	gccgcgcccg	ccggagccca	cctgtcacca	agtcgctcc	120
ttctccaga	gactgcagcc	cggactcaag	tgggtgccag	aaactcccgt	gccaggatca	180
gatttgcaag	tatgtctccc	taagggccca	acatgctgct	caagaaagat	ggaagaaaaa	240
taccaactaa	cagcacgatt	gaacatggaa	cagctgcttc	agtctgcaag	tatggagctc	300
aagttcttaa	ttattcagaa	tgctgcggtt	ttccaagagg	cctttgaaat	gttggtcgc	360
catgccaa	actacaccaa	tgccatgttc	aagaacaact	acccaagcct	gactccacaa	420
gcttttgagt	ttgtgggtga	atttttcaca	gatgtgtctc	tctacatctt	gggtctctgac	480
atcaatgtag	atgacatggt	caatgaattg	tttgacagcc	tgtttccagt	catctatacc	540
cagctaata	acccaggcct	gcctgattca	gccttgga	tcaatgagtg	cctccgagga	600
gcaagacgtg	acctgaaagt	atgtgggaat	ttccccagc	ttattatgac	ccagggttcc	660
aagtcaactg	aagtcaactg	gatcttccct	caggtctgga	atcttggaa	tgaagtgatc	720
aacacaactg	atcacctgaa	gttcagtaag	gactgtggcc	gaatgctcac	cagaatgtgg	780
tactgctctt	actgccaggg	actgatgatg	gttaaaccct	gtggcggtta	ctgcaatgtg	840
gtcatgcaag	gctgtatggc	agggtgtggg	gagattgaca	agtactggag	agaatacatt	900
ctgtcccttg	aagaacttgt	gaatggcatg	tacagaatct	atgacatgga	gaacgtactg	960
cttggctctt	tttcaacaat	ccatgattct	atccagtatg	tccagaagaa	tgccagaaaag	1020
ctgagacca	ctattggcaa	gttatgtgcc	cattctcaac	aacgccaa	tagatctgct	1080
tattatctctg	aagatctctt	tattgacaag	aaagtattaa	aagttgctca	tgtagaacat	1140
gaagaaacct	tatccagccg	aagaagggaa	ctaattcaga	agttgaagtc	ttcatcagc	1200
ttctatagtg	ctttgcctgg	ctacatctgc	agccatagcc	ctgtggcggg	aaacgacacc	1260
ctttgctgga	atggacaaga	actcgtggag	agatacagcc	aaaaggcagc	aaggaatgga	1320
atgaaaaacc	agttcaatct	ccatgagctg	aaaatgaagg	gccctgagcc	agtggtcagt	1380
caaatatttg	acaaactgaa	gcacattaac	cagctcctga	gaaccatgtc	tatgcccaaa	1440
ggtagagttc	tggataaaaa	cctggatgag	gaagggtttg	aaagtgagga	ctgaggatgat	1500
gatgaagatg	agtgcattgg	aggctctggt	gatggaatga	taaaagtgaa	gaatcagctc	1560
cgcttccttg	cagaactggc	ctatgatctg	gatgtggatg	atgcccctgg	aaacagtcag	1620
caggcaactc	cgaaggacaa	cgagataagc	acctttcaca	acctcgggaa	cgttcattcc	1680
ccgctgaagc	ttctcaccag	catggccatc	tcgggtggtg	gcttctctt	cctgggtgcac	1740
tga						1743

<210> 2

<211> 580

35 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Gly Thr Val Arg Thr Ala Cys Leu Val Val Ala Met Leu Leu
1 5 10 15
Ser Leu Asp Phe Pro Gly Gln Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp
20 25 30
Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly
35 40 45
Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val
50 55 60
Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys
65 70 75 80
Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala
85 90 95
Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln
100 105 110
Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala
115 120 125
Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe
130 135 140
Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp
145 150 155 160
Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro
165 170 175
Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu
180 185 190
Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe
195 200 205
Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln
210 215 220
Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile
225 230 235 240
Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu
245 250 255
Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys
260 265 270
Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly
275 280 285
Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu
290 295 300
Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu
305 310 315 320
Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys
325 330 335
Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser
340 345 350
Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile
355 360 365
Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala His Val Glu His Glu Glu Thr Leu
370 375 380
Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser
385 390 395 400
Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala
405 410 415
Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr
420 425 430

Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His
 435 440 445
 Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp
 450 455 460
 Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys
 465 470 475 480
 Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly
 485 490 495
 Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu Cys Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly
 500 505 510
 Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr
 515 520 525
 Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro
 530 535 540
 Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser
 545 550 555 560
 Pro Leu Lys Leu Leu Thr Ser Met Ala Ile Ser Val Val Cys Phe Phe
 565 570 575
 Phe Leu Val His
 580

5 <210> 3
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 3

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

10 <210> 4
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus

<400> 4

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

ES 2 422 898 T3

Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Asn
				85					90					95	
Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti-glipicano 3 para su uso en un método para evitar la reaparición de cáncer de micrometástasis intrahepática en un paciente después de un tratamiento por resección de cáncer para cáncer de hígado, donde se expresa glipicano 3 en las células de cáncer de hígado resecaado.
- 10 2. Un anticuerpo anti-glipicano 3 para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo se administra de modo que no se observe un aumento de la concentración de AFP en el suero del paciente.
- 15 3. Un anticuerpo anti-glipicano para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el anticuerpo es anticuerpo monoclonal.
4. Un anticuerpo anti-glipicano 3 para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 3, donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado.
5. Un anticuerpo anti-glipicano 3 para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 4, donde el anticuerpo humanizado comprende las CDR de una región variable de cadena pesada como se expone en SEC ID N°: 3 y las CDR de una región variable de cadena ligera como se expone en SEC ID N°: 4.

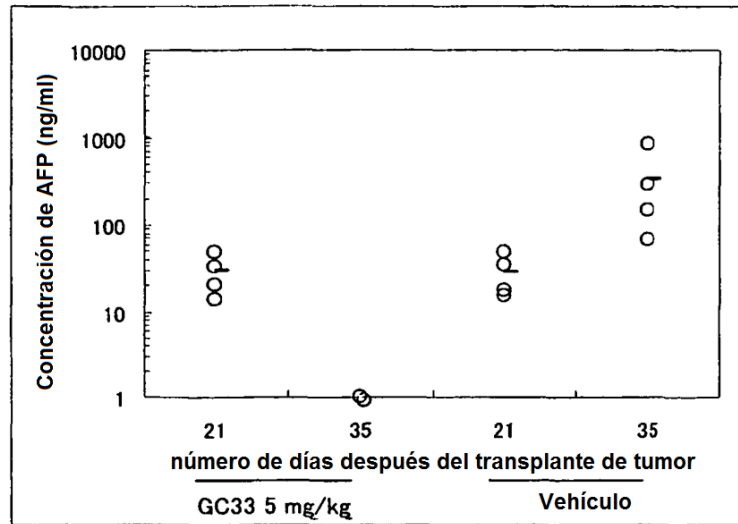


FIG. 1

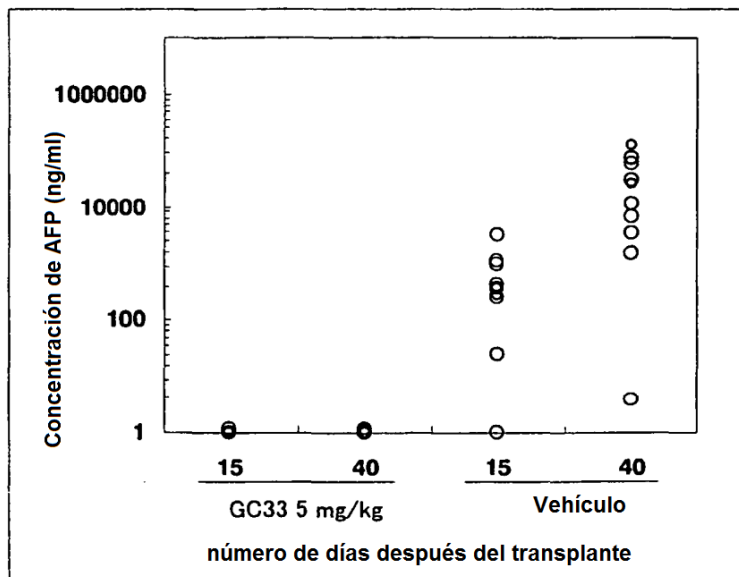


FIG. 2