

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 470 374**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2006 E 06825738 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 1933872**

54 Título: **Anticuerpo anti-glipicano 3**

30 Prioridad:

**14.10.2005 US 251561**

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

**23.06.2014**

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (50.0%)  
5-1, Ukima 5-chome Kita-ku  
Tokyo 115-8543, JP y  
XENCOR, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LAZAR, GREGORY ALAN;  
DAHIYAT, BASSIL I.;  
OKABE, HISAFUMI;  
SUGIMOTO, MASAMICHI;  
IJIMA, SHIGEYUKI y  
SUGO, IZUMI**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 470 374 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-glipicano 3

### 5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-glipicano 3. Específicamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-glipicano 3 que presenta modificaciones en la secuencia de aminoácidos de la región Fc y muestra un aumento de la actividad ADCC.

10

### ANTECEDENTES

Glipicano 3 (GPC3) es un miembro de la familia de proteoglicanos de heparán sulfato que aparecen en la superficie de las células y se sugiere que GPC3 puede participar en la división celular durante el desarrollo y crecimiento de las células cancerosas aunque su función aún no se ha aclarado bien.

15

Se ha encontrado que un determinado anticuerpo que se une a GPC3 tiene un efecto de inhibición del crecimiento celular a través de su actividad ADCC (citotoxicidad dependiente de anticuerpo) y CDC (citotoxicidad dependiente de complemento) (documento WO2003/000883, incorporado en este documento como referencia en su integridad).

20

En el caso en que se desarrolla un agente antineoplásico utilizando la actividad citotóxica de un anticuerpo, es deseable que el anticuerpo utilizado presente un aumento de la actividad ADCC. Por tanto, es deseable un anticuerpo anti-GPC3 que presente un aumento de la actividad citotóxica para el anticuerpo que reconoce GPC3.

25 Un objeto de la invención es proporcionar un anticuerpo anti-GPC3 que presenta un aumento de la citotoxicidad en comparación con los anticuerpos convencionales.

### RESUMEN

30 Se ha encontrado que puede obtenerse un anticuerpo anti-glipicano 3 con un aumento de la actividad ADCC modificando la secuencia de aminoácidos en la región Fc del anticuerpo.

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-glipicano 3 como se define en las reivindicaciones en las que uno o más de los restos de aminoácidos en las posiciones 239, 298, 326, 330 y 332 en la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos.

35

La presente descripción proporciona un anticuerpo anti-glipicano 3 seleccionado a partir del grupo compuesto por:

a) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que el resto de aminoácido de la posición 332 de la región Fc se sustituye por otro resto de aminoácido;

40

b) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que los restos de aminoácidos de las posiciones 239, 330 y 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos;

45 c) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que los restos de aminoácidos de las posiciones 239, 298 y 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos;

d) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que los restos de aminoácidos de las posiciones 239, 326 y 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos;

50

e) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que los restos de aminoácidos de las posiciones 239, 298, 326 y 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos.

La presente descripción proporciona un anticuerpo anti-glipicano 3 seleccionado a partir del grupo compuesto por:

55

a) un anticuerpo anti-glipicano 3 que tiene ácido glutámico en la posición 332 de la región Fc;

b) un anticuerpo anti-glipicano 3 que tiene ácido aspártico en la posición 239, leucina en la posición 330 y ácido glutámico en la posición 332 de la región Fc;

60

c) un anticuerpo anti-glipicano 3 que tiene ácido aspártico en la posición 239, alanina en la posición 298 y ácido glutámico en la posición 332 de la región Fc;

d) un anticuerpo anti-glipicano 3 que tiene ácido aspártico en la posición 239, treonina en la posición 326 y ácido glutámico en la posición 332 de la región Fc;

65

e) un anticuerpo anti-glipicano 3 que tiene ácido aspártico en la posición 239, alanina en la posición 298, ácido glutámico en la posición 326 y ácido glutámico en la posición 332 de la región Fc;

La presente descripción proporciona un anticuerpo anti-glipicano 3 seleccionado a partir del grupo compuesto por:

5 a) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que el resto de aminoácido de la posición 332 de la región Fc se sustituye por ácido glutámico;

10 b) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que los restos de aminoácidos de las posiciones 239, 330 y 332 de la región Fc están sustituidos por ácido aspártico, leucina y ácido glutámico, respectivamente;

c) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que los restos de aminoácidos de las posiciones 239, 298 y 332 de la región Fc están sustituidos por ácido aspártico, alanina y ácido glutámico, respectivamente;

15 d) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que los restos de aminoácidos de las posiciones 239, 326 y 332 de la región Fc están sustituidos por ácido aspártico, treonina y ácido glutámico, respectivamente;

20 e) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que los restos de aminoácidos de las posiciones 239, 298, 326 y 332 de la región Fc están sustituidos por ácido aspártico, alanina, ácido glutámico y ácido glutámico, respectivamente.

La presente descripción proporciona un agente antineoplásico que comprende el anticuerpo anti-glipicano 3 de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable, así como un procedimiento de tratamiento de un paciente con cáncer que comprende la administración al paciente del agente antineoplásico de la invención.

25 Además, la presente descripción proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo anti-glipicano 3 con un aumento de la citotoxicidad que comprende:

30 i) cultivar una célula huésped manipulada genéticamente para expresar un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que uno o más de los restos de aminoácidos en las posiciones 239, 298, 326, 330 y 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos; y

ii) aislar el anticuerpo a partir del cultivo.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento como se define en las reivindicaciones para producir un anticuerpo anti-glipicano 3 con un aumento de citotoxicidad que comprende:

i) cultivar una célula huésped manipulada genéticamente para expresar un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-glipicano 3 seleccionado a partir del grupo compuesto por:

40 a) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que el resto de aminoácido de la posición 332 de la región Fc se sustituye por otro resto de aminoácido;

45 b) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que los restos de aminoácidos de las posiciones 239, 330 y 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos;

c) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que los restos de aminoácidos de las posiciones 239, 298 y 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos;

50 d) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que los restos de aminoácidos de las posiciones 239, 326 y 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos;

e) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que los restos de aminoácidos de las posiciones 239, 298, 326 y 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos; y

55 ii) aislar el anticuerpo a partir del cultivo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento como se define en las reivindicaciones para producir un anticuerpo anti-glipicano 3 con un aumento de la citotoxicidad que comprende:

60 i) cultivar una célula huésped manipulada genéticamente para expresar un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-glipicano 3 seleccionado a partir del grupo compuesto por:

a) un anticuerpo anti-glipicano 3 que tiene ácido glutámico de la posición 332 de la región Fc;

65 b) un anticuerpo anti-glipicano 3 que tiene ácido aspártico de la posición 239, leucina de la posición 330 y ácido glutámico de la posición 332 de la región Fc;

c) un anticuerpo anti-glipicano 3 que tiene ácido aspártico de la posición 239, alanina de la posición 298 y ácido glutámico de la posición 332 de la región Fc;

5 d) un anticuerpo anti-glipicano 3 que tiene ácido aspártico de la posición 239, treonina de la posición 326 y ácido glutámico de la posición 332 de la región Fc;

e) un anticuerpo anti-glipicano 3 que tiene ácido aspártico de la posición 239, alanina de la posición 298, ácido glutámico de la posición 326 y ácido glutámico de la posición 332 de la región Fc; y

10

ii) aislar el anticuerpo a partir del cultivo.

Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-glipicano 3 como se define en las reivindicaciones seleccionado a partir del grupo compuesto por:

15

a) un anticuerpo anti-glipicano 3 que contiene el dominio CH2-CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 34;

20

b) un anticuerpo anti-glipicano 3 que contiene el dominio CH2-CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 35;

c) un anticuerpo anti-glipicano 3 que contiene el dominio CH2-CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 36;

25

d) un anticuerpo anti-glipicano 3 que contiene el dominio CH2-CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 37; y

e) un anticuerpo anti-glipicano 3 que contiene el dominio CH2-CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 38.

30

### DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

En la figura 1 se muestra el esquema de preparación del anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado con Fc modificado de la invención.

35

En la figura 2 se muestra el resultado del análisis por PAGE en presencia de SDS (PAGE-SDS) de un anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado con Fc modificado de la invención.

40

En la figura 3 se muestra una cromatografía de un anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado con Fc modificado y purificado que se analiza a través de una columna de filtración en gel.

En la figura 4 se muestra la actividad ADCC frente a células SK-03 de los anticuerpos anti-glipicano 3 humanizado con Fc modificado y de tipo silvestre, usando PBMC derivados de sangre periférica humana.

45

En la figura 5 se muestra la actividad ADCC frente a células HepG2 de los anticuerpos anti-glipicano 3 humanizado con Fc modificado y de tipo silvestre, usando células efectoras derivadas de médula ósea de ratón.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA

50

En la presente invención se proporciona un anticuerpo que presenta modificaciones en la región Fc. En la figura 1 se muestra la estructura y el esquema de preparación del anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado con Fc modificado de la invención.

55

En general, el anticuerpo es un heterotetrámero de aproximadamente 150.000 daltons y está compuesto por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a la cadena pesada a través de un puente disulfuro covalente y el número de puentes disulfuro entre las cadenas pesadas varía dependiendo del isotipo del anticuerpo. La cadena pesada y la cadena ligera tiene cada una puentes disulfuro intracatenarios a intervalos determinados. Cada cadena pesada tiene un dominio variable (VH) en uno de sus extremos y tiene muchos dominios constantes unidos a este. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL) en uno de sus extremos y tiene una región constante en el otro extremo de la misma. La región constante de la cadena ligera está en paralelo con respecto a la primera región constante de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera está en paralelo con respecto a la región variable de la cadena pesada. Se considera que restos de aminoácidos específicos forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada (Chothia y col., J. Mol. Biol., 186:651-666 (1985); Novotny y Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-4596 (1985)).

65

La cadena ligera de un anticuerpo derivado de un vertebrado puede clasificarse en dos tipos diferentes, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ) en función de la secuencia de aminoácidos de la región constante de las mismas. Además, el anticuerpo puede clasificarse en clases diferentes en función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada de la misma. El anticuerpo incluye al menos cinco clases principales:

5 IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunos de ellos pueden clasificarse en subclases (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; IgA1 e IgA2. Los dominios de la cadena constante de clases diferentes se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ . En la materia son conocidas la estructura de la subunidad y la estructura tridimensional de la inmunoglobulina de cada clase. También es sabido que existen alotipos en la secuencia de la región Fc de la IgG-1, por ejemplo, G1m(1), nG1m(1), G1m(2), G1m(3), nG1m(17), etc. (M. S. Schanfield y E. van Loghem, «Human Immunoglobulin Allotypes»  
10 andbook of Experimental Immunology, Vol.3, Cap. 94, Págs. 1-18, Blackwell Scientific Publishers. Oxford, U.K. 1986, 4ª Edición).

La región Fc significa una región de un fragmento Fc de una molécula de anticuerpo que comprende una parte de la región bisagra, los dominios CH2 y CH3 y tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000. La región Fc de la  
15 cadena pesada de la IgG humana comprende de la treonina 225 en el extremo C-terminal, en el caso de que la molécula se digiera con papaína (Burton, D. R 1985. Immunoglobulin G: functional sites. Mol. Immunol. 22:161-206).

La numeración de la posición de los aminoácidos utilizada en este documento hace referencia al procedimiento del «Índice UE» de Kabat y col. (Kabat EA y col., 1991, Sequence of Proteins of Immunological Interest. 5ª Ed. NIH).  
20

La región Fc se une a un receptor Fc (FcR) presente sobre la superficie celular de células efectoras, como macrófagos y células NK. El receptor Fc participa en la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC), en la reacción de anafilaxia, en la reacción de idiotipo, etc. El tipo de receptor Fc varía, dependiendo del subtipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, el receptor Fc de la IgG es el receptor Fc $\gamma$ , el receptor Fc de la IgE es el receptor Fc $\epsilon$   
25 y el receptor Fc de la IgA es el receptor Fc $\alpha$ .

El dominio CH2-CH3 consta del dominio CH2 y del dominio CH3. El dominio CH2-CH3 de una cadena pesada de la IgG humana es de la alanina 233 al extremo C terminal.

### 30 Anticuerpo con Fc modificado

El anticuerpo de la invención es un anticuerpo con Fc modificado en el que se ha modificado la secuencia de aminoácidos en la región Fc. «Modificación» o «mutagénesis específica de sitio (mutagénesis)» usado en la invención incluye sustituir un resto de aminoácido original (no modificado) por cualquier otro resto de aminoácido,  
35 delección de un resto de aminoácido original y adición de un resto de aminoácido adicional, aunque preferiblemente indica sustitución de un resto de aminoácido original por cualquier otro resto de aminoácido. La secuencia de aminoácidos original (sin modificar) como se refiere en este documento normalmente es una secuencia de una región Fc natural. En este contexto, «modificación» y «mutagénesis» de un resto de aminoácido se usan con el mismo significado.

40 En la invención, la modificación de un resto de aminoácido puede llevarse a cabo mediante la mutación del ADN que codifica el anticuerpo.

En la invención, «mutación del ADN» significa que el ADN se muta de forma que pueda corresponderse con el resto  
45 de aminoácido que se va a modificar. Más específicamente, significa que el ADN que codifica el resto de aminoácido original se muta en un ADN que codifica el resto de aminoácido que se va a modificar. En general, significa manipulación genética o tratamiento con mutagénesis para la inserción, delección o sustitución de al menos un nucleótido del ADN original para obtener un codón que codifique el resto de aminoácido pretendido. Específicamente, el codón que codifica el resto de aminoácido original se sustituye por el codón que codifica el resto  
50 de aminoácido que se va a modificar. Los expertos en la materia pueden realizar fácilmente dicha mutación de ADN según una técnica conocida, por ejemplo, según un procedimiento de mutagénesis específica de sitio como el procedimiento de mutagénesis mediante PCR (Hashimoto-Gogoh, T. y col., (1995) Gene 152, 271-275; Zoller, MJ y Smith, M., (1983) Methods Enzymol., 100, 468-500; Kramer, W. y col., (1984) Nucleic Acids, Res., 12, 9441-9456; Kramer W. y Fritz HJ, (1987) Methods Enzymol., 154, 350-367; Kunkel, TA, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82,  
55 488-492; Kunkel, (1988) Methods Enzymol., 85, 2763-2766).

El número de residuos de aminoácidos en la región Fc que se van a modificar en la invención no está específicamente limitado, aunque pueden modificarse uno o más restos de aminoácidos (por ejemplo de 1 a 30 o 2,  
60 3, 4 o 5).

Preferiblemente uno o más restos de aminoácidos de las posiciones 239, 298, 326, 330 y 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos. Además, cualquier resto de aminoácido de la región Fc puede sustituirse por aquellos de cualquier alotipo de IgG1, por ejemplo, por los restos de aminoácidos de G1m(1) y nG1m(1).

65 El anticuerpo anti-glicoproteína 3 de la invención no está específicamente limitado más allá de su unión a glicoproteína 3, aunque preferiblemente, el anticuerpo se une específicamente al glicoproteína 3. Se conocen la secuencia del gen y la

secuencia de aminoácidos del glipicano 3 (Lage, H. y col., Gene 188 (1997), 151-156). El anticuerpo anti-glipicano 3 de la invención es preferiblemente IgG, más preferiblemente IgG1.

#### Citotoxicidad

- 5 El anticuerpo anti-glipicano 3 de la invención que contiene la región Fc modificada muestra un aumento de la actividad citotóxica en comparación con el anticuerpo anti-glipicano 3 que tiene una región Fc natural o de tipo silvestre.
- 10 La actividad citotóxica incluye, por ejemplo, la actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y la actividad dependiente de complemento (CDC). En la invención, la actividad CDC significa una actividad citotóxica causada por el sistema del complemento y la actividad ADCC significa que, cuando se adhiere un anticuerpo específico al antígeno de la superficie celular de una célula diana, entonces, la célula que tiene un receptor Fcγ (p. j., un inmunocito) se une a la región Fc a través de un receptor Fcγ para alterar de este modo la
- 15 célula diana.

La determinación de si un anticuerpo tiene actividad ADCC o actividad CDC puede realizarse según un procedimiento conocido (por ejemplo, véase el capítulo 7 de Current Protocols in Immunology, Immunologic Studies in Humans, Editor, John E. Coligan y col., John Wiley & Sons, Inc. (1993)).

- 20 Por ejemplo, la actividad ADCC puede determinarse mezclando una célula efectora, una célula diana y un anticuerpo anti-glipicano 3 y analizando, a continuación, el grado de actividad ADCC. La célula efectora puede incluir, por ejemplo, un esplenocito de ratón, o un monocito aislado de médula ósea o sangre periférica humana. La célula diana puede incluir una línea celular humana establecida como la línea celular de hepatocito humano HuH-7.
- 25 Se añade un anticuerpo anti-glipicano 3 a la célula diana previamente marcada con <sup>51</sup>Cr y se incuba; a continuación se añade una célula efectora en una proporción adecuada a la célula diana. Tras la incubación, el sobrenadante se recoge y se analiza la radioactividad para determinar la actividad ADCC del anticuerpo.

- La actividad CDC puede terminarse mezclando la célula diana marcada mencionada anteriormente y un anticuerpo anti-glipicano 3, añadiendo un complemento a la mezcla e incubando y, a continuación, analizando la radiactividad en el sobrenadante.
- 30

#### Anticuerpo

- 35 El término «anticuerpo» como se refiere en este documento se usa en el sentido más amplio de la palabra, indicando cualquiera y todo anticuerpo que incluya anticuerpo monoclonal (incluyendo anticuerpo monoclonal de tamaño completo), anticuerpo policlonal, mutante de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, anticuerpo poliespecífico (p. ej., anticuerpo biespecífico), anticuerpo quimera, anticuerpo humanizado y otros, siempre que muestre la actividad biológica deseada.

- 40 El anticuerpo y la inmunoglobulina son proteínas que tienen las mismas características estructurales, y el anticuerpo en la invención incluye inmunoglobulina.

- El término «anticuerpo monoclonal» como se refiere en este documento indica un anticuerpo obtenido a partir de un
- 45 grupo de anticuerpos sustancialmente homogéneos, o es decir, un grupo de anticuerpos en los que todos los anticuerpos individuales son uniformes excepto mutante menores que pueden aparecer en la naturaleza. Un anticuerpo monoclonal es altamente específico y generalmente actúa sobre un único sitio del antígeno. Adicionalmente, al comparar con preparaciones de anticuerpos policlonales convencionales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos frente a diferentes epítopes, cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un único
- 50 epítipo de un antígeno. Además de su especificidad, un anticuerpo monoclonal tiene otra ventaja en que se sintetiza mediante cultivo de un hibridoma que no está contaminado con ningún otro anticuerpo. El adjetivo «monoclonal» sugiere la naturaleza del anticuerpo obtenido a partir de un grupo de anticuerpos sustancialmente uniformes y no requiere que el anticuerpo se produzca mediante un procedimiento específico. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal para su uso en la invención puede producirse, por ejemplo, según un procedimiento de hibridoma
- 55 (Köhler y Milstein, Nature 256:495 (1975)) o un procedimiento de recombinación (documento USP 4.816.567). El anticuerpo monoclonal para su uso en la invención también puede aislarse a partir de un biblioteca de anticuerpos en fagos (Clackson y col.; Nature, 352:624-628 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)).

- El término «fragmento de anticuerpo» indica una porción de un anticuerpo de longitud completa. El fragmento de
- 60 anticuerpo para su uso en la invención es, preferiblemente, un fragmento de anticuerpo que mantiene una actividad de unión al anticuerpo y mantiene una actividad de citotoxicidad del anticuerpo de longitud completa.

- Un anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo que tiene especificidad frente al menos dos antígenos diferentes. En general, este tipo de moléculas puede unirse a dos antígenos (es decir, anticuerpo biespecífico), aunque en esta
- 65 descripción, el «anticuerpo multiespecífico» incluye anticuerpos con especificidad por más de dos (por ejemplo, tres) antígenos. El anticuerpo multiespecífico puede ser un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de dicho

anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo biespecífico puede reconocer dos antígenos diferentes o puede reconocer epítopes diferentes de un antígeno. Además, uno puede reconocer una sustancia citotóxica.

- El anticuerpo de la presente invención puede también ser un anticuerpo quimera o un anticuerpo humanizado. En general, un anticuerpo quimera comprende una región variable derivada de un anticuerpo de un mamífero no humano y una región constante derivada de un anticuerpo humano. Por otro lado, el anticuerpo humanizado comprende una región determinante de complementariedad procedente de un mamífero no humano y una región estructural y una región constante derivada de un anticuerpo humano.
- 10 El origen de la región variable en un anticuerpo quimera y el origen de una región CDR en un anticuerpo humanizado no están específicamente limitados aunque pueden derivar de cualquier animal. Por ejemplo, puede usarse cualquier secuencia derivada de un anticuerpo murino, un anticuerpo de rata, un anticuerpo de conejo o un anticuerpo de camello (Cook WJ y col., *Protein Eng.* 1996 Jul 9(7):623-8, Tsurushita N y col., *J Immunol Methods.* 2004 Dic 295(1-2):9-19; Sato K y col., *Mol Immunol.* 1994 Abr 31(5):371-81; Preparation of genetically engineered monoclonal antibodies for human immunotherapy. *Hum Antibodies Hybridomas.* 1992 Jul 3(3):137-45; Genetically engineered antibodies: progress and prospects. *Crit Rev Immunol.* 1992;12(3-4):125-68).

Para la región constante de un anticuerpo quimera y un anticuerpo humanizado, puede usarse aquellas derivadas de un anticuerpo humano. Por ejemplo, pueden usarse Cy1, Cy2, Cy3 y Cy4 para la cadena H y pueden usarse Ck y Cl para la cadena L.

El anticuerpo quimera es un anticuerpo construido mediante combinación de secuencias derivadas de diferentes animales y, por ejemplo, es un anticuerpo que comprende las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo murino y las regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo humano. Dicho anticuerpo quimera puede construirse por cualquier procedimiento conocido. Por ejemplo, se ligan un ADN que codifica una región variable de anticuerpo murino y un ADN que codifica una región que codifica una región constante de anticuerpo humano, a continuación, se insertan dentro de un vector de expresión y se introducen en un huésped para producir el anticuerpo pretendido.

30 Un anticuerpo humanizado, también denominado anticuerpo humano remodelado, se construye trasplantando una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo de un mamífero, excepto un humano, por ejemplo, un anticuerpo murino dentro de una región determinante de complementariedad de un anticuerpo humano. En la materia se conoce un procedimiento de recombinación genética general para obtener un anticuerpo humanizado (véanse los documentos EP 125023 y WO96/02576).

35 Específicamente, puede sintetizarse una secuencia de ADN diseñada de modo que la región CDR de un anticuerpo murino ligado con la región estructural (FR) de un anticuerpo humano puede sintetizarse mediante PCR usando, como cebador, varios oligonucleótidos construidos de modo que tenga porciones solapantes con la región terminal de ambas regiones CDR y FR (véase el procedimiento descrito en WO98/13388).

40 La región estructural de un anticuerpo humano que se ligará con el CDR se selecciona de modo que la región determinante de complementariedad pueda formar un buen sitio de unión al antígeno. Si se desea, los aminoácidos de la región estructural de la región variable del anticuerpo pueden sustituirse de modo que la región determinante de complementariedad del anticuerpo humano remodelado pueda formar un sitio de unión al antígeno adecuado (Sato, K. y col., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856).

Además, esos anticuerpos también se incluyen en el anticuerpo de la invención que presenta una mutación en uno o más aminoácidos en regiones distintas a los sitios especificados de la región Fc mencionada anteriormente o de la región CDR y que es funcionalmente equivalente al anticuerpo de la invención.

50 Para preparar un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos diferente pero que sea funcionalmente equivalente a un determinado polipéptido, un procedimiento de introducción de una mutación en el polipéptido es bien conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, los expertos en la materia pueden introducir una mutación en el anticuerpo de la invención según una mutagénesis específica de sitio y similar para preparar de este modo un anticuerpo funcionalmente equivalente a dicho anticuerpo. La mutación de aminoácidos también puede ocurrir de forma espontánea.

Preferiblemente, un resto de aminoácido se muta por otro resto de aminoácido que tiene propiedades de cadena lateral próximas a las del original. Por ejemplo, con respecto a sus propiedades, entre las cadenas laterales de aminoácidos se incluyen aminoácidos hidrófobos ((A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), aminoácidos con cadena lateral alifática (G, A, V, L, I, P), aminoácidos con cadena lateral que contiene un grupo hidroxilo (S, T, Y), aminoácidos con cadena lateral que contiene un átomo de azufre (C, M), aminoácidos con cadena lateral que contiene ácido carboxílico y amido (D, N, E, Q), aminoácidos con cadena lateral que contiene una base (R, K, H), aminoácidos con cadena lateral aromática (H, F, Y, W) (las letras entre paréntesis representan el código de una letra de los aminoácidos). Es sabido que un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos modificada a partir de la secuencia de aminoácidos original mediante delección, adición y/o sustitución

con cualquier otro aminoácido de uno o más restos de aminoácidos sigue manteniendo sustancialmente la actividad biológica del polipéptido original (Mark, D. F. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666; Zoller, M. J. y Smith, M., Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500; Wang, A. y col., Science 224, 1431-1433; Dalbadie-McFarland, G., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79,6409-6413).

5

El anticuerpo para su uso en la invención puede ser un anticuerpo conjugado unido a diversos tipos de moléculas, como polímeros no peptídicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), sustancias radiactivas y toxinas. Este anticuerpo conjugado puede obtenerse mediante modificación química del anticuerpo. El procedimiento de modificación química se ha establecido en la materia. El anticuerpo de la invención puede incluir estos anticuerpos conjugados (D. J. King., Applications and Engineering of Monoclonal antibodies., 1998 T. J. International Ltd, Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer., 1998 Marcel Dekker Inc; Chari y col., Cancer Res., 1992 Vol 152:127; Liu y col., Proc Natl Acad Sci USA., 1996 Vol 93:8681).

#### Preparación del anticuerpo

15

El anticuerpo de la invención puede producirse según un procedimiento conocido por los expertos en la materia. Específicamente, el ADN que codifica el anticuerpo pretendido se inserta en un vector de expresión. En esta etapa, el ADN se inserta en un vector de expresión de manera que pueda expresarse bajo el control de una región control de expresión, por ejemplo, un potenciador y un promotor. A continuación, una célula huésped se transforma con el vector de expresión y el anticuerpo se expresa en la célula huésped. En este proceso, puede usarse una combinación de un huésped adecuado y un vector de expresión adecuado.

20

Entre los ejemplos de vectores se incluyen el vector M13, el vector pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script. Para el subclonaje y la separación del ADNc, por ejemplo, también pueden usarse pGEM-T, pDIRECT y pT7.

25

Los vectores de expresión son especialmente útiles para el objetivo de producción de anticuerpos. Cuando se usan cepas de *E. coli* como JM109, DH5 $\alpha$ , HB101 o XL1-Blue como huésped, el vector de expresión debería tener indispensablemente un promotor que dirija la expresión eficaz del vector en *E. coli*, por ejemplo, el promotor lacZ (Ward y col., Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6,2422-2427), el promotor araB (Better y col., Science (1988) 240,1041-1043) o el promotor T7. Entre los vectores de este tipo también se incluyen pGEX-5X-1 (Pharmacia), sistema de expresión QIA (QIAGEN), pEGFP y pET (en este caso, el huésped es preferiblemente un BL21 que expresa la ARN polimerasa de T7).

30

El vector puede incluir una secuencia señal para la secreción del polipéptido. Para la secuencia señal para la secreción del polipéptido puede usarse, por ejemplo, la secuencia señal pelB (Lei, S. P. y col., Bacteriol. (1987) 169, 4397) para su producción en el periplasma de *E. coli*. La introducción del vector en una célula huésped puede realizarse, por ejemplo, según un procedimiento con cloruro cálcico o un procedimiento de electroporación.

35

Además de los vectores de expresión de *E. coli*, el vector utilizado para la producción de polipéptidos en la invención incluye, por ejemplo, vectores de expresión derivados de mamíferos (p. ej., pcDNA3 (Invitrogen), pEGF-BOS (Nucleic acids, Res., 1990, 18(17), p. 5322, incorporado en este documento como referencia en su integridad), pEF, pCDM8); vectores de expresión derivados de células de insectos (p. ej., sistema de expresión de baculovirus (GIBCO BRL) Bac-toBAC, pBacPAK8); vectores de expresión derivados de vegetales (p. ej., pMH1, pMH2), vectores de expresión derivados de virus animales (p. ej., pHSV, pMV, pAdellcw), vectores de expresión derivados de retrovirus (p. ej., pZIPneo), vectores de expresión derivados de levaduras (p. ej., kit de expresión de *Pichia* (Invitrogen), pNV11, SP-QO1), vectores de expresión derivados de *Bacillus subtilis* (p. ej., pPL608, pKTH50).

45

Para la expresión de células animales como células CHO, células COS o células NIH3T3, el vector debe tener indispensablemente un promotor necesario para la expresión intracelular, por ejemplo, el promotor SV40 (Mulligan y col., Nature (1979) 277, 108, incorporado en este documento como referencia en su integridad), promotor MMTV-LTR, promotor EF1 $\alpha$  (Mizushima y col., Nucleic Acids Res (1990) 18, 5322), promotor CAG (Gene (1991) 108, 193) y promotor de CMV. Preferiblemente, el vector tiene un gen para la selección de las células transformadas (p. ej., gen de resistencia a fármacos capaz de ser diferenciado por un fármaco, (p. ej., neomicina, G418)). Entre los vectores que tienen estas características se incluyen, por ejemplo, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV, pOP13.

55

Además, con el fin de obtener una expresión génica estable y un aumento en el número de copias del gen en las células, se introduce un vector que tiene un gen DHFR complementario (p. ej., pCHOI) en células CHO deficientes en la ruta sintética de ácidos nucleicos para complementar la deficiencia y se amplifica con metotrexato (MTX). Con el fin de una expresión transitoria del gen, las células COS que tienen un gen que expresa el antígeno SV40T en el cromosoma se transforman con un vector que tiene un origen de replicación SV40 (p. ej., pcD). El origen de replicación también puede derivar del virus del polio, adenovirus, virus del polio bovino (BPV), etc. Adicionalmente, para aumentar el número de copias del gen en un sistema de células huésped, el vector de expresión puede contener un marcador seleccionado, como el gen de la aminoglucósido transferasa (APH), gen de la timidina quinasa (TK), gen de la xantina-guanina fosforribosil transferasa (Ecogpt) o gen de la dihidrofolato reductasa (dhfr).

65



Composición farmacéutica

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo de la invención. Puesto que el anticuerpo de la invención muestra un aumento de la actividad citotóxica, es adecuado para su uso en composiciones farmacéuticas y, en particular, es útil como agente antineoplásico. Puesto que se ha demostrado que un anticuerpo anti-glicano 3 presenta citotoxicidad frente a una línea celular derivada de hepatoma (p. ej., documento WO03/00883), el anticuerpo de la invención es especialmente útil como fármaco para tratar el cáncer hepático. Cuando el anticuerpo de la invención se usa en composiciones farmacéuticas, este es preferiblemente un anticuerpo humanizado a la vista de su antigenicidad en humanos.

10

La composición farmacéutica de la invención puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, por ejemplo, agua estéril, solución salina fisiológica, estabilizador, excipiente, antioxidante (p. ej., ácido ascórbico), tampón (p. ej., ácido fosfórico, ácido cítrico, otros ácidos orgánicos) conservante, tensioactivo (p. ej., PEG, Tween), agente quelante (p. ej., EDTA) o aglutinante. Además, la composición farmacéutica de la invención puede contener adicionalmente cualquier otro polipéptido de bajo peso molecular, proteínas como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulina, aminoácidos como glicina, glutamina, asparragina, arginina, lisina; sacáridos como polisacáridos, monosacáridos; hidratos de carbono; alcoholes de azúcares como manitol, sorbitol. Cuando la composición se prepara como solución acuosa para inyección, puede combinarse con una solución isotónica que contiene, por ejemplo, solución salina fisiológica, glucosa o cualquier otro agente auxiliar, como D-sorbitol, D-manosa, D-manitol, cloruro sódico y con un auxiliar de disolución adecuado (p. ej., etanol), polialcohol (p. ej., propilenglicol, PEG), tensioactivo no iónico (p. ej., polisorbato 80, HCO-50).

15

20

25

Si se desea, la composición puede encapsularse en microcápsulas (microcápsulas de hidroximetilcelulosa, gelatina, poli(metilmetacrilato), etc.) o puede formarse dentro de sistemas coloides de administración de fármacos (p. ej., liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, nanocápsulas) (véase Remington's Pharmaceutical Science, 16ª edición, Oslo Ed. 1980). Adicionalmente, se conocen procedimientos para la formulación de fármacos de liberación lenta y pueden ser aplicables a la invención (Langer y col., J. Biomed. Mater. Res., 1981, 15:167-277; Langer, Chem. Tech., 1982, 12:98-105; documentos USP 3 773 919 y EP 58481; Sidman y col., Biopolymers 1983, 22:547-556; EP 133,988).

30

35

La composición puede administrarse a los pacientes por vía oral o parenteral, pero preferiblemente por vía parenteral. El estado (forma de preparación) de la composición farmacéutica de la invención no está específicamente limitado aunque incluye, por ejemplo, inyecciones, preparaciones transnasales, preparaciones transpulmonares, preparaciones percutáneas, preparaciones liofilizadas y soluciones. Se prefieren las preparaciones liofilizadas.

40

La liofilización puede realizarse por cualquier procedimiento bien conocido por los expertos en la materia (Pharm. Biotechnol., 2002, 13,109-133; Int. J. Pharm., 2000, 203(1-2), 1-60; Pharm. Res., 1997, 14(8), 969-975). Por ejemplo, una solución de la composición se divide en alícuota de forma adecuada en viales de liofilización o en recipientes similares se coloca en un congelador o en un liofilizador, o se introduce en un fluido refrigerante como acetona/hielo seco y nitrógeno líquido. Cuando la preparación del anticuerpo se conforma en una preparación de solución de alta concentración, esta puede prepararse según un procedimiento bien conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, puede emplearse un procedimiento de concentración con membrana usando una membrana TFF como se describe en J. Pharm. Sci., 2004, 93(6), 1390-1402.

45

50

La formulación para inyección puede administrarse por vía sistémica o tópica a modo de, por ejemplo, inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal o inyección subcutánea. Dependiendo de la edad y el estado del paciente al que se administra la composición, el procedimiento de administración para este puede seleccionarse de forma adecuada. La dosis puede seleccionarse, por ejemplo, entre un intervalo de 0,0001 mg/kg de peso corporal a 1.000 mg/kg de peso corporal por unidad de dosis. Alternativamente, la dosis puede seleccionarse entre un intervalo de 0,001 a 100.000 mg/organismo. Sin embargo, la invención no debería limitarse a la dosis y al procedimiento de administración mencionado anteriormente.

55

La invención se describe con mayor detalle en referencia a los siguientes ejemplos, a los cuales, sin embargo, la invención no debería limitarse.

**EJEMPLOS****Ejemplo 1: Producción del anticuerpo anti-GPC3 con Fc modificado:**

60

**Ejemplo 1-1: Preparación de casetes de Fc para mutagénesis**

65

Los anticuerpos anti-GPC3 humanizados con Fc modificado que contienen sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la cadena H mostrada en la SEC ID N.º 19 se muestran en la tabla que aparece a continuación. En la figura 1 se muestra la estructura y la estrategia de preparación de los anticuerpos con Fc modificado de la invención.

## ES 2 470 374 T3

V22	I332E
V209	S239D/A330L/I332E
V212	S239D/S298A/I332E
V922	S239D/K326T/I332E
V1608	S239D/S298A/K326T/I332E
V209nG1m(1)	S239D/A330L/I332E/D356E/L358M

Usando los cebadores mostrados en las SEC ID N.º 1 a N.º 9, los casetes de mutación de Fc para la construcción de cinco tipos de anticuerpos con Fc modificados denominados V22, V209, V212, V922 y V1608 se produjeron según un procedimiento de reacciones solapantes de PCR (PCR walking). Específicamente, se usaron los cebadores NormalF1 y NormalR1 usados para V22, V209 y V922 y se usaron los cebadores 212-F1 y 212-R1 para V212 y V1608. Se llevó a cabo un primer paso de PCR en la solución de reacción de PCR mencionada a continuación:

10 se mezclaron 5 µl de tampón KODx10, 5 µl y 2 µl de dNTP y MgCl<sub>2</sub>, respectivamente (unido a la polimerasa KOD, Toyobo). Se añadieron, como se indica anteriormente, la combinación de cebadores (20 µmoles/l, 1 µl de cada), 35,5 µl de dH<sub>2</sub>O y 0,5 µl de polimerasa KOD a 5 unidades/µl para completar 50 µl en total. La PCR se realizó en las condiciones mencionadas a continuación. 96°C 1 min; (98°C 15 s; 65°C 2 s; 74°C 15 s) x 2 ciclos; 74°C 30 s; 4°C.

15 Se tomó un microlitro del producto amplificado en el primer paso y se usó en la siguiente reacción PCR de segundo paso. Específicamente, los cebadores NormalF2 y 212-R2 se usaron para V22 y V212; los cebadores NormalF2 y 209-R2 se usaron para V209; los cebadores NormalF2 y 922-R2 se usaron para V922 y los cebadores NormalF2 y 1608-R2 se usaron para V1608. El segundo paso de PCR se llevó a cabo en la solución de reacción de PCR mencionada a continuación:

20 se mezclaron 5 µl de tampón KODx10, 5 µl y 2 µl de dNTP y MgCl<sub>2</sub>, respectivamente (unido a la polimerasa KOD, Toyobo). Se añadieron, como anteriormente, la combinación de cebadores (20 µmoles/l, 1 µl de cada), 1 µl del producto amplificado en el primer paso como cebador, 35,5 µl de dH<sub>2</sub>O y 0,5 µl de polimerasa KOD a 5 unidades/µl para completar 51 µl en total. La PCR se realizó en las condiciones mencionadas a continuación.

25 96°C 1 min; (98°C 15 s; 65°C 2 s; 74°C 15 s) x 5 ciclos; 74°C 30 s; 4°C.

Se tomó un microlitro del producto amplificado en el segundo paso y se usó en la siguiente reacción de PCR de tercer paso. Específicamente, se usaron los cebadores NormalF3 y NormalR3 para V22, V209, V212, V922 y V1608 y el tercer paso de PCR se realizó en la solución de reacción de PCR mencionada a continuación.

35 se mezclaron 5 µl de tampón KODx10, 5 µl y 2 µl de dNTP y MgCl<sub>2</sub>, respectivamente (unido a la polimerasa KOD, Toyobo). Se añadieron, como anteriormente, la combinación de cebadores (20 µmoles/l, 1 µl de cada), 1 µl del producto amplificado en el segundo paso como cebador, 35,5 µl de dH<sub>2</sub>O y 0,5 µl de polimerasa KOD a 5 unidades/µl para completar 51 µl en total. Usando esto, la PCR se realizó en las condiciones mencionadas a continuación.

96°C 1 min; (98°C 15 s; 65°C 2 s; 74°C 20 s) x 35 ciclos; 74°C 1 min; 4°C.

40 Cada fragmento obtenido se subclonó en pBluescriptSK+ y se confirmó su secuencia.

Cebador sentido: 212-F1 (SEC ID N.º 1)

```
agttcaacitggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgctggaggagcagtcacaacgccacgtacc
gtgtggtcagcgtcc
```

45 Cebador sentido: normalF2 (SEC ID N.º 2)

```
tctcccggaaccctgaggtcacatgcgtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggagg
```

Cebador sentido: normalF3 (SEC ID N.º 3)

gcacctgagctcctggggggaccggacgtctcctctcccccaaaacccaaggacaccccatgatctcccggaccctga  
ggtcacatgcgtgg

5 Cebador complementario: 212-R1 (SEC ID NO.º 4)

ggagacctgcacttgactccttgccattcagccagtcctggcaggacggcggaggacgctgaccacacggctcgtggcgtt  
gtactgctcc

Cebador complementario: 209-R2 (SEC ID N.º 5)

10

ggctgcccttggccttggagatggtttctcctcgggcagtgaggaggccttggaggacctgcacttgactccttgccattca  
gcc

Cebador complementario: 212-R2 (SEC ID N.º 6)

15

ggctgcccttggccttggagatggtttctcctcggggcctgggaggccttggaggacctgcacttgactccttgccattca  
gcc

Cebador complementario: 922-R2 (SEC ID N.º 7)

20

ggctgcccttggccttggagatggtttctcctcggggcctgggaggccttggaggacctgcacttgactccttgccattc  
agcc

Cebador complementario: 1608-R2 (SEC ID N.º 8)

ggctgcccttggccttggagatggtttctcctcggggcctgggaggccttggaggacctgcacttgactccttgccattca  
gcc

25 Cebador complementario: normalR3 (SEC ID N.º 9)

gagctccccgggatgggggacgggtgtacacctgtggttctcggggcctcccttggccttggagatggtttctcctcgg

**Ejemplo 1-2: Preparación del vector que expresa el anticuerpo anti-GPC3 con Fc modificado:**

30

Se construyó un vector para la expresión del anticuerpo anti-GPC3 con Fc modificado de la invención basado en un gen que codifica un anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado preparado previamente por los inventores (cadena H, SEC ID N.º 10; cadena L, SEC ID N.º 11), que se denomina «de tipo silvestre» en los ejemplos siguientes.

35 Las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena H y la región variable de la cadena L del anticuerpo anti-GPC3 de tipo silvestre humanizado se muestran en la SEC ID N.º 21 (ver.k) y SEC ID N.º 22 (ver.a), respectivamente. Las secuencias CDR del anticuerpo anti-GPC3 de tipo silvestre humanizado se muestran a continuación.

40 Cadena H

CDR1 DYEMH (SEC ID N.º 23)

CDR2 ALDPKTGDTAYSQKFKG (SEC ID N.º 24)

CDR3 FYSYTY (SEC ID N.º 25)

Cadena L

5

CDR1 RSSQSLVHSNGNTYLH (SEC ID N.º 26)

CDR2 KVSNRFS (SEC ID N.º 27)

10 CDR3 SQNTHVPPT (SEC ID N.º 28)

Usando el gen de la cadena H del anticuerpo anti-GPC3 humana mostrada en la SEC ID N.º 10 como molde y usando un cebador de SEC ID N.º 11 y un cebador de SEC ID N.º 12 con un sitio SacI introducido previamente como mutación silente, la PCR se realizó en las condiciones mencionadas a continuación.

15

se mezclaron 5 µl de tampón KODx10, 5 µl y 2 µl de dNTP y MgCl<sub>2</sub>, respectivamente (unido a la polimerasa KOD, Toyobo). Se añadieron, como anteriormente, la combinación de cebadores (20 µmoles/l, 1 µl de cada), 1 µl del gen de la cadena H del anticuerpo GPC3, 34,5 µl de dH<sub>2</sub>O y 0,5 µl de polimerasa KOD a 5 unidades/µl para completar 50 µl en total. La PCR se realizó en las condiciones mencionadas a continuación.

20

96°C 1 min; (98°C 15 s; 65°C 2 s; 74°C 30 s) x 35 ciclos; 74°C 30 s; 4°C.

El fragmento obtenido se introdujo en el sitio SmaI de pBluescriptSK+ (pB-Sacless) en el que el sitio SacI se había rellenado previamente con un kit para obtener ADN con extremos romos (Takara Bio) y se confirmó su secuencia (pb-GPCSacmt). A continuación, a partir de un vector que contenía el gen de la cadena H del anticuerpo anti-GPC3 mostrado en la SEC ID N.º 10, se cortó un fragmento SmaI-BamHI de aproximadamente 290 pb, correspondiente con la secuencia del extremo C-terminal de la cadena H del anticuerpo anti GPC3 humano y se introdujo en el sitio correspondiente de pB-GPCSacmt (pB-GPCSacmtC). A continuación, el casete de mutación Fc de V22, V209, V212 o V1608 producido en el ejemplo 1-1 se introdujo en el sitio SacI-SmaI de pB-GPBSacmtC y se confirmó la secuencia de pB-GPCSacmtC. Adicionalmente, para completar la construcción de la cadena H mutada, se ligó un fragmento EcoRI-NheI de aproximadamente 415 pb del gen de la cadena H del anticuerpo GPC3 mostrado en la SEC ID N.º 10 con este para obtener un gen que codifica la cadena H con Fc mutado.

El gen resultante que codificaba la cadena H mutada se escindió con EcoRI-NotI y se introdujo en el sitio correspondiente de un vector de expresión en células animales pCXND3 (pC-aGPCh). A continuación, un fragmento de aproximadamente 3,1 kb, que contenía un gen de la cadena L del anticuerpo anti-GPC3 mostrado en la SEC ID N.º 13 y una región promotora, se escindió con HindIII y se ligó con el sitio correspondiente de pC-aGPCh para obtener un vector de expresión del anticuerpo anti-GPC3. Los vectores pC-aGPCh para V22, V209, V212 y V1608 se designaron pC-aGPCh(22), pC-aGPCh(209), pC-aGPCh(212), pC-aGPCh(922) y pC-aGPCh(1608), respectivamente.

Las secuencias de aminoácidos de las cadenas H de V22, V209, V212 y V1608 se muestran en V22 (SEC ID N.º 29), V209 (SEC ID N.º 30), V212 (SEC ID N.º 31), V922 (SEC ID N.º 32) y V1608 (SEC ID N.º 33), respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de los dominios CH2-CH3 de V22, V209, V212 y V1608 se muestran en el dominio CH2-CH3 de V22 (SEC ID N.º 34), dominio CH2-CH3 de V209 (SEC ID N.º 35), dominio CH2-CH3 de V209 (SEC ID N.º 36), dominio CH2-CH3 de V922 (SEC ID N.º 37) y dominio CH2-CH3 de V1608 (SEC ID N.º 38), respectivamente.

Cadena H del anticuerpo anti-GPC3 humano (SEC ID N.º 10)

GAATTCCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCTTCTTTGTGGTGGCAGCAGCTA  
CAGGTGTCCAGTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAA  
GCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACC  
GACTATGAAATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGA  
TGGGAGCTCTTGATCCTAAACTGGTGATACTGCCTACAGTCAGAAGTTCAA  
GGGCAGAGTCACGCTGACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGA  
GCTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTACAAGATTC  
TACTCCTATACTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAG  
CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTG  
GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT  
GACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCG  
GCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC

CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC  
AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATC  
ACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT  
CCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG  
GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA  
ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG  
AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA  
CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC  
CCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA  
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACC  
AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT  
GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCC  
CGTGCTGGACTIONGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA  
AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC  
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA  
TAAGCGGCCGCGGATCC

Cebador sentido: NS-F(SEC ID N.º 11)

5 gctagcaccaggccatcggtctccccctggcaccctctcc

Cebador complementario: NS-R(SE ID N.º 12)

gagctcaggctgggacgggtggcatgtgagttttgtcac

10

ES 2 470 374 T3

Cadena L del anticuerpo anti-GPC3 humano (SEC ID N.º 13)

AAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCGTCGACATTGATTATTG  
ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT  
GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCC  
AACGACCCCGCCCATGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC  
CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGC  
CCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACG  
TCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG

GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG  
TCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCA  
CCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCG  
GGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCG  
GGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCT  
CCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAG  
CGAAGCGCGCGGCGGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCC  
GCTCCGCCCGCCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTC  
CCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCT  
TGGTTAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGG  
CTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGT  
GTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGA  
GCGCTGCGGGCGCGGCGGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGG  
AGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAAC  
AAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGC  
GCGTCGGTTCGGGCTGCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGC  
ACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGC  
CGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCC  
GCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGGCCCCCGGAGCGC  
CGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCG  
TGCAGAGGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAAT  
CTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCG  
GCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCCTTCGTGCGTCGCCGCGCC  
GCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGC  
CTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCG  
GCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCC  
TGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCCTC  
GAGCCACCATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTC  
TCTGGATCCAGTGGGGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGT  
CACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTAC  
ACAGTAATAGGAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTC

TCCACAGCTCCTGATCTATAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACA  
 GGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT  
 GGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCTCTCAAATAACACATGTTCCCTC  
 CTACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACC  
 ATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCT  
 CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTG  
 GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAG  
 CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC  
 AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG  
 GGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGATAAG  
 TCGAGGTCGAGGAATTCCTCCTCAGGTGCAGGCTGCCTATCAGAAGGTGGT  
 GGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAATACCACTGAGATCTTTTTCCCT  
 CTGCCAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGG  
 CTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCT  
 CTCCTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTAAACATCAGAATGAG  
 TATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCCATATGCTGGCTGCCATGAACAA  
 AGGTTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCAT  
 TCCTTATTCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGT  
 TTIGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAG  
 CCAGATTTTTCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCT  
 TATGGAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTT

**Ejemplo 1-3: Producción del alotipo nGlm(1) de V209:**

- 5 Para obtener el alotipo nGlm (1) de V209, un alotipo Glm(1), se formó un casete para el alotipo nGlm(1). Específicamente, usando un cebador sentido HerSmaF y un cebador complementario HerNotR mostrados en las SEC ID N.º 14 y N.º 15, y usando, como molde, el gen de la cadena H del anticuerpo anti-GPC3 mostrado en la SEC ID N.º 10 y producido en el ejemplo 1-2, la PCR se realizó en las condiciones mencionadas a continuación.
- 10 se mezclaron 5 µl de tampón KODx10, 5 µl y 2 µl de dNTP y MgCl<sub>2</sub>, respectivamente (unido a la polimerasa KOD, Toyobo). Se añadieron, como anteriormente, la combinación de cebadores (20 µmoles/l, 1 µl de cada), 1 µl del gen de la cadena H del anticuerpo GPC3, 34,5 µl de dH<sub>2</sub>O y 0,5 µl de polimerasa KOD a 5 unidades/µl para completar 50 µl en total. La PCR se realizó en las condiciones mencionadas a continuación.
- 15 96°C 1 min; (98°C 15 s; 65°C 2 s; 74°C 30 s) x 35 ciclos; 74°C 30 s; 4°C.

El fragmento obtenido se subclonó en pBluescriptSK<sup>+</sup> (pBher) y se confirmó su secuencia. A continuación, se cortó un fragmento SmaI-NotI de aproximadamente 290 pb de pC-aGPChI(209) descrito en el ejemplo 1-2. Por otro lado, se cortó el fragmento SmaI-NotI de pBher de la misma forma, y el fragmento de aproximadamente 290 pb se introdujo en el sitio correspondiente de pC-aGPChI(209) como sustitución para obtener un vector de expresión del alotipo nGlm(1) (pC-aGPChI(209Her)).

Cebador sentido: HerSmaF (SEC ID N.º 14)

25 gggaggagatgaccaagaaccagggtcaccctgacctgcc



Cebador complementario: HerNotR (SEC ID N.º 15)

tttgcggccgcttatcattaccggagacagggagaggctc

5

### **Ejemplo 2: Preparación del anticuerpo anti-GPC3 con Fc modificado:**

#### **Ejemplo 2-1: Expresión del anticuerpo anti-GPC3 con Fc modificado en células CHO:**

- 10 Se escindieron diez microlitros de los vectores de expresión del anticuerpo anti-GPC3 con Fc modificado pC-aGPChI(22), pC-aGPChI(209), pC-aGPChI(212), pC-aGPChI(922), pC-aGPChI(1608) o pC-aGPChI(209Her) con PvuI para obtener un ADN lineal. Estos se introducen en  $2 \times 10^6$  células CHO (cepa DXB11S) en 0,6 ml de PBS(-) según un procedimiento de electroporación en condiciones de 1,5 kV y 25 uF. Las células se incubaron en un incubador de CO<sub>2</sub> al 8%. Las células se seleccionaron en medio CHO-S-SFMII (Invitrogen) que contenía 400 µg/ml de geneticina. Las células seleccionadas se inocularon en un medio CHO-S-SFMII que contenía 400 µg/ml de geneticina en una placa de 96 pocillos a 0,4 células/100 µl/pocillo y las células se clonaron según un procedimiento de dilución límite. El sobrenadante del cultivo se analizó con BIACORE 3000. El antígeno se cuantificó usando un chip con proteína de fusión GST-GPC3 (antígeno GST y glipicano 3 humano mostrado en la SEC ID N.º 16) inmovilizado en este y se seleccionaron las células de alta expresión.

20

Secuencia de aminoácidos del péptido GPC3 (SEC ID N.º 16)

AELAYDLVDVDDAPGNSQQATPKDNEISTFHNLGNVHSPLK

#### **25 Ejemplo 2-2: Purificación del anticuerpo anti-GPC3 con Fc modificado:**

- El sobrenadante del cultivo de las células CHO que expresan el anticuerpo frente a glipicano humanizado con Fc modificado se aplicó a una columna de flujo rápido de Proteína Ar Sepharosa equilibrada con tampón citrato fosfato 10 mM que contenía NaCl 150 mM (pH 7,5). La columna se lavó con el mismo tampón, tampón citrato-fosfato 10 mM que contenía NaCl 1 M (pH 7,5), a continuación tampón citrato-fosfato 10 mM (pH 7,5) y la proteína adsorbida a la columna se eluyó con ácido acético 20 mM: A la fracción de ácido acético 20 mM que contenía el anticuerpo anti-glipicano humanizado con Fc modificado se le añadió tampón tris-HCl 1 M (pH 8,5) para ajustar el pH entre 5 y 6, y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. Se añadió una cantidad equivalente de agua MilliQ a la fracción filtrada de este modo y se aplicó a una columna de flujo rápido SP Sepharosa equilibrada con tampón acetato 20 mM (pH 6,0).
- 35 La columna se lavó con el mismo tampón y, a continuación, la proteína adsorbida a la columna se eluyó con tampón acetato 20 mM que contenía NaCl 20 mM (pH 6,0) para obtener una fracción purificada de anticuerpo anti-glipicano humanizado con Fc modificado.

- En la figura 2 se muestra el resultado del PAGE-SDS (electroforesis en gel de poliacrilamida) de un anticuerpo anti-glipicano humanizado con Fc modificado de la invención en un procedimiento conocido (Nature, 227, 680, 1970, incorporado en este documento como referencia en su integridad) para analizar el peso molecular y el grado de purificación del anticuerpo. Cada anticuerpo anti-glipicano humanizado con Fc modificado purificado proporcionaba una única banda con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa en condiciones no reductoras y proporcionaba dos bandas a aproximadamente 50 kDa y a aproximadamente 25 kDa en condiciones reductoras.
- 45 Estos pesos moleculares coinciden sustancialmente con los presuntos obtenidos a partir de la secuencia de nucleótidos de los ADNc de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo y además coinciden con la información de que un anticuerpo de tipo IgG tiene un peso molecular de aproximadamente 150 kDa en condiciones no reductoras y una cadena H que tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kDa y una cadena L que tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa en condiciones reductoras, en la que se rompe su puente disulfuro intramolecular (Antibodies, Capítulo 14, Monoclonal Antibodies). Se ha confirmado que cada anticuerpo anti-glipicano humanizado con Fc modificado se expresaba como una molécula de anticuerpo que tenía la estructura correcta y se purificaba como tal.

- En la figura 3 se muestra una cromatografía de un anticuerpo anti-glipicano 3 humanizado con Fc modificado y purificado que se analizó a través de una columna de filtración en gel (Superdex 200 PC3.2/30 de GE Amersham Biosciences).

### **Ejemplo 3: Medición de la actividad ADCC del anticuerpo anti-GPC3 con Fc modificado:**

#### **60 Ejemplo 3-1: Clonación del ADNc del glipicano 3 humano (GPC3):**

- Un ADN de longitud completa que codifica el GPC3 humano se amplificó mediante PCR usando el kit Advantage2 (CLONETECH) y, como molde, se preparó la primera cadena del ADNc a partir de la línea celular de cáncer de colon Caco2 de forma normal. Específicamente, 50 µl de una solución de reacción que contenía 2 µl de ADNc derivado de Caco2, 1 µl de cebador sentido (GATATC-ATGGCCGGGACCGTGCGACCGCGT, SEC ID N.º 17), 1 µl de cebador

complementario (GCTAGC-TCAGTGCACCAGGAAGAAGAAGCAC, SEC ID N.º 18), 5 µl de tampón de PCR Advantage2 10x, 8 µl de mezcla de dNTX (1,25 mM) y 1,0 µl de mezcla de polimerasas Advantage se sometieron a 35 ciclos de 1 min a 94°C; 30 s a 63°C y 3 min a 68°C. El producto amplificado por PCR se insertó en un vector TA pGEM-Teasy usando pGEM-T Easy Vector System I (Promega). La secuencia del producto se confirmó usando el secuenciador de ADN ABI3100. De esta manera, se aisló el ADNc que codifica la longitud completa de GPC3 humano. La secuencia de nucleótidos del gen de GPC3 humano se muestra en la SEC ID N.º 19 y la secuencia de aminoácidos de la proteína GPC3 humana se muestra en la SEC ID N.º 20.

**Ejemplo 3-2: Preparación de la línea celular de cáncer hepático humano (SK-03) que expresa GPC3 de longitud completa:**

Para obtener una línea celular para evaluar la actividad biológica del anticuerpo anti-GPC3, se estableció una línea celular hepática humana capaz de expresar un GPC3 de longitud completa.

Se mezcló 1 µg de vector de expresión del gen GPC3 humano de longitud completa tratado con PvuI con 2 µl de FuGENE (Roche) para formar un complejo y, a continuación este se añadió a las células SK-HEP-1 (obtenidas de la ATCC) para la introducción del gen. Las células se incubaron en un incubador de CO<sub>2</sub> durante 24 horas y, a continuación, las células que expresaban GPC3 se seleccionaron usando medio MEM de Dulbecco (D-MEM, de SIGMA) que contenía geneticina (Invitrogen) a una concentración final de 1 mg/ml y FBS al 10%. Se recogieron las colonias resistentes a geneticina obtenidas de este modo y las células se clonaron según un procedimiento de dilución límite. La expresión de GPC3 humano en cada clon de células se determinó mediante citometría de flujo usando el anticuerpo GC33 quimera y anticuerpo IgG de cabra anti-humano marcado con FITC (ICN) para obtener una línea celular de expresión estable SK-03.

**Ejemplo 3-3: Medición de la actividad ADCC con PBMC derivado de sangre periférica humana:**

**Ejemplo 3-3-1: Preparación de la solución de PBMC humanos:**

Se extrajo sangre periférica con heparina de una persona sana, se diluyó dos veces con PBS(-) y se cargó sobre Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham). Tras la centrifugación (500 x g, 30 minutos, 20°C), se recogió la intercapa de la fracción de monocitos. Los monocitos se lavaron tres veces y se suspendieron en RPMI/FBS al 10% para preparar una solución de PBMC humano.

**Ejemplo 3-3-2: Preparación de las células diana:**

Las células SK-03 se mantuvieron en medio D-MEM (SIGMA) que contenía 1 mg/ml de geneticina y FBS al 10% (ThermoTrace). Las células se despegaron de la placa usando tampón de disociación de células (Invitrogen) y se transfirieron a cada pocillo de una placa de fondo en U de 96 pocillos (Falcon) a  $1 \times 10^4$  células/pocillo y se incubaron durante 1 día. Tras la incubación, se añadieron 5,55 MBq de Cromo-51 y las células se incubaron adicionalmente en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 4 horas. Las células se lavaron una vez con el medio y se suspendieron el 50 µl de medio RPMI1640/FBS al 10% para preparar las células diana.

**Ejemplo 3-3-3: Prueba de liberación de cromo (actividad ADCC):**

Se añadieron 50 µl de una solución de anticuerpo preparado para que estuviera a una concentración predeterminada a las células diana y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación se añadieron 100 µl de la solución de PBMC humanos ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) y se centrifugó y, a continuación, se incubó en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 4 horas. Tras la incubación, la placa se centrifugó y se contó la radioactividad de 100 µl del sobrenadante del cultivo en un contador gamma. La proporción específica de cromo liberado se obtuvo según la fórmula siguiente:

$$\text{Proporción específica de cromo liberado (\%)} = \frac{(A-C) \times 100}{(B-C)}$$

donde A indica un valor medio de la radioactividad (cpm) en cada pocillo; B indica un valor medio de la radioactividad (cpm) de cada pocillo, en el que se añadieron a las células diana 100 µl de solución acuosa de NP-40 al 2% (Nonidet P-40, N.º de catálogo 252-23, de Nacalai Tesque) y 50 µl de medio RPMI/FBS al 10%; C indica un valor medio de la radioactividad (cpm) de cada pocillo, en el que se han añadido a las células diana 150 µl de medio RPMI/FBS al 10%.

El experimento se realizó por triplicado y se calculó el valor medio de la actividad ADCC (%) de la muestra.

Los resultados se muestran en la figura 4. Los anticuerpos anti-glicano humanizados con Fc modificado V22, V209, V922, V1608 y V209(nGlm(1)) mostraban todos un aumento de la actividad ADCC en comparación con el anticuerpo de tipo silvestre (WT). Entre estos, la actividad de V22 era menor que la de los otros, aunque se encontraron pequeñas diferencias de actividad entre V209, V922, V1608 y V209(nGlm(1)).

**Ejemplo 3-4: Medición de la actividad ADCC usando células efectoras derivadas de médula ósea de ratón:**

**Ejemplo 3-4-1: Preparación de la suspensión de células efectoras derivadas de médula ósea de ratón:**

- 5 Las células de médula ósea se recogieron a partir del hueso del muslo de un ratón SCID (de Nippon Clea, macho de 10 semanas) y se suspendieron en medio RPMI1640/FBS al 10% a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml. Se añadieron GM-CSF de ratón (Pepro Tech) e IL-2 humana (Pepro Tech) a una concentración final de 10 ng/ml y 50 ng/ml, respectivamente. Las células se incubaron en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 5 días. Tras la incubación, las células se desprendieron con un raspador, se lavaron una vez con el medio y se suspendieron en medio RPMI1640/FBS al 10% a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/ml para preparar una suspensión de células efectoras derivadas de médula ósea de ratón.

**Ejemplo 3-4-2: Preparación de las células diana:**

- 15 Las células de cáncer hepático humano HepG2 (obtenidas de la ATCC) se mantuvieron en medio RPMI1640 (SIGMA) que contenía FBS al 10% (Thermo Trace). Las células se desprendieron de la placa usando tampón de disociación de células (Invitrogen) y se transfirieron a cada pocillo de una placa de fondo en U de 96 pocillos (Falcon) a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/pocillo y se incubaron durante 1 día. Tras la incubación, se añadieron 5,55 MBq de Cromo-51 y las células se incubaron adicionalmente en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 4 horas. Las células se lavaron una vez con el medio y se suspendieron en 50 µl de medio RPMI1640/FBS al 10% para preparar las células diana.

**Ejemplo 3-4-3: Prueba de liberación de cromo (actividad ADCC):**

- 25 Se añadieron 50 µl de una solución de anticuerpo preparado para que estuviera a una concentración predeterminada a las células diana y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación se añadieron 100 µl de la suspensión de células efectoras derivadas de médula ósea de ratón ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) y se centrifugó y, a continuación, se incubó en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 4 horas. Tras la incubación, la placa se centrifugó y se contó la radioactividad de 100 µl del sobrenadante del cultivo en un contador gamma. La proporción específica de cromo liberado se obtuvo según la fórmula siguiente:

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

- donde A indica un valor medio de la radioactividad (cpm) en cada pocillo; B indica un valor medio de la radioactividad (cpm) de cada pocillo, en el que se añadieron a las células diana 100 µl de solución acuosa de NP-40 al 2% (Nonidet P-40, N.º de catálogo 252-23, de Nacalai Tesque) y 50 µl de medio RPMI/FBS al 10%; C indica un valor medio de la radioactividad (cpm) de cada pocillo, en el que se han añadido a las células diana 150 µl de medio RPMI/FBS al 10%.

- 40 El experimento se realizó por triplicado y se calculó el valor medio de la actividad ADCC (%) de la muestra.

Los resultados se muestran en la figura 5. Los anticuerpos anti-glicano humanizados con Fc modificado V22, V209 y V1608 mostraban todos un aumento de la actividad ADCC en comparación con el anticuerpo de tipo silvestre (WT).

45 Utilidad industrial

El anticuerpo anti-glicano 3 humanizado con Fc modificado es útil para el tratamiento de cánceres, como el cáncer hepático.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha y col.

55 <120> Anticuerpo anti-glicano 3

<130> 19672-002WO1

<150> US 11/251.561

60 <151> 14-10-2005

<160> 38

<170> PatentIn versión 3,1

65 <210> 1

ES 2 470 374 T3

<211> 96  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> cebador de PCR

<400> 1

agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg 60  
agcagtacaa cgccacgtac cgtgtgggtca gcgccc 96

10

<210> 2  
<211> 93  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador de PCR

20 <400> 2

tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtaggacgt gagccacgaa gaccctgagg 60  
tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg agg 93

<210> 3  
25 <211> 97  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
30 <223> cebador de PCR

<400> 3

gcacctgagc tcttgggggg accggacgtc ttctctttcc ccccaaaacc caaggacacc 60  
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgg 97

35

<210> 4  
<211> 94  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> cebador de PCR

<400> 4

45

ggagaccttg cacttgact ccttgcatt cagccagtc tggtagcagga cggtagggac 60  
gctgaccaca cggtacgtgg cgttgtaactg ctcc 94

<210> 5  
<211> 91  
50 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

ES 2 470 374 T3

<220>  
<223> cebador de PCR

5 <400> 5

ggctgccctt tggctttgga gatggttttc tctcggggca gtgggagggc tttgttggag 60  
accttgcaact tgtactcctt gccattcage c 91

<210> 6  
10 <211> 91  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
15 <223> cebador de PCR

<400> 6

ggctgccctt tggctttgga gatggttttc tctcggggg ctgggagggc tttgttggag 60  
accttgcaact tgtactcctt gccattcage c 91

20  
<210> 7  
<211> 91  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25  
<220>  
<223> cebador de PCR

<400> 7

30  
ggctgccctt tggctttgga gatggttttc tctcggggg ctgggagggc ggtgttggag 60  
accttgcaact tgtactcctt gccattcage c 91

<210> 8  
<211> 91  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador de PCR

40  
<400> 8

ggctgccctt tggctttgga gatggttttc tctcggggg ctgggagggc ctggttggag 60  
accttgcaact tgtactcctt gccattcage c 91

45 <210> 9  
<211> 81  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>

ES 2 470 374 T3

<223> cebador de PCR

<400> 9

gagctccccg ggatgggggc aggggtgtaca cctgtgggtc tggggctgc cctttggctt 60  
 tggagatggg tttctcctcg g 81

5

<210> 10

<211> 1.422

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena H del anticuerpo humanizado

15 <400> 10

gaattccacc atggactgga cctggagggt cctctttgtg gtggcagcag ctacaggtgt 60  
 ccagtcccag gtgcagctgg tgcagtctgg agctgagggt aagaagcctg gggcctcagt 120  
 gaaggctctc tgcaaggctt ctggatacac cttcaccgac tatgaaatgc actgggtgctg 180  
 acaggccccct ggacaagggc ttgagtggat gggagctctt gatcctaaaa ctggtgatac 240  
 tgcctacagt cagaagttca agggcagagt cacgctgacc ggggacaaat ccacgagcac 300  
 agcctacatg gagctgagca gcctgacatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtacaag 360  
 attctactcc tatacttact gggggcaggg aaccctgggt accgtctcct cagctagcac 420  
 caagggccca tgggtcttcc ccttggcacc ctctccaag agcacctctg ggggcacagc 480  
 ggccctgggc tgcttggca aggactactt cccgaaccg gtgacgggtg cgtggaactc 540  
 aggggcctctg accagcggcg tgcacacctt cccggtgtgc ctacagtccct caggactcta 600  
 ctccctcagc agcgtgggtg ccgtgccctc cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg 660  
 caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgagc ccaaactctg 720  
 tgacaaaact cacacatgcc cacctgtccc agcacctgaa ctctggggg gaccgtcagt 780  
 cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacce ctgaggtcac 840  
 atgogtgggt gtggacgtga gccacgaaga cctgagggtc aagttcaact ggtacgtgga 900  
 cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta 960  
 ccgtgtgggt agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa 1020  
 gtgcaagggt tccaacaaag cctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa 1080  
 agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa 1140  
 gaaccagggt agcctgacct gcctgggtcaa aggtctctat cccagcgaca tgcctgtgga 1200  
 gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc 1260  
 cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg 1320  
 gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag 1380  
 cctctccctg tctccgggta aatgataagc ggccgcggat cc 1422

<210> 11

20 <211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> cebador de PCR

ES 2 470 374 T3

<400> 11

gctagcacca agggcccatc ggtctcccc ctggcacctc cctcc 45

- 5 <210> 12
- <211> 44
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> cebador de PCR

<400> 12

15 gagctcaggt gctgggcacg gtgggcatgt gtgagtttg tcac 44

- <210> 13
- <211> 3.067
- <212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cadena L del anticuerpo humanizado

25 <400> 13

```

aagcttgcat gcctgcaggt cgactctaga ggatccgtcg acattgatta ttgactagtt 60
attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta 120
cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccac cgacccccgc ccattgacgt 180
caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac tttccattga cgtcaatggg 240
tggagtatth acggtaaaact gcccaactgg cagtacatca agtgtatcat atgccaaagta 300
cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgcctg gcattatgcc cagtacatga 360
ccttatggga ctttctact tggcagtaca tctacgtatt agtcategct attaccatgg 420
tcgaggtgag ccccacgttc tgcttcactc tccccatctc cccccctcc ccacccccaa 480
ttttgtatth atttatthtt taattattht gtgcagcgat gggggcgggg gggggggggg 540
ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg cggggcgagg cggagaggtg 600
cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtthcc ttttatggcg aggcggcggc 660
ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcggg agtcgctgcg cgtgccttc 720
gccccgtgcc ccgctccgcc gccgcctcgc gccgcccgcc ccggctctga ctgaccgcgt 780
tactcccaca ggtgagcggg .cgggacggcc cttctcctcc gggctgtaat tagcgettg 840
tttaatgacg gcttgthttc tttctgtggc tgctgaaaag ccttgagggg ctccgggagg 900
gccctthtg cgggggggagc ggctcggggg gtgcgtgctg gtgtgtgtgc gtggggagcg 960
ccgcgtgchg ctccgcgctg cccggcggct gtgagcgtg cgggcgcggc gcggggcttt 1020
gtgcgctccg cagtgtgccc gaggggagcg cggccggggg cggtgccccg cggtgccggg 1080
ggggctgcga ggggaacaaa ggctgcgtgc ggggtgtgtg cgtggggggg tgagcagggg 1140
gtgtggggcg gtcgggtcgg ctgcaacccc cctgcaccc cctccccga gttgctgagc 1200
acggcccggc ttccgggtgcg gggctccgta cggggcgtgg cgcggggctc gccgtgccgg 1260
gcgggggggt gcgggcaggtg ggggtgccgg gcggggcggg gccgcctcgg gccggggagg 1320
gctcggggga ggggcgcggc ggcccccgga gcgccggcgg ctgtcgaggc gcggcgagcc 1380

```

ES 2 470 374 T3

```

gcagccattg ccttttatgg taatcgtgcg agagggcgca gggacttcc tttgtccaaa 1440
tctgtgcgga gccgaaatct gggaggcgcc gccgcacccc ctctagcggg cgcggggcga 1500
agcgggtcgg cgcgggcagg aaggaaatgg cgggggaggg ccttcgtgcg tcgccgcgcc 1560
gccgtccctc tctccctctc cagcctcggg gctgtccgcg gggggacggc tgccttcggg 1620
ggggacgggg cagggcgggg ttcggcttct ggcgtgtgac cggcggctct agagcctctg 1680
ctaaccatgt tcatgccttc ttctttttcc tacagctcct gggcaacgtg ctggttattg 1740
tgctgtctca tcattttggc aaagaattcc tcgagccacc atgaggctcc ctgctcagct 1800
cctggggctg ctaatgctct gggctctctg atccagtggg gatggttga tgactcagtc 1860
tccactctcc ctgcccgta ccctggaga gccggcctcc atctcctgca gatctagtca 1920
gagccttgta cacagtaata ggaacaccta tttacattgg tacctgcaga agccagggca 1980
gtctccacag ctctgatct ataaagtctc caaccgattt tctggggctc ctgacagggt 2040
cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc agcagagtgg aggctgagga 2100
tgttgggggt tattactgct ctcaaaatac acatgttct cctacgtttg gccaggggac 2160
caagctggag atcaaacgta cggtggtctg accatctgtc ttcactctcc cgcctatctga 2220
tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag 2280
agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgcctcccaa tcgggtaact cccaggagag 2340
tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcacc tgacgctgag 2400
caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag 2460
ctcgcctctc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga taagtgcagg tcgaggaatt 2520
cactcctcag gtgcaggctg cctatcagaa ggtggtggct ggtgtggcca atgccctggc 2580
tcacaaatac cactgagatc tttttccctc tgccaaaaat tatggggaca tcatgaagcc 2640
ccttgagcat ctgacttctg gctaataaag gaaatttatt ttcattgcaa tagtgtgttg 2700
gaattttttg tgtctctcac tcggaaggac atatgggagg gcaaatcatt taaaacatca 2760
gaatgagtat ttggtttaga gtttggcaac atatgcccac atgctggctg ccatgaacaa 2820
aggttggcta taaagaggct atcagtatat gaaacagccc cctgctgtcc attccttatt 2880
ccatagaaaa gccttgactt gaggttagat tttttttata ttttgttttg tgttattttt 2940
ttctttaaca tccctaaaat tttccttaca tgttttacta gccagatttt tctcctctc 3000
ctgactactc ccagtcatag ctgtccctct tctcttatgg agatccctcg acctgcagcc 3060
caagctt

```

3067

<210> 14

<211> 39

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

10

<400> 14

gggaggagat gaccaagaac caggtcacc tgacctgcc 39

15 <210> 15

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>



ES 2 470 374 T3

<223> cebador de PCR

<400> 15

5 ttgcgcccg cttatcatt acccgagac agggagaggc tc 42

<210> 16

<211> 40

<212> PROT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser

1 5 10 15

Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu

20 25 30

Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys

35 40

15

<210> 17

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> cebador de PCR

<400> 17

25

gatatcatgg ccgggaccgt ggcaccgcg t 31

<210> 18

<211> 31

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

35

<400> 18

gctagctcag tgcaccagga agaagaagca c 31

40 <210> 19

<211> 1.743

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

45 <400> 19

ES 2 470 374 T3

```

atggccggga ccgTgcgcac cgogtgcttg gtggtggcga tgctgctcag cttggacttc 60
ccgggacagg cgcagccccc gccgcccgcg ccggacgcca cctgtcacca agtccgctcc 120
ttcttccaga gactgcagcc cggactcaag tgggtgccag aaactcccgt gccaggatca 180
gatttgcaag tatgtctccc taagggccca acatgctgct caagaaagat ggaagaaaaa 240
taccaactaa cagcacgatt gaacatggaa cagctgcttc agtctgcaag tatggagctc 300
aagttcttaa ttattcagaa tgctgogggt ttccaagagg cctttgaaat tgttgttcgc 360
catgccaaaga actacaccaa tgccatgttc aagaacaact acccaagcct gactccacaa 420
gcttttgagt ttgtgggtga atttttcaca gatgtgtctc tctacatctt gggttctgae 480
atcaatgtag atgacatggt caatgaattg tttgacagcc tgtttccagt catctatacc 540
cagctaataga acccaggcct gcctgattca gccttggaca tcaatgagtg cctccgagga 600
gcaagacgtg acctgaaagt atttgggaat ttccccaagc ttattatgac ccaggtttcc 660
aagtcactgc aagtcactag gatcttccct caggctctga atcttggaat tgaagtgatc 720
aacacaactg atcacctgaa gttcagtaag gactgtggcc gaatgctcac cagaatgtgg 780
tactgctctt actgccaggg actgatgatg gttaaacctt gtggcgggta ctgcaatgtg 840
gtcatgcaag gctgtatggc aggtgtgggt gagattgaca agtactggag agaatacatt 900
ctgtcccttg aagaacttgt gaatggcatg tacagaatct atgacatgga gaacgtactg 960
cttggctctc tttcaacaat ccatgattct atccagtatg tccagaagaa tgcaggaaaag 1020
ctgaccacca ctattggcaa gttatgtgcc cattctcaac aacgccaata tagatctgct 1080
tattatcctg aagatctctt tattgacaag aaagtattaa aagttgctca tgtagaacat 1140
gaagaaacct tatccagccg aagaagggaa ctaattcaga agttgaagtc tttcatcagc 1200
ttctatagtg ctttgctggy ctacatctgc agccatagcc ctgtggcggg aaacgacacc 1260
ctttgctgga atggacaaga actcgtggag agatacagcc aaaaggcagc aaggaatgga 1320
atgaaaaacc agttcaatct ccatgagctg aaaatgaagg gccctgagcc agtggtcagt 1380
caaattattg acaaaactgaa gcacattaac cagctcctga gaaccatgtc tatgcccaaa 1440
ggtagagttc tggataaaaa cctggatgag gaaggggttg aaagtggaga ctgcggtgat 1500
gatgaagatg agtgcattgg aggctctggt gatggaatga taaaagtgaa gaatcagctc 1560
cgcttccttg cagaactggc ctatgatctg gatgtggatg atgcgcctgg aaacagtcat 1620
caggcaactc cgaaggacaa cgagataagc acctttcaca acctcgggaa cgttcattcc 1680
ccgctgaagc ttctcaccag catggccatc teggtggtgt gcttcttctt cctgggtcac 1740
tga 1743

```

<210> 20  
 <211> 580  
 5 <212> PROT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 20

ES 2 470 374 T3

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

ES 2 470 374 T3

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

- <210> 21
- <211> 115
- 5 <212> PROT
- <213> Secuencia artificial
- <220>

ES 2 470 374 T3

<223> Región variable de la cadena H del anticuerpo humanizado

<400> 21

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

5

<210> 22

<211> 112

<212> PROT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena L del anticuerpo humanizado

15 <400> 22

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

ES 2 470 374 T3

<210> 23  
<211> 5  
<212> PROT  
5 <213> *Mus musculus*  
  
<400> 23

Asp Tyr Glu Met His  
1 5

10  
<210> 24  
<211> 17  
<212> PROT  
<213> *Mus musculus*  
15  
<400> 24

Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15  
Gly

20 <210> 25  
<211> 6  
<212> PROT  
<213> *Mus musculus*  
25 <400> 25

Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr  
1 5

<210> 26  
30 <211> 16  
<212> PROT  
<213> *Mus musculus*  
  
<400> 26  
35

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His  
1 5 10 15

<210> 27  
<211> 7  
40 <212> PROT  
<213> *Mus musculus*  
  
<400> 27

ES 2 470 374 T3

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5

<210> 28  
 <211> 9  
 5 <212> PROT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 28

Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr  
 1 5

10  
 <210> 29  
 <211> 445  
 <212> PROT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena H del anticuerpo humanizado

20 <400> 29

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

ES 2 470 374 T3

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly  
 165 170 175  
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly  
 180 185 190  
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
 195 200 205  
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys  
 210 215 220  
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255  
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys  
 260 265 270  
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285  
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300  
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320  
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335  
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350  
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380  
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415  
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 30

<211> 445

5 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>



ES 2 470 374 T3

<223> cadena H del anticuerpo humanizado

<400> 30

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

ES 2 470 374 T3

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305                    310                    315                    320  
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
                   325                    330                    335  
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
                   340                    345                    350  
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
                   355                    360                    365  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
                   370                    375                    380  
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385                    390                    395                    400  
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
                   405                    410                    415  
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
                   420                    425                    430  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                   435                    440                    445

<210> 31

<211> 445

5 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena H del anticuerpo humanizado

10

<400> 31

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

ES 2 470 374 T3

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 115 120 125  
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
 130 135 140  
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly  
 165 170 175  
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly  
 180 185 190  
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
 195 200 205  
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys  
 210 215 220  
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255  
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys  
 260 265 270  
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285  
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300  
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320  
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335  
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350  
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380  
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415  
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

ES 2 470 374 T3

<210> 32  
 <211> 445  
 <212> PROT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena H del anticuerpo humanizado

10 <400> 32

```

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

ES 2 470 374 T3

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys  
 260 265 270  
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285  
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300  
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320  
 Val Ser Asn Thr Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335  
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350  
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380  
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415  
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 33

<211> 445

5 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena H del anticuerpo humanizado

10

<400> 33

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

ES 2 470 374 T3

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

ES 2 470 374 T3

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
                   405                  410                  415  
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
                   420                  425                  430  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                   435                  440                  445

<210> 34  
 <211> 217  
 5 <212> PROT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 34

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

10

<210> 35  
 <211> 217

ES 2 470 374 T3

<212> PROT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 35

5

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

<210> 36  
 <211> 217  
 10 <212> PROT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 36

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

15



ES 2 470 374 T3

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

<210> 37

<211> 217

5 <212> PROT

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

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

10

ES 2 470 374 T3

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80  
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Thr  
85 90 95  
Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
100 105 110  
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
115 120 125  
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140  
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160  
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175  
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
180 185 190  
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
195 200 205  
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
210 215

<210> 38

<211> 217

5 <212> PROT

<213> *Homo sapiens*

<400> 38

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

ES 2 470 374 T3

115 120 125  
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140  
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160  
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175  
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
180 185 190  
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
195 200 205  
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
210 215

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-glicoproteico 3 en el que uno o más de los restos de aminoácidos seleccionados a partir del grupo compuesto por la serina de la posición 239, la serina de la posición 298, la lisina de la posición 326, la alanina de la posición 330 y la isoleucina de la posición 332 en la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos, en el que el anticuerpo anti-glicoproteico 3 comprende regiones CDR1 como se muestra en la SEC ID N.º 23, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 24 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 25 de la cadena H y comprende regiones CDR1 como se muestra en la SEC ID N.º 26, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 27 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 28 de la cadena L.
2. Un anticuerpo anti-glicoproteico 3 seleccionado a partir del grupo compuesto por:
- (a) un anticuerpo anti-glicoproteico 3 en el que la isoleucina de la posición 332 de la región Fc se sustituye por otro resto de aminoácido;
- (b) un anticuerpo anti-glicoproteico 3 en el que la serina de la posición 239, la alanina de la posición 330 y la isoleucina de la posición 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos;
- (c) un anticuerpo anti-glicoproteico 3 en el que la serina de la posición 239, la serina de la posición 298 y la isoleucina de la posición 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos;
- (d) un anticuerpo anti-glicoproteico 3 en el que la serina de la posición 239, la lisina de la posición 326 y la isoleucina de la posición 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos;
- (e) un anticuerpo anti-glicoproteico 3 en el que la serina de la posición 239, la serina de la posición 298, la lisina de la posición 326 y la isoleucina de la posición 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos, en el que el anticuerpo anti-glicoproteico 3 comprende regiones CDR1 como se muestra en la SEC ID N.º 23, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 24 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 25 de la cadena H y comprende regiones CDR1 como se muestra en la SEC ID N.º 26, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 27 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 28 de la cadena L.
3. Un anticuerpo anti-glicoproteico 3 que presenta una o más sustituciones de los restos de aminoácidos de la región Fc, teniendo dicho anticuerpo el resto de aminoácido seleccionado a partir del grupo compuesto por el ácido aspártico de la posición 239, la alanina de la posición 298, la treonina de la posición 326, la leucina de la posición 330 y el ácido glutámico de la posición 332, en el que el anticuerpo anti-glicoproteico 3 comprende regiones CDR1 como se muestra en la SEC ID N.º 23, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 24 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 25 de la cadena H y comprende regiones CDR1 como se muestra en la SEC ID N.º 26, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 27 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 28 de la cadena L.
4. Un anticuerpo anti-glicoproteico 3 seleccionado a partir del grupo compuesto por:
- a) un anticuerpo anti-glicoproteico 3 que tiene un ácido glutámico en la posición 332 de la región Fc;
- b) un anticuerpo anti-glicoproteico 3 que tiene un ácido aspártico en la posición 239, una leucina en la posición 330 y un ácido glutámico en la posición 332 de la región Fc;
- (c) un anticuerpo anti-glicoproteico 3 que tiene un ácido aspártico en la posición 239, una alanina en la posición 298 y un ácido glutámico en la posición 332 de la región Fc;
- (d) un anticuerpo anti-glicoproteico 3 que tiene un ácido aspártico en la posición 239, una treonina en la posición 326 y un ácido glutámico en la posición 332 de la región Fc;
- (e) un anticuerpo anti-glicoproteico 3 que tiene un ácido aspártico en la posición 239, una alanina en la posición 298, un ácido glutámico en la posición 326 y un ácido glutámico en la posición 332 de la región Fc, en el que el anticuerpo anti-glicoproteico 3 comprende regiones CDR1 como se muestra en la SEC ID N.º 23, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 24 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 25 de la cadena H y comprende regiones CDR1 como se muestra en la SEC ID N.º 26, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 27 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 28 de la cadena L.
5. Un anticuerpo anti-glicoproteico 3 seleccionado a partir del grupo compuesto por:
- a) un anticuerpo anti-glicoproteico 3 en el que la isoleucina de la posición 332 de la región Fc se sustituye por ácido glutámico;
- (b) un anticuerpo anti-glicoproteico 3 en el que la serina de la posición 239, la alanina de la posición 330 y la isoleucina

de la posición 332 de la región Fc se sustituyen por ácido aspártico, leucina y ácido glutámico, respectivamente;

c) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que la serina de la posición 239, la serina de la posición 298 y la isoleucina de la posición 332 de la región Fc se sustituyen por ácido aspártico, alanina y ácido glutámico, respectivamente;

5

d) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que la serina de la posición 239, la lisina de la posición 326 y la isoleucina de la posición 332 de la región Fc se sustituyen por ácido aspártico, treonina y ácido glutámico, respectivamente;

10 e) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que la serina de la posición 239, la serina de la posición 298, la lisina de la posición 326 y la isoleucina de la posición 332 de la región Fc se sustituyen por ácido aspártico, alanina, ácido glutámico y ácido glutámico, respectivamente,

15 en el que el anticuerpo anti-glipicano 3 comprende regiones CDR1 como se muestra en la SEC ID N.º 23, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 24 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 25 de la cadena H y comprende regiones CRD1 como se muestra en la SEC ID N.º 26, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 27 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 28 de la cadena L.

20 6. Un agente antineoplásico que comprende el anticuerpo anti-glipicano 3 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. El agente antineoplásico según la reivindicación 6 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un paciente con cáncer.

25 8. Un procedimiento para producir un anticuerpo anti-glipicano 3 con aumento de la citotoxicidad que comprende:

30 i) cultivar una célula huésped manipulada genéticamente para expresar un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que uno o más de la serina de la posición 239, la serina de la posición 298, la lisina de la posición 326, la alanina de la posición 330 y la isoleucina de la posición 332 en la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos, en el que el anticuerpo anti-glipicano 3 comprende regiones CDR1 como se muestra en la SEC ID N.º 23, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 24 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 25 de la cadena H y comprende regiones CDR1 como se muestra en la SEC ID N.º 26, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 27 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 28 de la cadena L; y

35 ii) aislar el anticuerpo a partir del cultivo.

9. Un procedimiento para producir un anticuerpo anti-glipicano 3 con aumento de la citotoxicidad que comprende:

40 i) cultivar una célula huésped manipulada genéticamente para expresar un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-glipicano 3 seleccionado a partir del grupo compuesto por:

a) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que la isoleucina de la posición 332 de la región Fc se sustituye por otro resto de aminoácido;

45

b) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que la serina de la posición 239, la alanina de la posición 330 y la isoleucina de la posición 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos;

50 c) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que la serina de la posición 239, la serina de la posición 298 y la isoleucina de la posición 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos;

d) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que la serina de la posición 239, la lisina de la posición 326 y la isoleucina de la posición 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos;

55 e) un anticuerpo anti-glipicano 3 en el que la serina de la posición 239, la serina de la posición 298, la lisina de la posición 326 y la isoleucina de la posición 332 de la región Fc se sustituyen por otros restos de aminoácidos, en el que el anticuerpo anti-glipicano 3 comprende regiones CDR1 como se muestra en la SEC ID N.º 23, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 24 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 25 de la cadena H y comprende regiones CRD1 como se muestra en la SEC ID N.º 26, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 27 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 28 de la cadena L; y ii) aislar dicho anticuerpo a partir del cultivo.

60

10. Un procedimiento para producir un anticuerpo anti-glipicano 3 con aumento de la citotoxicidad que comprende:

65 i) cultivar una célula huésped manipulada genéticamente para expresar un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-glipicano 3 que presenta una o más sustituciones de los restos de aminoácidos de la región Fc, teniendo dicho

anticuerpo el resto de aminoácido seleccionado a partir del grupo compuesto por el ácido aspártico de la posición 239, la alanina de la posición 298, la treonina de la posición 326, la leucina de la posición 330 y el ácido glutámico de la posición 332, en el que el anticuerpo anti-glipicano 3 comprende regiones CDR1 como se muestra en la SEC ID N.º 23, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 24 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 25 de la cadena H y comprende regiones CDR1 como se muestra en la SEC ID N.º 26, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 27 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 28 de la cadena L; y

ii) aislar dicho anticuerpo a partir del cultivo.

10 11. Un procedimiento para producir un anticuerpo anti-glipicano 3 con aumento de la citotoxicidad que comprende:

i) cultivar una célula huésped manipulada genéticamente para expresar un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-glipicano 3 seleccionado a partir del grupo compuesto por:

15

a) un anticuerpo anti-glipicano 3 que tiene un ácido glutámico en la posición 332 de la región Fc;

b) un anticuerpo anti-glipicano 3 que tiene un ácido aspártico en la posición 239, una leucina en la posición 330 y un ácido glutámico en la posición 332 de la región Fc;

20

c) un anticuerpo anti-glipicano 3 con ácido aspártico en la posición 239, una alanina en la posición 298 y un ácido glutámico en la posición 332 de la región Fc;

d) un anticuerpo anti-glipicano 3 con un ácido aspártico en la posición 239, una treonina en la posición 326 y un ácido glutámico en la posición 332 de la región Fc;

25

e) un anticuerpo anti-glipicano 3 con ácido aspártico en la posición 239, una alanina en la posición 298, un ácido glutámico en la posición 326 y un ácido glutámico en la posición 332 de la región Fc, en el que el anticuerpo anti-glipicano 3 comprende regiones CDR1 como se muestra en la SEC ID N.º 23, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 24 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 25 de la cadena H y comprende regiones CRD1 como se muestra en la SEC ID N.º 26, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 27 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 28 de la cadena L; y

30

ii) aislar dicho anticuerpo a partir del cultivo.

35

12. Un anticuerpo anti-glipicano 3 seleccionado a partir del grupo compuesto por:

a) un anticuerpo anti-glipicano 3 que tiene el dominio CH2-CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 34;

40

b) un anticuerpo anti-glipicano 3 que contiene el dominio CH2-CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 35;

c) un anticuerpo anti-glipicano 3 que contiene el dominio CH2-CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 36;

45

d) un anticuerpo anti-glipicano 3 que contiene el dominio CH2-CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 37, y

e) un anticuerpo anti-glipicano 3 que contiene el dominio CH2-CH3 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 38,

50

en el que el anticuerpo anti-glipicano 3 comprende regiones CDR1 como se muestra en la SEC ID N.º 23, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 24 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 25 de la cadena H y comprenden regiones CDR1 como se muestra en la SEC ID N.º 26, CDR2 como se muestra en la SEC ID N.º 27 y CDR3 como se muestra en la SEC ID N.º 28 de la cadena L.

55

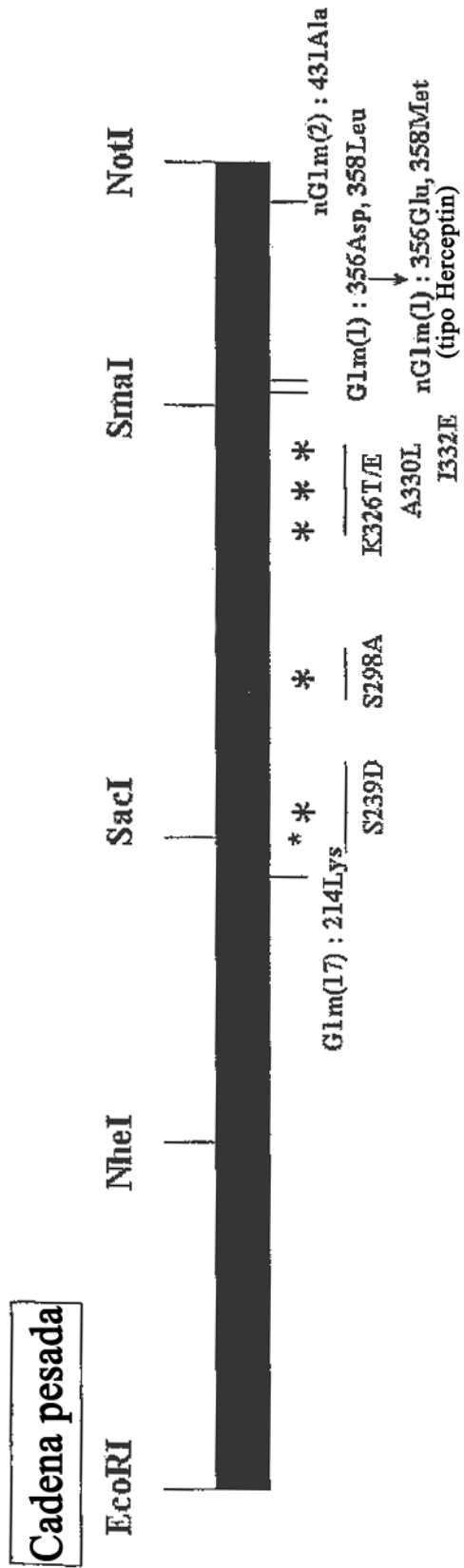


Fig.1

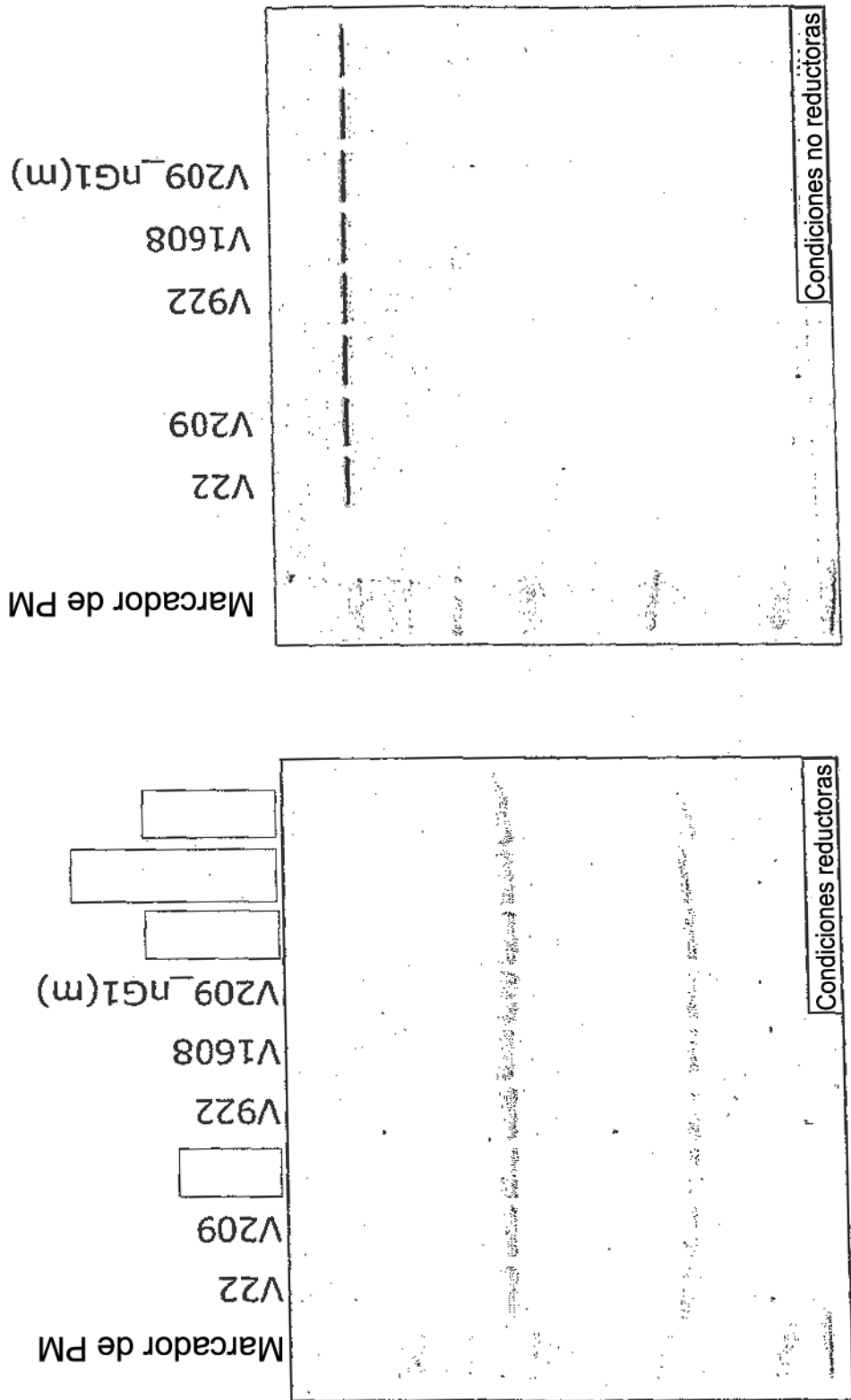


Fig.2



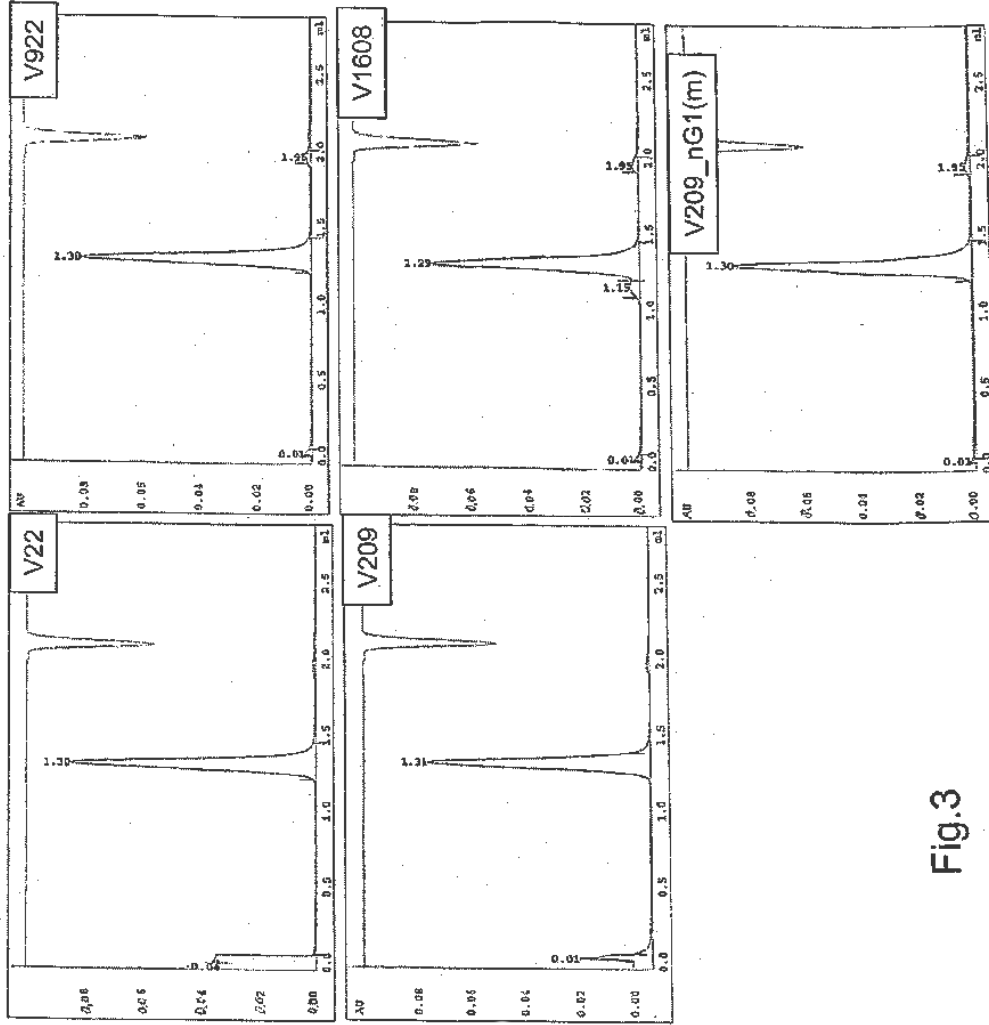


Fig.3

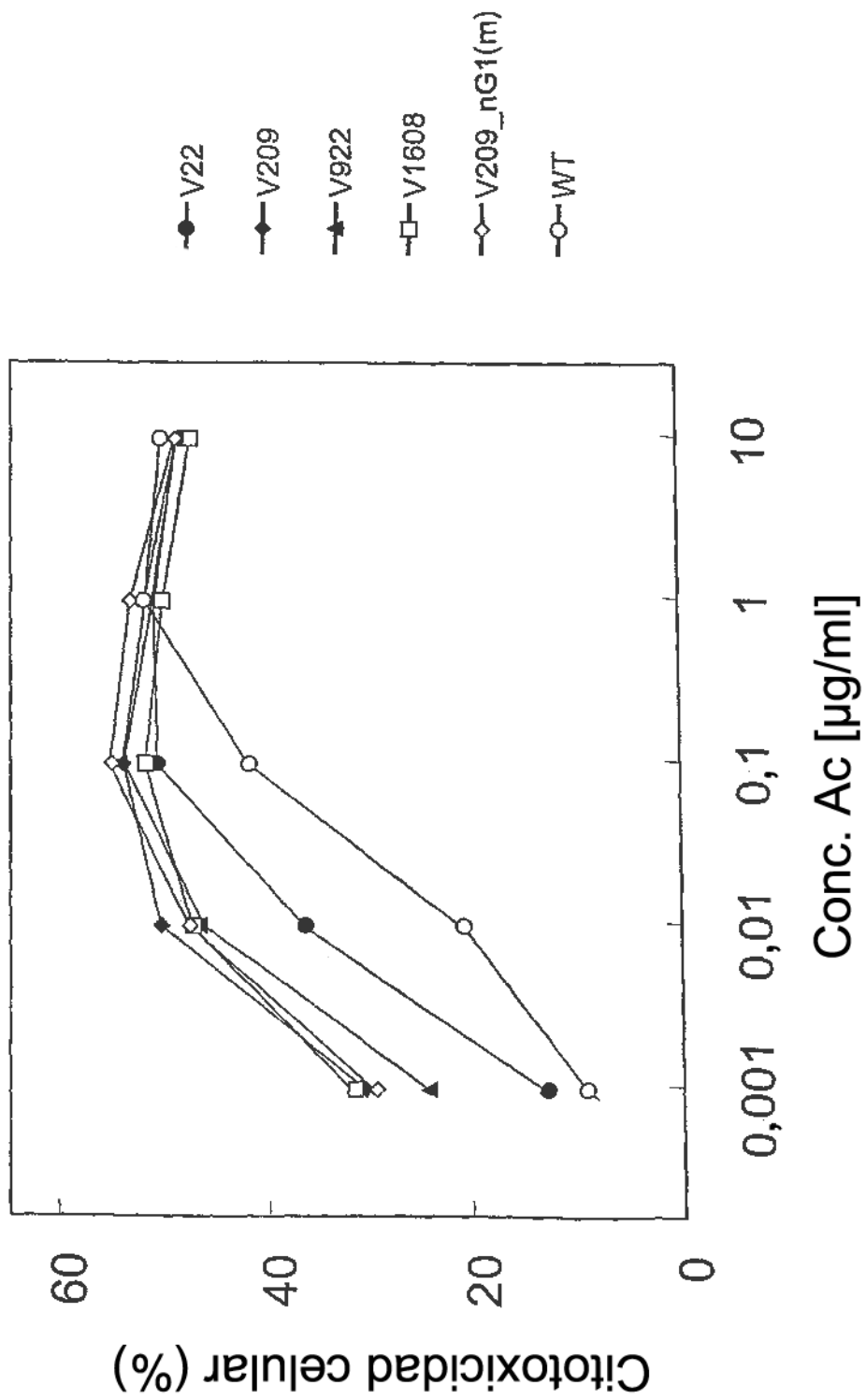


Fig.4

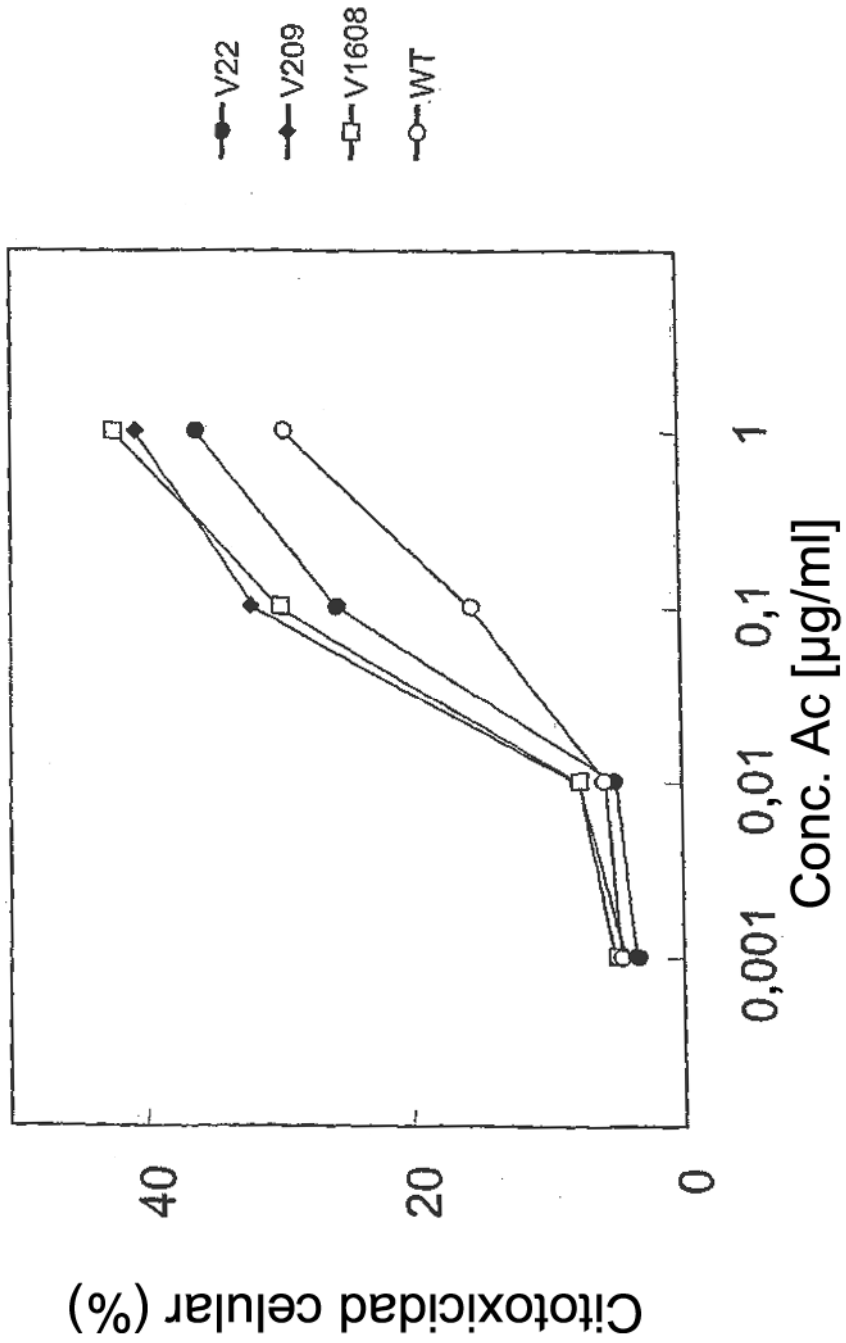


Fig.5