(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 562 790**

(51) Int. CI.:

C07K 16/30 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2008 E 08796249 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2178921**

(54) Título: **Anticuerpos monoclonales contra Glipicano-3**

(30) Prioridad:

17.07.2007 US 959845 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.03.2016

(73) Titular/es:

E. R. SQUIBB & SONS, L.L.C. (100.0%)
Route 206 & Province Line Road
Princeton, NJ 08540, US

(72) Inventor/es:

TERRETT, JONATHAN ALEXANDER;
LU, LI-SHENG;
HUANG, HAICHUN;
YAO, DAPENG;
PAN, CHIN;
LEBLANC, HEIDI;
SPROUL, TIMOTHY y
YAMANAKA, MARK

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales contra Glipicano-3

Antecedentes de la invención

El Glipicano-3 es un antígeno oncofetal que pertenece a la familia de glipicano de proteoglicanos de heparin sulfato anclados a glicosil-fosfatidilinositol. Los glipicanos se caracterizan por un enlace covalente con cadenas de polisacáridos complejas llamadas heparinsulfato glicosaminoglicanos. Los glipicanos están implicados en la señalización celular en la interfaz de la matriz celular-extracelular. (Sasisekharan *et al*., *Nature Reviews* | *Cancer*, Volumen 2 (2002)). Hastala fecha, se han identificado seis miembros distintos de la familia de glipicano humano. El Glipicano-3 unido a la membrana celular, está compuesto de dos subunidades, ligadas por uno o más enlaces disulfuro.

El Glipicano-3 se expresa en hígado fetal y placenta durante el desarrollo, y está regulado negativamente o silenciado en tejidos adultos normales. Las mutaciones y eliminaciones en el gen de Glipicano-3, son responsables del síndrome Simpson-Golabi-Behmel o de la dismorfia de Simpson en seres humanos. El Glipicano-3 se expresa en varios cánceres y, en particular, en carcinoma hepatocelular ("CHC"), melanoma, tumor de Wilm y hepatoblastoma. (Jakubovic y Jothy; *Ex. Mol. Path*. 82:184-189 (2007); Nakatsura y Nishimura, *Biodrugs* 19(2):71-77 (2005)).

El CHC es la tercera causa de muerte más importante relacionada con el cáncer en todo el mundo. Cada año, el CHC causa alrededor de 1 millón de muertes (Nakatsura y Nishimura, *Biodrugs* 19(2):71-77 (2005)). El virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, y el consumo excesivo crónico de alcohol, que conduce a cirrosis hepática, siguen siendo las causas más comunes de CHC. Su incidencia ha aumentado notablemente en los Estados Unidos, debido a la diseminación de la infección por virus de la hepatitis C y se espera que aumente durante las próximas 2 décadas. El CHC se trata principalmente mediante transplante de hígado o resección del tumor. El pronóstico del paciente es dependiente tanto de la función hepática subyacente como del estadio en el que se diagnostica el tumor (Parikh y Hyman, *Am J Med.* 120(3):194-202 (2007)). Son necesarias estrategias de tratamiento eficaces para el CHC.

El documento EP1674111 de la técnica anterior divulga la preparación de anticuerpos monoclonales que se unen a glipicano 3, mostrando una fuerte actividad CDC (Ej. 16) y la humanización de uno de ellos. La afinidad de estos anticuerpos no está determinada.

Sumario de la invención

La presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales aislados, en particular, anticuerpos monoclonales humanos, que se unen a Glipicano-3 y que presentan numerosas propiedades deseables. Estas propiedades incluyen, alta afinidad de unión a Glipicano-3 humano.

En un aspecto, la divulgación concierne a un anticuerpo monoclonal aislado, o a una porción de unión a antígeno del mismo, en la que el anticuerpo:

(a) se une a Glipicano-3 humano con una K_D de $1x10^{-7}$ M o menor;

(b) se une a células CHO humanas transfectadas con Glipicano-3.

El anticuerpo es un anticuerpo humano, aunque en aspectos alternativos de la divulgación, el anticuerpo puede ser un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

En un aspecto, el anticuerpo se une a Glipicano-3 humano con una K_D de 5×10^{-8} M o menor, se une a Glipicano-3 humano con una K_D de 2×10^{-8} M o menor, se une a Glipicano-3 humano con una K_D de 1×10^{-8} M o menor, se une a Glipicano-3 humano con una K_D de $5x10^{-9}$ M o menor, se une a Glipicano-3 humano con una K_D de $4x10^{-9}$ M o menor, se une a Glipicano-3 humano con una K_D de $3x10^{-9}$ M o menor, o se une a Glipicano-3 humano con una K_D de 2×10^{-9} M o menor.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo compite de forma cruzada por la unión a Glipicano-3 con un anticuerpo de referencia que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº: 19, 20, y 21; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº: 22, 23, y 24.

En varias realizaciones, el anticuerpo de referencia comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 19; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 22;

o el anticuerpo de referencia comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 20; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 23;

o el anticuerpo de referencia comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 21; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 24.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de, o procede de de un gen V_H 5-51 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a Glipicano-3. La divulgación también proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de, o procede de un gen V_K A27 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a Glipicano-3.

En un aspecto preferido, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada de un gen V_H 5-51 humano; y
(b) una región variable de cadena ligera de un gen V_K A27 humano; en el que el anticuerpo se une específicamente a Glipicano-3.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3; y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en la que:

(a) la secuencia de CDR3 de la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEC ID Nº: 7, 8, y 9, y modificaciones conservativas de las mismas;
(b) la secuencia de CDR3 de la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEC ID Nº: 16, 17, y 18, y modificaciones conservativas de las mismas;
(c) el anticuerpo se une a Glipicano-3 humano con una K_D de $1x10^{-7}$ M o menor; o
(d) se une a células CHO humanas transfectadas con Glipicano-3.

Preferiblemente, la secuencia de CDR2 de la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEC ID Nº: 4, 5, y 6, y modificaciones conservativas de las mismas; y la secuencia de CDR2 de la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEC ID Nº: 13, 14, y 15, y modificaciones conservativas de las mismas. Preferiblemente, la secuencia de CDR1 de la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEC ID Nº: 1, 2, y 3, y modificaciones conservativas de las mismas; y la secuencia de CDR1 de región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácido de SEC ID Nº: 10, 11, y 12, y modificaciones conservativas de las mismas.

Una combinación preferida comprende:

(a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 1;
(b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 4;
(c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 7;
(d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 10;
(e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 13; y
(f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 16.

Otra combinación preferida comprende:

(a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 2;
(b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 5;
(c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 8;
(d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 11;
(e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 14; y
(f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 17.

Otra combinación preferida comprende:

(a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 3;
(b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 6;
(c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 9;
(d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 12;
(e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 15; y
(f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 18.

Otros anticuerpos preferidos de la divulgación, o porciones de unión a antígeno de los mismos comprenden:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº: 19, 20 y 21; y
(b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº: 22, 23, y 24;
en la que el anticuerpo se une específicamente a Glipicano-3.

Una combinación preferida comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 19; y
(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 22.

Otra combinación preferida comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 20; y
(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID
(c) Nº: 23.

Otra combinación preferida comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 21; y
(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 24.

En otro aspecto de la divulgación, se proporcionan anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que compiten por la unión a Glipicano-3 con cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

Los anticuerpos de la invención pueden ser, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, por ejemplo de un isotipo IgG1 o IgG4. Como alternativa, los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab, Fab' o Fab'2, o anticuerpos de cadena única.

La invención también proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo, ligada a un agente terapéutico, tal como una citotoxina o un isótopo radioactivo. La invención también proporciona una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención, ligada a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente a la de dicho anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo.

También se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, o un inmunoconjugado o molécula biespecífica de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también abarca moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, de la invención, así como vectores de expresión que comprenden dichos ácidos nucleicos y células hospedadoras que comprenden dichos vectores de expresión.

La divulgación proporciona métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales que expresan Glipicano-3. Los métodos comprenden, poner en contacto las células con un anticuerpo anti-Glipicano-3, o porción de unión a antígeno del mismo, en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de las células tumorales. En una realización preferida, las células tumorales proceden de tejido hepático. Adicionalmente, el anticuerpo, o porción de unión a

antígeno del mismo, puede ser un inmunoconjugado. Los inmunoconjugados de la invención pueden ser agentes terapéuticos, por ejemplo, citotoxinas o isótopos radiactivos.

Otras características y ventajas de la presente invención, serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos, los cuales no deben interpretarse como limitantes.

La invención es como se define en las reivindicaciones

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 25) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 19) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 4A6. Las regiones CDR1 (SEC ID Nº: 1), CDR2 (SEC ID Nº: 4) y CDR3 (SEC ID Nº: 7), se delinean, y se indican las derivaciones de línea germinal V, D y J.

La Figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 28) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 22) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 4A6. Las regiones CDR1 (SEC ID Nº: 10), CDR2 (SEC ID Nº: 13) y CDR3 (SEC ID Nº: 16), se delinean y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 26) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 20) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 11E7. Las regiones CDR1 (SEC ID Nº: 2), CDR2 (SEC ID Nº: 5) y CDR3 (SEC ID Nº: 8) se delinean y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 29) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 23) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 11E7. Las regiones CDR1 (SEC ID Nº: 11), CDR2 (SEC ID Nº: 14) y CDR3 (SEC ID Nº: 17) se delinean y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 27) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 21) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 16D10. Las regiones CDR1 (SEC ID Nº: 3), CDR2 (SEC ID Nº: 6) y CDR3 (SEC ID Nº: 9) se delinean y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

La Figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 30) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 24) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 16D10. Las regiones CDR1 (SEC ID Nº: 12), CDR2 (SEC ID Nº: 15) y CDR3 (SEC ID Nº: 18) se delinean y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

La Figura 4 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 4A6 (SEC ID Nº: 19) con la secuencia de aminoácidos de V_H 5-51 de línea germinal humana (SEC ID Nº: 31) y la secuencia de aminoácidos de J_H JH4b de línea germinal humana (SEC ID Nº: 32).

La Figura 5 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 11E7 (SEC ID Nº: 20) con las secuencias de aminoácido de V_H 5-51 de línea germinal humana (SEC ID Nº: 31) y la secuencia de aminoácidos de J_H JH4b de línea germinal humana (SEC ID Nº: 32).

La Figura 6 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 16D10 (SEC ID Nº: 21) con las secuencias de aminoácido de V_H 5-51 de línea germinal humana (SEC ID Nº: 31) y la secuencia de aminoácidos de J_H JH4b de línea germinal humana (SEC ID Nº: 32).

La Figura 7 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 4A6 (SEC ID Nº: 22) con la secuencia de aminoácidos de V_K A27 de línea germinal humana (SEC ID Nº: 33) y la secuencia de aminoácidos de J_K JK4 de línea germinal humana (SEC ID Nº: 34).

La Figura 8 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 11E7 (SEC ID Nº: 23) con la secuencia de aminoácidos de V_K A27 de línea germinal humana (SEC ID Nº: 33) y la secuencia de aminoácidos de J_K JK4 de línea germinal humana (SEC ID Nº: 34).

La Figura 9 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 16D10 (SEC ID Nº: 24) con la secuencia de aminoácidos de V_K A27 de línea germinal humana (SEC ID Nº: 33) y la secuencia de aminoácidos de J_K JK1 de línea germinal humana (SEC ID Nº: 35).

La Figura 10 muestra la afinidad de unión de los anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7 y 16D10 por la línea celular de CHC Hep-3B. La unión se midió usando un ensayo de Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia ("FACS").

La Figura 11 muestra que los anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7, y 16D10 se unen específicamente a las líneas celulares de CHC Hep-3B y Hep-G2. La unión se midió usando un ensayo FACS.

La Figura 12 muestra que los anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7, y 16D10 se unen específicamente a células CHO transfectadas establemente con un vector de expresión de Glipicano-3, pero no a la línea celular CHO progenitora. La unión se midió usando un ensayo FACS.

La Figura 13 muestra que el anticuerpo monoclonal 4A6 se une a células de cáncer hepático tomadas de pacientes. La unión al anticuerpo se reveló en un ensayo de inmunohistoquímica.

La Figura 14 muestra que los anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7, y 16D10, pueden mediar en la eliminación de células Hep-3B mediada por células T citolíticas naturales ("NK"). La eliminación se midió con un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo ("ADCC").

La Figura 15 muestra que los anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7, y 16D10, son internalizados por las células Hep-3B después de la unión al Glipicano-3 de la superficie celular. La internalización se midió por un ensayo Hum-ZAP (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA).

La Figura 16 muestra que los anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7, y 16D10, son internalizados por las células Hep-3B después de la unión al Glipicano-3 de la superficie celular. La internalización se reveló en un ensayo de inmunofluorescencia.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere a anticuerpos monoclonales aislados, particularmente, anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a Glipicano-3 con alta afinidad. En ciertos aspectos, los anticuerpos de la invención proceden de secuencias particulares de cadena ligera y pesada de línea germinal y/o comprenden características estructurales particulares, tales como regiones CDR que comprenden secuencias particulares de aminoácidos. La divulgación proporciona anticuerpos aislados, métodos para elaborar dichos anticuerpos, inmunoconjugados y moléculas biespecíficas que comprenden dichos anticuerpos y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos, inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la invención. La divulgación también se refiere a métodos para usar los anticuerpos, tales como para detectar Glipicano-3, así como para tratar enfermedades asociadas con la expresión de Glipicano-3, tal como neoplasias malignas de células hepáticas que expresan Glipicano-3. Por consiguiente, la divulgación también proporciona métodos para usar los anticuerpos anti-Glipicano-3 de la invención, para tratar neoplasias malignas de células hepáticas, por ejemplo, CHC.

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen primero ciertos términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

Los términos “Glipicano-3”, “proteoglicano 3 de glipicano”, “GPC3”, “OTTHUMP00000062492”, “GTR2-2”, “SGB”, “DGSX”, “SDYS”, “SGBS”, “OCI-5”, y “SGBS1” se usan de forma indistinta, e incluyen variantes, isoformas y homólogos de especie de Glipicano-3 humano. Por consiguiente, los anticuerpos humanos de esta divulgación pueden, en ciertos casos, reaccionar de forma cruzada con Glipicano-3 de especies distintas al ser humano. En ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para una o más proteínas de Glipicano-3 humanas y pueden no presentar reactividad cruzada no humana de especie o de otros tipos. La secuencia de aminoácidos completa de un Glipicano-3 humano ilustrativo, tiene el número de referencia de Genbank/NCBI NM_004484 (SEC ID Nº: 36).

El término “respuesta inmune”, se refiere a la acción de por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (que incluyen anticuerpos, citocinas y complemento), que resultan en el daño selectivo a, destrucción de, o eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas, o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Una “vía de transducción de señal”, se refiere a la relación bioquímica entre varias de las moléculas de transducción de señal, que juegan un papel en la transmisión de una señal de una porción de una célula a otra porción de una célula. Tal como se usa en el presente documento la frase “receptor de superficie celular”, incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y de transmitir dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un “receptor de superficie celular” de la presente divulgación es el receptor de Glipicano-3.

El término “anticuerpo” tal como se cita en el presente documento, incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, “porción de unión a antígeno”) o cadenas únicas del mismo. Un “anticuerpo”, se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno del mismo. Cada cadena pesada está constituida por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está constituida por tres dominios, C_H1, C_H2 y C_H3. Cada cadena ligera está constituida por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L), y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está constituida por un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L, pueden subdividire además en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones detrminantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones marco conservadas (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedador, que incluyen varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

El término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo (o simplemente, “porción de anticuerpo”), tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, Glipicano-3). Se ha demostrado que la función de unión a

antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la presente divulgación incluyen, (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_H1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fab', el cual es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3ª ed. 1993); (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_H1; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un brazo único de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), el cual consiste en un dominio V_H; (vii) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada; y (viii) un nanocuerpo, una región variable de cadena pesada que contiene un dominio variable único y dos dominios constantes. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que permite su producción como una cadena de proteína única en la cual, las dos regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883).También se pretende abarcar dichos anticuerpos monocatenarios dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y la utilidad de los fragmentos se explora de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Un "anticuerpo aislado" tal como se usa en el presente documento pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a Glipicano-3, está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente antígenos distintos a Glipicano-3). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a Glipicano-3 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada frente a otros antígenos, tales como moléculas de Glipicano-3 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad de unión y una afinidad únicas para un epítopo particular.

El término "anticuerpo humano" tal como se usa en el presente documento pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las cuales, tanto las regiones marco conservadas como las CDR, proceden de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también procede de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención, pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o de sitio específico, *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento no pretende incluir anticuerpos en los cuales, las secuencias CDR procedentes de la línea germinal de otras especies de mamíferos tales como un ratón, hayan sido injertadas en secuencias marco conservadas humanas.

El término "anticuerpo monoclonal humano", se refiere a anticuerpos que muestran una especificidad de unión única, que tienen regiones variables en las que las regiones tanto marco conservadas como CDR proceden de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos, se producen mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana y un transgen de cadena ligera fusionada a una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo humano recombinante" tal como se usa en el presente documento incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón), que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de este (descrito en más detalle más adelante), (b) anticuerpos aislados a partir de una célula hospedadora transformada para que exprese el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria recombinante de anticuerpos humanos, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implque el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las cuales, las regiones marco conservadas y CDR proceden de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En determinadas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y de este modo, las secuencias de aminoácido de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes, son secuencias que, aunque proceden de y están relacionadas con secuencias de V_H y V_L de línea germinal, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de anticuerpo de la línea germinal humana *in vivo*.

Tal como se usa en el presente documento "isotipo", se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1), que está codificada por los genes de las regiones constantes de cadena pesada.

Las frases “un anticuerpo que reconoce a un antígeno”, y “un anticuerpo específico para un antígeno”, se usan en el presente documento de forma indistinta con el término “un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno”.

El término “derivados de anticuerpo humano”, se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

El término “anticuerpo humanizado”, pretende referirse a anticuerpos en los cuales, las secuencias CDR procedentes de la línea germinal de otras especies de mamífero, tales como un ratón, se han injertado en secuencias marco conservadas humano. Pueden efectuarse modificaciones adicionales en la región marco conservada dentro de las secuencias marco conservadas humanas.

El término “anticuerpo quimérico”, pretende referirse a anticuerpos en los que las secuencias de región variable proceden de una especie y las secuencias de región constante proceden de otra especie, tales como un anticuerpo en el cual, las secuencias de región variable proceden de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante proceden de un anticuerpo humano.

Tal como se usa en el presente documento un anticuerpo que “se une específicamente a Glipicano-3 humano”, pretende referirse a un anticuerpo que se une a Glipicano-3 humano con una K_D de 1 x 10^{-7} M o o menor, más preferiblemente, 5 x 10^{-8} M o menor, más preferiblemente, 3 x 10^{-8} M o menor, más preferiblemente, 1 x 10^{-8} M o menor, aún más preferiblemente, 5 x 10^{-9} M o menor.

El término “no se une sustancialmente” a una proteína o células, tal como se usa en el presente documento significa que no se une o no se une con una alta afinidad a la proteína o a las células, es decir, se une a la proteína o las células con una K_D de 1 x 10^{-6} M o mayor, más preferiblemente, 1 x 10^{-5} M o mayor, o más preferiblemente, 1 x 10^{-4} M o mayor, más preferiblemente, 1 x 10^{-3} M o mayor, aún más preferiblemente, 1 x 10^{-2} M o mayor.

El término “K_{asoc}” o “K_a”, tal como se usa en el presente documento pretende referirse al la velocidad de asociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno, mientras que el término “K_{dis}” o “K_d”, tal como se usa en el presente documento pretende referirse a la relación de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno. El término “K_D”, tal como se usa en el presente documento pretende referirse a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para anticuerpos pueden determinarse usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método preferido para determinar la K_D de un anticuerpo le uso resonancia de plasmón superficial, preferiblemente, usando un sistema de biosensor tal como un sistema Biacore®.

Tal como se usa en el presente documento el término “alta afinidad” para un anticuerpo IgG, se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 1 x 10^{-7} M o menor, más preferiblemente, 5 x 10^{-8} M o menor, aún más preferiblemente, 1x10^{-8} M o menor, aún más preferiblemente, 5 x 10^{-9} M o menor y aún más preferiblemente, 1 x 10^{-9} M o menor, para un antígeno diana. Sin embargo, la “alta afinidad” de unión puede variar para otros isotipos de anticuerpo. Por ejemplo, “alta afinidad” de unión para un isotipo de IgM, se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-6} M o menor, más preferiblemente, 10^{-7} M o menor, aún más preferiblemente, 10^{-8} M o menor.

Tal como se usa en el presente documento el término “sujeto”, incluye cualquier animal humano o no humano. El término “animal no humano”, incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

En las siguientes subsecciones se describen diversos aspectos de la invención con más detalle.

Anticuerpos Anti-Glipicano-3

Los anticuerpos de la invención se caracterizan por aspectos o propiedades funcionales particulares de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente a Glipicano-3 humano. Preferiblemente, un anticuerpo de la invención se une a Glipicano-3 con alta afinidad, por ejemplo, con una K_D de 1 x 10^{-7} M o menor. Los anticuerpos anti-Glipicano-3 de la invención, preferiblemente muestran una o más de las siguientes características:

(a) se unen a Glipicano-3 humano con un K_D de 1x10^{-7} M o menor;
(b) se unen a células CHO humanas transfectadas con Glipicano-3.

Preferiblemente, el anticuerpo se une a Glipicano-3 humano con una K_D de 5 x 10^{-8} M o menor, se une a Glipicano-3 humano con un K_D de 2 x 10^{-8} M o menor, se une a Glipicano-3 humano con un K_D de 5x10^{-9} M o menor, se une a Glipicano-3 humano con un K_D de 4x10^{-9} M o menor, se une a Glipicano-3 humano con un K_D de 3x10^{-9} M o menor, o se une a Glipicano-3 humano con un K_D de 2,1 x 10 M o menor.

El anticuerpo se une preferiblemente a un epítopo antigénico presente en Glipicano-3, epítopo que no está presente en otras proteínas. El anticuerpo se une normalmente a Glipicano-3, pero no se une a otras proteínas, o se une a

otras proteínas con una baja afinidad, tal como con una K_D de 1 x 10^{-6} M o mayor, más preferiblemente, 1 x 10^{-5} M o mayor, más preferiblemente, 1 x 10^{-4} M o mayor, más preferiblemente, 1 x 10^{-3} M o mayor, aún más preferiblemente, 1 x 10^{-2} M o mayor. Preferiblemente, el anticuerpo no se une sustancialmente a proteínas relacionadas, por ejemplo, el anticuerpo no se une sustancialmente a Glipicano-1, Glipicano-2, Glipicano-4 o Glipicano-6.

En una realización, el anticuerpo puede ser internalizado en una célula que expresa Glipicano-3. Se conocen en la técnica ensayos convencionales para evaluar la internalización de anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, un ensayo de internalización HumZap.

Se conocen en la técnica ensayos convencionales para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos hacia Glipicano-3, incluyendo, por ejemplo, ELISA, transferencias de Western, RIA, y análisis de citometría de flujo. Los ensayos adecuados se describen en detalle en los ejemplos. Las cinéticas de unión (por ejemplo, afinidad de unión) de los anticuerpos, también pueden evaluarse mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, tales como el sistema de análisis Biacore®. Para evaluar la unión a células tumorales, por ejemplo, células Hep-3b o Hep-G2 (n.º de depósito ATCC HB-8064 y HB-8065, respectivamente), las células pueden obtenerse a partir de fuentes públicamente disponibles, tales como la *American Type Culture Collection* (Colección Americana de Cultivos Tipo), y usarse en ensayos convencionales, tales como análisis por citometría de flujo.

Anticuerpos Monoclonales 4A6, 11E7, y 16D10

Los anticuerpos preferidos de la invención son los anticuerpos monoclonales humanos 4A6, 11E7, y 16D10, aislados y caracterizados estructuralmente tal como se describe en los ejemplos 1 y 2. Las secuencias de aminoácido de V_H de 4A6, 11E7, y 16D10 se muestran en las SEC ID Nº: 19, 20, y 21, respectivamente. Las secuencias de aminoácido de V_L de 4A6, 11E7, y 16D10 se muestran en las SEC ID Nº: 22, 23, y 24, respectivamente.

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a Glipicano-3, las secuencias de V_H y V_L pueden “mezclarse y emparejarse”, para crear otras moléculas de unión anti-Glipicano-3 de la divulgación. La unión a Glipicano-3 de dichos anticuerpos “mezclados y emparejados”, puede probarse usando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los ejemplos (por ejemplo, ELISA). Preferiblemente, cuando se mezclan y emparejan las cadenas de V_H y V_L, una secuencia V_H de un emparejamiento V_H/V_L particular, se reemplaza con una secuencia V_H estructuralmente similar. Del mismo modo, preferiblemente, se reemplaza una secuencia V_L de un emparejamiento V_H/V_L particular, se reemplaza con una secuencia V_L estructuralmente similar.

Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº: 19, 20, y 21; y
(b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº: 22, 23, y 24;

en la que el anticuerpo se une específicamente a Glipicano-3, preferiblemente, a Glipicano-3 humano.

Las combinaciones preferidas de cadena ligera y pesada incluyen:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 19; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 22; o
(b) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 20; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 23.
(c) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 21; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 24.

En otro aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos que comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera de 4A6, 11E7, y 16D10, o combinaciones de las mismas. Las secuencias de aminoácido de las CDR1 de V_H de 4A6, 11E7, y 16D10 se muestran en las SEC ID Nº: 1, 2 y 3, respectivamente. Las secuencias de aminoácido de las CDR2 de V_H de 4A6, 11E7, y 16D10 se muestran en las SEC ID Nº: 4, 5, y 6, respectivamente. Las secuencias de aminoácido de las CDR3 de V_H de 4A6, 11E7, y 16D10 se muestran en las SEC ID Nº: 7, 8, y 9, respectivamente. Las secuencias de aminoácido de las CDR1 de V_k de 4A6, 11E7, y 16D10 se muestran en SEC ID Nº: 10, 11, y 12, respectivamente. Las secuencias de aminoácido de las CDR2 de V_k de 4A6, 11E7, y 16D10 se muestran en SEC ID Nº: 13, 14, y 15, respectivamente. Las secuencias de aminoácido de las CDR3 de V_k de 4A6, 11E7, y 16D10 se muestran en SEC ID Nº: 16, 17, y 18, respectivamente. Las regiones CDR son delineadas usando el sistema Kabat (Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a Glipicano-3 y que cada especificidad de unión al antígeno se proporciona principalmente por las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H,

y las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de V_K, pueden ser "mezcladas y apareadas" (es decir, CDRs a partir de diferentes anticuerpos pueden ser mezcladas y apareadas, aunque cada anticuerpo debe contener una CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H, y CDR1, CDR2 y CDR3 de V_K), para crear otras moléculas de enlace a anti-Glipicano-3 de la divulgación.

El enlace de Glipicano-3 de tales anticuerpos "mezclados y apareados", puede ser probado usando los ensayos de enlace descritos anteriormente y en los Ejemplos (por ejemplo, análisis ELISA, Biacore®). Preferiblemente, cuando las secuencias CDR de V_H son mezcladas y apareadas, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 a partir de una secuencia V_H particular, se reemplaza con una secuencia CDR estructuralmente similar. Del mismo modo, cuando las secuencias CDR de V_K son mezcladas y apareadas, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 a partir de una secuencia V_K particular, preferiblemente se reemplaza con una secuencia CDR estructuralmente similar. Será fácilmente aparente para el experto de habilidad ordinaria, que las nuevas secuencia V_H y V_L pueden ser creadas sustituyendo una o más secuencias de región CDR de V_H y/o V_L, con secuencias estructuralmente similares a partir de las secuencias de CDR descritas aquí para anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7, y 16D10.

Por consiguiente, en otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo que comprende:

(a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 1, 2 y 3;
(b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 4, 5, y 6;
(c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 7, 8, y 9;
(d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 10, 11, y 12;
(e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 13, 14, y 15; y
(f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos
(g) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 16, 17, y 18;

en donde el anticuerpo se une específicamente a Glipicano-3, preferiblemente, Glipicano-3 humano.

En una realización preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 1;
(b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 4;
(c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 7;
(d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 10;
(e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 13; y
(f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 16.

En otra realización preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 2;
(b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 5;
(c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 8;
(d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 11;
(e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 14; y
(f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 17.

En otra realización preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 3;
(b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 6;
(c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 9;
(d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 12;
(e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 15; y
(f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 18.

Es bien conocido en la técnica, que el dominio CDR3, independientemente de los dominios CDR1 y/o CDR2, solo puede determinar la especificidad de unión de un anticuerpo para un antígeno afín y que múltiples anticuerpos pueden predeciblemente, ser generados teniendo la misma especificidad de unión basada en una secuencia CDR3 común. Véase por ejemplo, Klimka *et al.*, *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000) (que describe la producción de un anticuerpo anti-CD30 humanizado usando solamente el dominio variable de cadena pesada CDR3 de anticuerpo anti-CD30 murino Ki-4); Beiboer *et al.*, *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000) (que describe anticuerpos de glicoproteína-2

epitelial recombinantes (EGP-2), usando solamente la secuencia CDR de cadena pesada del anticuerpo anti-EGP-2 MOC-31 murino progenitor); Rader *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998) (que describe un panel de anticuerpos anti-integrina $\alpha_v\beta_3$ humanizados usando un dominio CDR3 variable de cadena ligera y pesada de un anticuerpo LM609 anti-integrina $\alpha_v\beta_3$ murino, en donde cada miembro de anticuerpo comprende una secuencia distinta fuera del dominio CDR3 y capaz de enlazar el mismo epítopo como el anticuerpo murino precursor con afinidades tan altas o superiores que el anticuerpo murino precursor); Barbas *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994) (que describe que el dominio CDR3 proporciona la contribución más significante al enlace de antígeno); Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2529-2533 (1995) (que describe el injerto de las secuencias CDR3 de cadena pesada de tres Fabs (SI-1, SI-40, y SI-32) contra el ADN placental humano sobre la cadena pesada de un Fab anti-tétanos toxoide, con ello, reemplazando la CDR3 de cadena pesada existente y demostrando que el dominio CDR3 solo confiere especificidad de unión); y Ditzel *et al.*, *J. Immunol.* 157:739-749 (1996) (que describe estudios de injertos en donde la transferencia de solamente la cadena pesada de CDR3 de un LNA3 de Fab poliespecífico precursor a una cadena pesada de un anticuerpo p313 de Fab de enlace a tétanos toxoide IgG monoespecífico, fue suficiente para retener la especificidad de unión del Fab precursor).

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR de cadena ligera y/o pesada, a partir de un anticuerpo procedente de un animal humano o no humano, en donde el anticuerpo monoclonal es capaz de unirse específicamente a Glipicano-3. Dentro de ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena ligera y/o pesada a partir de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de ratón o rata, en donde el anticuerpo monoclonal es capaz de unirse específicamente a Glipicano-3. Dentro de algunos aspectos, tales anticuerpos inventivos que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena ligera y/o pesada a partir de un anticuerpo no humano (a) son capaces de competir para enlace con; (b) retener las características funcionales; (c) unirse al mismo epítopo; y/o (d) tener una afinidad de enlace similar como el anticuerpo no humano progenitor correspondiente.

Dentro de otros aspectos, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena ligera y/o pesada a partir de un anticuerpo humano, tal como, por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido a partir de un animal no humano, en donde el anticuerpo humano es capaz de unirse específicamente a Glipicano-3. Dentro de otros aspectos, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena ligera y/o pesada a partir de un primer anticuerpo humano, tal como por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido a partir de un animal no humano, en donde el primer anticuerpo humano es capaz de unirse específicamente a Glipicano-3 y en donde el dominio CDR3 a partir del primer anticuerpo humano, reemplaza un dominio CDR en un anticuerpo humano que está carente de especificidad de unión para Glipicano-3, para generar un segundo anticuerpo humano que es capaz de unirse específicamente a Glipicano-3. Dentro de algunos aspectos, tales anticuerpos inventivos que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena ligera y/o pesada a partir del primer anticuerpo humano (a), son capaces de competir por enlace con; (b) retener las características funcionales; (c) enlazar al mismo epítopo; y/o (d) tener una afinidad de enlace similar como el primer anticuerpo humano progenitor correspondiente. En aspectos preferidos, el primer anticuerpo humano es 4A6, 11E7, y 16D10.

Anticuerpos que tienen secuencias de línea germinal particulares

En ciertos aspectos, un anticuerpo de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada a partir de un gen de inmunoglobulina de cadena pesada de línea germinal particular y/o una región variable de cadena ligera a partir de un gen de inmunoglobulina de cadena ligera de línea germinal particular.

Por ejemplo, en un aspecto preferido, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de, o se deriva a partir de un gen V_H 5-51 humano, en donde el anticuerpo se une específicamente a Glipicano-3. En otro aspecto preferido, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de, o se deriva a partir de un gen V_K A27 humano, en donde el anticuerpo se une específicamente a Glipicano-3. En aún otro aspecto preferido, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo:

(a) comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de, o procede de un gen V_H 5-51 humano (gen que codifica las secuencias de aminoácido expuestas en la SEC ID Nº: 31);
(b) comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de, procede de un gen V_K A27 humano (gen que codifica las secuencias de aminoácido expuestas en la SEC ID Nº: 33); y
(c) se une específicamente a Glipicano-3, preferiblemente, Glipicano-3 humano.

Ejemplos de anticuerpos que tienen V_H 5-51 y V_K A27 son 4A6, 11E7, y 16D10

Tal como se usa en el presente documento un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena ligera o pesada que son “el producto de” o “se derivan a partir de”, una secuencia de línea germinal particular, si las regiones

variables del anticuerpo se obtienen a partir de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales sistemas incluyen, inmunizar genes de inmunoglobulina humana que portan el gen transgénico con el antígeno de interés, o seleccionar una biblioteca de gen de inmunoglobulina humana desplegado en el fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva a partir de", una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana, puede ser identificado como tal, comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácido de inmunoglobulinas de línea germinal humana, y seleccionar la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana que es más cercana en secuencia (es decir, mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva a partir de", una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular, puede contener diferencias de aminoácido comparadas con la secuencia de línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas que se originan naturalmente o a introducción intencional de mutación dirigida al sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado, normalmente es al menos 90 % idéntico en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene restos de aminoácido que identifican el anticuerpo humano como ser humano, cuando se compara con las secuencias de aminoácido de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 95 %, o aún al menos, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Normalmente, un anticuerpo humano derivado a partir de una secuencia de línea germinal humana particular, no exhibirá más de 10 diferencias de aminoácido partir de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano no puede exhibir más de 5, o aún no más de 4, 3, 2, o 1 diferencias de aminoácido a partir de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Anticuerpos Homólogos

En otra realización más, un anticuerpo de la divulgación comprende regiones variables de cadena ligera y pesada, que comprenden secuencias de aminoácido que son homólogas a las secuencias de aminoácido de los anticuerpos preferidos descritos en la presente, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-Glipicano-2 de la invención.

Por ejemplo, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde:

(a) la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos, 80 % homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 19, 20 y 21;
(b) la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos, 80 % homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 22, 23, y 24; y
(c) el anticuerpo se une a Glipicano-3 humano con un K_D de $1x10^{-7}$ M o menor.

El anticuerpo puede también unirse a células CHO transfectadas con Glipicano-3 humano.

En varios aspectos, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

En otros aspectos, las secuencias de aminoácido de V_H y/o V_L, pueden ser 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % homólogas a las secuencias expuestas anteriormente. Un anticuerpo que tiene regiones V_H y V_L que tienen alta homología (es decir, 80 % o mayor) a las regiones V_H y V_L de las secuencias expuestas anteriormente, se pueden obtener por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis mediada por PCR o dirigida al sitio) de moléculas de ácido nucleico que codifican SEC ID Nº: 25, 26, 27, 28, 29, y 30, seguida por ensayos del anticuerpo alterado codificado para determinar la habilidad para unirse a Glipicano-3 usando los ensayos funcionales descritos en la presente.

Tal como se usa en el presente documento el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácido, es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias, es una función del número de posiciones idénticas portadas por las secuencias (es decir, % de homología = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100), tomando en cuenta el número de aperturas, y la longitud de cada apertura, las cuales necesitan ser introducidas para alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias, puede ser realizada usando algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes posteriores.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácido, puede ser determinado usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)), el cual ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de resido de peso PAM120, un defecto de longitud de apertura de 12 y un defecto de apertura de 4. Además, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias de aminoácido, puede ser determinado usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol*. 48:444-453 (1970)), el cual ha sido incorporado en el

programa GAP en el paquete de software de GCG (disponible en http://www.gcg.com), usando ya sea una matriz de Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de apertura de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4, y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Adicionalmente o como alternativa, las secuencias de proteína de la presente invención, pueden además, ser usadas como una "secuencia pregunta" para realizar una búsqueda contra la base de datos pública para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden ser realizadas usando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol*. 215:403-10. Las búsquedas de proteína por BLAST, pueden ser realizadas con el programa XBLAST, registro = 50, longitud de palabras = 3, para obtener homólogos de secuencia de aminoácidos a las moléculas de anticuerpo de la invención. Para obtener alineamientos abiertos para propósitos de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan programas BLAST y Gapped BLAST, los parámetros de defecto de los programas respectivos pueden ser usados (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

Anticuerpos con modificaciones conservativas

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias de CDR comprende secuencias de aminoácido específicas, basadas en los anticuerpos preferidos descritos aquí (por ejemplo, 4A6, 11E7, y 16D10), o modificaciones conservativas de los mismos, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-Glipicano-3 de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde:

(a) la secuencia CDR3 de región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en secuencias de aminoácido de SEC ID Nº: 7, 8, y 9, y modificaciones conservativas de las mismas;
(b) la secuencia CDR3 de región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 16, 17, y 18, y modificaciones conservativas de las mismas; y
(c) el anticuerpo se une a Glipicano-3 humano con un K_D de $1x10^{-7}$ M o menor. El anticuerpo puede también unirse a células CHO transfectadas con Glipicano-3 humano.

En un aspecto preferido, la secuencia CDR2 de región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en secuencias de aminoácido de SEC ID Nº: 4, 5, y 6, y modificaciones conservativas de las mismas; y la secuencia CDR2 de región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en secuencias de aminoácido de SEC ID Nº: 13, 14, y 15, y modificaciones conservativas de las mismas. En otro aspecto preferido, la secuencia CDR1 de región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en secuencias de aminoácido de SEC ID Nº: 1, 2, y 3 y modificaciones conservativas de las mismas; y la secuencia CDR1 de región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en secuencias de aminoácido de SEC ID Nº: 10, 11, y 12, y modificaciones conservativas de las mismas.

En varios aspectos, los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

Tal como se usa en el presente documento el término "modificaciones de secuencia conservativa", se pretende para referirse a modificaciones de aminoácido que no afectan o alteran significantemente las características de enlace del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácido. Tales modificaciones conservativas incluyen, sustituciones de aminoácido, adiciones y supresiones. Las modificaciones pueden ser introducidas en un anticuerpo de la invención por técnicas estándares conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácido conservativo son unas en las cuales, el residuo de aminoácido es reemplazado con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Familias de restos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares, han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales acídicas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). De este modo, uno o más restos de aminoácido dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la invención, pueden ser reemplazadas con otros restos de aminoácido a partir de la misma familia de cadena lateral y el anticuerpo alterado puede ser probado para determinar la capacidad para unirse a Glipicano-3 usando los ensayos funcionales descritos en la presente.

La secuencia CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 1, 2, o 3, puede comprender una o más modificaciones de secuencia conservativa, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácido; la secuencia CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 10, 11, o 12, puede comprender una o más modificaciones de secuencia conservativa, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácido; la secuencia CDR2 de cadena pesada mostrada en la SEC ID Nº: 4, 5, o 6, puede comprender una o más modificaciones de secuencia conservativa, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácido; la secuencia CDR2 de cadena ligera mostrada en SEC ID Nº: 13, 14, o 15, puede comprender una o más modificaciones de secuencia conservativa, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácido; la secuencia CDR3 de cadena pesada mostrada en SEC ID Nº: 7, 8, o 9, puede comprender una o más modificaciones de secuencia conservativa, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácido; y/o la secuencia CDR3 de cadena ligera mostrad en SEC ID Nº: 16, 17, o 18, puede comprender una o más modificaciones de secuencia conservativa, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácido.

Anticuerpos que se unen al mismo epítopo que los anticuerpos anti-glipicano-3 de la invención

En otro aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos que se enlazan al mismo epítopo en Glipicano-3 humano, como cualquiera de los anticuerpos monoclonales Glipicano-3 de la invención (es decir, anticuerpos que tienen la capacidad para competir cruzado por enlace a Glipicano-3, con cualquiera de los anticuerpos monoclonales de la invención). En aspectos preferidos, el anticuerpo de referencia para estudios de competición cruzada puede ser el anticuerpo monoclonal 4A6 (que tiene secuencias V_H y V_L como se muestra en SEC ID Nº: 19 y 22, respectivamente), el anticuerpo monoclonal 11E7 (que tiene secuencias V_H y VL como se muestra en SEC ID Nº: 20 y 23, respectivamente), o el anticuerpo monoclonal 16D10 (que tiene secuencias V_H y V_L como se muestra en SEC ID Nº: 21 y 24, respectivamente). Tales estudios de competición cruzada, pueden ser identificados basados en su capacidad para competir cruzado con 4A6, 11E7, o 16D10 en ensayos de enlace de Glipicano-3 estándares. Por ejemplo, análisis Biacore, ensayos ELISA o citometría de flujo, pueden ser usados para demostrar la competición cruzada con los anticuerpos de la invención actual. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir el enlace de, por ejemplo, 4A6, 11E7, o 16D10, a Glipicano-3 humano, demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con 4A6, 11E7, o 16D10 por enlace a Glipicano-3 humano y de este modo, unirse al mismo epítopo en Glipicano-3 humano como 4A6, 11E7, o 16D10. En un aspecto preferido, el anticuerpo que se une al mismo epítopo en Glipicano-3 humano como 4A6, 11E7, o 16D10 es un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos monoclonales humanos pueden ser preparados y aislados como se describe en los Ejemplos.

Anticuerpos modificados y diseñados por ingeniería genética

Un anticuerpo de la divulgación, además puede ser preparado usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias V_H y/o V_L descritas en la presente, puede ser usado como material de partida para diseñar por ingeniería un anticuerpo modificado, en el cual, el anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas comparadas con el anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede ser diseñado por ingeniería modificando uno o más aminoácidos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo, dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones marco conservadas. Adicionalmente o como alternativa, un anticuerpo puede ser diseñado por ingeniería modificando restos dentro de la(s) región(es) constante(s), por ejemplo, para alterar la(s) función(es) efectoras del anticuerpo.

En ciertas realizaciones, el injerto de CDR puede ser usado para diseñar por ingeniería regiones variables de anticuerpos. Los anticuerpos interactúan con antígenos objetivo predominantemente a través de restos de aminoácido que son localizados en las seis regiones que determinan la complementariedad de cadena pesada y ligera (CDRs). Por esta razón, las secuencias de aminoácido dentro de las CDRs, son más dispersas entre anticuerpos individuales que secuencias fuera de las CDRs. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan propiedades de anticuerpos específicos que se originan naturalmente, construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR, a partir del anticuerpo específico que se origina naturalmente injertado sobre las secuencias marco conservadas a partir de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. See. U.S.A.* 86:10029-10033; Patente de Estados Unidos n.º 5.225.539 por Winter, y Patentes de Estados Unidos n.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 to Queen *et al.*).

Por consiguiente, otro aspecto de la invención pertenece a un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº: 1, 2, y 3, SEC ID Nº: 4, 5, y 6, y SEC ID Nº: 7, 8, y 9, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº: 10, 11, y 12, SEC ID Nº: 13, 14, y 15, y SEC ID Nº: 16, 17, y 18, respectivamente. De este modo, tales anticuerpos que contienen las secuencias CDR de V_H y V_L de anticuerpos

monoclonales 4A6, 11E7, o 16D10, pueden todavía contener diferentes secuencias marco conservadas a partir de estos anticuerpos.

Dichas secuencias marco conservadas se pueden obtener a partir de bases de datos públicas de ADN o referencias publicadas que incluyen secuencias de gen de anticuerpo de línea germinal. Por ejemplo, secuencias de ADN de línea germinal para genes de región variable de cadena ligera y pesada humana, se pueden encontrar en la base de datos de la secuencia de línea germinal humana "VBase" (disponible en la Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como también en Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol*. 227:776-798; y Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol*. 24:827-836. Como otro ejemplo, las secuencias de ADN de línea germinal para genes de región variable de cadena ligera y pesada, se pueden encontrar en la base de datos de Genbank. Por ejemplo, las siguientes secuencias de línea germinal de cadena pesada encontradas en el ratón HCo7 HuMAb, están disponibles en los números de referencia de GenBank adjuntos: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 y BC070333), 3-33 (NG_0010109 y NT_024637) y 3-7 (NG_0010109 y NT_024637). Como otro ejemplo, las siguientes secuencias de línea germinal de cadena pesada encontradas en el ratón HCo12 HuMAb, están disponibles en los números de referencia de GenBank adjuntos: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 y BC070333), 5-51 (NG_0010109 y NT_024637), 4-34 (NG_0010109 y NT_024637), 3-30.3 (CAJ556644) y 3-23 (AJ406678).

Las secuencias de proteína de anticuerpo, son comparadas contra una base de datos de secuencia de proteína compilada, usando uno de los métodos de búsqueda de similitud de secuencia llamado, el Gapped BLAST (Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402), el cual es bien conocido por aquellos expertos en la técnica. El BLAST es un algoritmo heurístico en que, un alineamiento estadísticamente significante entre la secuencia de anticuerpo y la secuencia de base de datos, probablemente está conteniendo los pares de segmento de alto registro (HSP) de palabras alineadas. Los segmentos de pares cuyos registros no pueden ser mejorados por extensión o recortes son llamados un *hit*. Brevemente, las secuencias de nucleótido de origen VBASE (*http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php*), son traducidas y la región entre y que incluye la región marco conservada FR1 hasta FR3, son retenidas. Las secuencias de base de datos tienen una longitud promedio de 98 restos. Las secuencias duplicadas las cuales son emparejamientos exactos sobre la longitud completa de la proteína, son removidas. Una búsqueda BLAST para proteínas usando el programa blastp con parámetros estándares, de defecto, excepto el filtro de baja complejidad, el cual es cambiado, y la matriz de sustitución de BLOSUM62, filtra por 5 hits superiores proporcionando emparejamientos de secuencia. Las secuencias de nucleótido son traducidas en todas las seis estructuras y la estructura sin codones de detención en el segmento de emparejamiento de la secuencia de base de datos se considera el hit potencial. Esto es en cambio confirmado usando el programa BLAST tblastx, el cual traduce la secuencia de anticuerpo en todas las seis estructuras y compara aquellas traducciones a las secuencias de nucleótido VBASE dinámicamente traducidas en todas las seis estructuras.

Las identidades son emparejamientos de aminoácidos exactos entre la secuencia de anticuerpo y la base de datos de proteína sobre la longitud completa de la secuencia. Los positivos (identidades + emparejamiento de sustitución), no son idénticos, pero las sustituciones de aminoácido son guiadas por la matriz de sustitución de BLOSUM62. Si las secuencias de anticuerpo aparean dos de las secuencias de base de datos con la misma identidad, el hit con más positivos podría ser decidido por ser el hit de secuencia de emparejamiento.

Las secuencias marco conservadas preferidas para uso en los anticuerpos de la invención, son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias marco conservadas usadas por anticuerpos seleccionados de la invención, por ejemplo, similares a las secuencias marco conservadas V_H 5-51 (SEC ID Nº: 31) y/o las secuencias marco conservadas V_K A27 (SEC ID Nº: 33), usadas por los anticuerpos monoclonales preferidos de la invención. Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H, y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V_K, pueden ser injertadas sobre las regiones marco conservadas que tienen las secuencias idénticas como aquellas encontradas en el gen de inmunoglobulina de línea germinal a partir del cual se deriva la secuencia de armazón, o las secuencias CDR pueden ser injertadas sobre las regiones marco conservadas que contienen una o más mutaciones comparadas con las secuencias de línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos, es benéfico mutar restos dentro de las regiones marco conservadas para mantener o intensificar la capacidad de enlace al antígeno del anticuerpo (véase por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 por Queen *et al.*).

Otro tipo de modificación de región variable es para mutar restos de aminoácido dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de V_H y/o V_K, para con ello, mejorar uno o más propiedades de enlace (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés. La mutagénesis mediada por PCR o mutagénesis dirigida al sitio, puede ser realizada para introducir la(s) mutación(es) y el efecto en el enlace de anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés puede ser evaluada en ensayos *in vitro* o *in vivo*, como se describe en la presente y se proporciona en los Ejemplos. Preferiblemente, son introducidas modificaciones conservativas (como se discute anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácido, pero son preferiblemente, sustituciones. Es más, son alteradas normalmente no más de uno, dos, tres, cuatro o cinco restos dentro de una región CDR.

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales anti-Glipicano-3 aislados, o porciones de enlace al antígeno de los mismos, que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una región CDR1 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 1, 2, y 3, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácido, comparada con SEC ID Nº: 1, 2 y 3; (b) una región CDR2 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 4, 5, y 6, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácido, comparada con SEC ID Nº: 4, 5, y 6; (c) una región CDR3 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 7, 8, y 9, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácido, comparada con SEC ID Nº: 7, 8, y 9; (d) una región CDR1 de V_K que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 10, 11, y 12, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácido, comparada con SEC ID Nº: 10, 11, y 12; (e) una región CDR2 de V_K región que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 13, 14, y 15, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácido, comparada con SEC ID Nº: 13, 14, y 15; y (f) una región CDR3 de V_K que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 16, 17, y 18, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácido, comparada con SEC ID Nº: 16, 17, y 18.

Anticuerpos de la invención diseñados por ingeniería, incluyen aquellos en los cuales, las modificaciones se han hecho a restos de armazón dentro de V_H y/o V_K, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Normalmente, tales modificaciones de armazón se hacen para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un procedimientos es “retromutar” uno o más restos de armazón a la secuencia de línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que se ha sometido a mutación somática puede contener restos de armazón que difieren de la secuencia de línea germinal a partir de la cual se deriva el anticuerpo. Tales restos pueden ser identificados comparando las secuencias armazón de anticuerpo a las secuencias de línea germinal a partir de las cuales se deriva el anticuerpo. Por ejemplo, para 4A6, usando el sistema de numeración Kabat, el resto de aminoácido n.º 73 (dentro de FR3) de V_H es una arginina (SEC ID Nº: 19) mientras este residuo en la secuencia de línea germinal V_H 5-51 correspondiente es lisina (SEC ID Nº: 31). Para devolver a las secuencias de región marco conservada a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden ser “retromutadas” a la secuencia de línea germinal mediante, por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR (*por ejemplo, resto n.º* 73 (resto n.º 8 de FR3) del V_H de 4A6 pueden ser “retromutadas” a partir de arginina a lisina).

Como otro ejemplo, para 4A6, el resto de aminoácido n.º 76 (dentro de FR3) de V_H es arginina (SEC ID Nº: 19), mientras este residuo en la secuencia de línea germinal V_H 5-51 correspondiente es una serina (SEC ID Nº: 31). Para devolver a las secuencias de región marco conservada a su configuración de línea germinal, por ejemplo, el resto n.º 76 (resto n.º 11 de FR3) del V_H de 4A6 puede ser “retromutado” a partir de arginina una serina. Tales anticuerpos “retromutados”, también están propuestos para estar abarcados por la invención.

Como otro ejemplo, para 4A6, el resto de aminoácido n.º 89 (dentro de FR3) de V_H es leucina (SEC ID Nº: 19), mientras este residuo en la secuencia de línea germinal V_H 5-51 correspondiente es una metionina (SEC ID Nº: 31). Para devolver a las secuencias de región marco conservada a su configuración de línea germinal, por ejemplo, el resto n.º 89 (resto n.º 27 de FR3) del V_H de 4A6 puede ser “retromutado” a partir de leucina a metionina. Tales anticuerpos “retromutados”, también están propuestos para estar abarcados por la invención.

Como otro ejemplo, para 11E7, el resto de aminoácido n.º 76 (dentro de FR3) de V_H es arginina (SEC ID Nº: 20), mientras este residuo en la secuencia de línea germinal V_H 5-51 correspondiente es una serina (SEC ID Nº: 31). Para devolver a las secuencias de región marco conservada a su configuración de línea germinal, por ejemplo, el resto n.º 76 (resto n.º 11 de FR3) del V_H de 11E7 puede ser “retromutado” a partir de arginina una serina. Tales anticuerpos “retromutados”, también están propuestos para estar abarcados por la invención.

Como otro ejemplo, para 16D10, el resto de aminoácido n.º 10 (dentro de FR1) de V_H es aspartato (SEC ID Nº: 21), mientras este residuo en la secuencia de línea germinal V_H 5-51 correspondiente es un glutamato (SEC ID Nº: 31). Para devolver a las secuencias de región marco conservada a su configuración de línea germinal, por ejemplo, el resto n.º 10 (resto n.º 10 de FR1) del V_H de 16D10 puede ser “retromutado” a partir de aspartato a glutamato. Tales anticuerpos “retromutados”, también están propuestos para estar abarcados por la invención.

Como otro ejemplo, para 16D10, el resto de aminoácido n.º 12 (dentro de FR1) de V_H es treonina (SEC ID Nº: 21), mientras este residuo en la secuencia de línea germinal V_H 5-51 correspondiente es una lisina (SEC ID Nº: 31). Para devolver a las secuencias de región marco conservada a su configuración de línea germinal, por ejemplo, el resto n.º 12 (resto n.º 12 de FR1) del V_H de 16D10 puede ser “retromutado” a partir de treonina a lisina. Tales anticuerpos “retromutados”, también están propuestos para estar abarcados por la invención.

Como otro ejemplo, para 16D10, el resto de aminoácido n.º 24 (dentro de FR1) de V_H es valina (SEC ID Nº: 21), mientras este residuo en la secuencia de línea germinal V_H 5-51 correspondiente es una glicina (SEC ID Nº: 31). Para devolver a las secuencias de región marco conservada a su configuración de línea germinal, por ejemplo, el resto n.º 24 (resto n.º 24 de FR1) del V_H de 16D10 puede ser "retromutado" a partir de valina a glicina. Tales anticuerpos "retromutados", también están propuestos para estar abarcados por la invención.

Como otro ejemplo, para 16D10, el resto de aminoácido n.º 28 (dentro de FR1) de V_H es arginina (SEC ID Nº: 21), mientras este residuo en la secuencia de línea germinal VH 5-51 correspondiente es una serina (SEC ID Nº: 31). Para devolver a las secuencias de región marco conservada a su configuración de línea germinal, por ejemplo, el resto n.º 28 (resto n.º 28 de FR1) del V_H de 16D10 puede ser "retromutado" a partir de arginina una serina. Tales anticuerpos "retromutados", también están propuestos para estar abarcados por la invención.

Como otro ejemplo, para 16D10, el resto de aminoácido n.º 37 (dentro de FR2) de V_H es metionina (SEC ID Nº: 21), mientras este residuo en la secuencia de línea germinal V_H 5-51 correspondiente es una valina (SEC ID Nº: 31). Para devolver a las secuencias de región marco conservada a su configuración de línea germinal, por ejemplo, el resto n.º 37 (resto n.º 2 de FR2) del V_H de 16D10 puede ser "retromutado" a partir de metionina a valina. Tales anticuerpos "retromutados", también están propuestos para estar abarcados por la invención.

Como otro ejemplo, para 16D10, el resto de aminoácido n.º 41 (dentro de FR2) de V_H es serina (SEC ID Nº: 21), mientras este residuo en la secuencia de línea germinal V_H 5-51 correspondiente es una prolina (SEC ID Nº: 31). Para devolver a las secuencias de región marco conservada a su configuración de línea germinal, por ejemplo, el resto n.º 41 (resto n.º 6 de FR2) del V_H de 16D10 puede ser "retromutado" a partir de serina a prolina. Tales anticuerpos "retromutados", también están propuestos para estar abarcados por la invención.

Como otro ejemplo, para 16D10, el resto de aminoácido n.º 66 (dentro de FR3) de V_H es histidina (SEC ID Nº: 21), mientras este residuo en la secuencia de línea germinal V_H 5-51 correspondiente es una glutamina (SEC ID Nº: 31). Para devolver a las secuencias de región marco conservada a su configuración de línea germinal, por ejemplo, el resto n.º 66 (resto n.º 1 de FR3) del V_H de 16D10 puede ser "retromutado" a partir de histidina a glutamina. Tales anticuerpos "retromutados", también están propuestos para estar abarcados por la invención.

Como otro ejemplo, para 16D10, el resto de aminoácido n.º 76 (dentro de FR3) de V_H es asparagina (SEC ID Nº: 21), mientras este residuo en la secuencia de línea germinal V_H 5-51 correspondiente es una serina (SEC ID Nº: 31). Para devolver a las secuencias de región marco conservada a su configuración de línea germinal, por ejemplo, el resto n.º 76 (resto n.º 11 de FR3) del V_H de 16D10 puede ser "retromutado" a partir de asparagina a serina. Tales anticuerpos "retromutados", también están propuestos para estar abarcados por la invención.

Como otro ejemplo, para 16D10, el resto de aminoácido n.º 81 (dentro de FR3) de V_H es arginina (SEC ID Nº: 21), mientras este residuo en la secuencia de línea germinal VH 5-51 correspondiente es una glutamina (SEC ID Nº: 31). Para devolver a las secuencias de región marco conservada a su configuración de línea germinal, por ejemplo, el resto n.º 81 (resto n.º 16 de FR3) del V_H de 16D10 puede ser "retromutado" a partir de arginina a glutamina. Tales anticuerpos "retromutados", también están propuestos para estar abarcados por la invención.

Como otro ejemplo, para 16D10, el resto de aminoácido n.º 89 (dentro de FR3) de V_H es isoleucina (SEC ID Nº: 21), mientras este residuo en la secuencia de línea germinal V_H 5-51 correspondiente es una metionina (SEC ID Nº: 31). Para devolver a las secuencias de región marco conservada a su configuración de línea germinal, por ejemplo, el resto n.º 89 (resto n.º 27 de FR3) del V_H de 16D10 puede ser "retromutado" a partir de isoleucina a metionina. Tales anticuerpos "retromutados", también están propuestos para estar abarcados por la invención.

De manera similar, la invención se proporciona para la retromutación de restos de armazón en la cadena ligera. Por ejemplo, para 16D10, el resto de aminoácido n.º 3 (dentro de FR1) de V_K es leucina (SEC ID Nº: 24), mientras este residuo en la secuencia de línea germinal V_K A27 es una valina (SEC ID Nº: 33). Para devolver a las secuencias de región marco conservada a su configuración de línea germinal, por ejemplo, el resto n.º 3 (resto n.º 3 de FR1) del V_K de 16D10 puede ser "retromutado" a partir de leucina a valina.

Otro tipo de modificación de armazón involucra mutar uno o más restos dentro de la región marco conservada, o aún dentro de una o más regiones CDR, para remover los epítopos de células T para con ello, reducir el potencial de inmunogenicidad del anticuerpo. Este procedimiento es también referido como "desinmunización" y se describe en detalle adicional en la Publicación de Patente de Estados Unidos Nº. 20030153043 por Carr *et al.*

Además, o de forma alternativa a modificaciones hechas dentro del armazón o regiones CDR, anticuerpos de la invención pueden ser diseñados por ingeniería para incluir modificaciones dentro de la región Fc, normalmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media del suero, fijación de complemento, enlace al receptor Fc y/o citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede ser químicamente modificado (por ejemplo, una o más porciones químicas pueden ser unidas al anticuerpo), o ser modificadas para alterar su glicosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe en más detalle abajo. La numeración de

restos en la región Fc es aquella del índice de Estados Unidos de Kabat.

En una realización, la región bisagra de CH1 es modificada, de manera tal que el número de restos de cisteína en la región bisagra se altera, por ejemplo, incrementa o reduce. Este procedimiento se describe además, en la Patente de Estados Unidos n.º 5.677.425 por Bodmer *et al.* El número de restos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el montaje de las cadenas ligera y pesada o para incrementar o reducir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región bisagra Fc de un anticuerpo es mutada para reducir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o más mutaciones de aminoácido son introducidas en la región de interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento de articulación Fc, de manera que el anticuerpo tiene enlace de proteína A estafilocócica alterada (SpA), con relación al enlace SpA del dominio de articulación Fc nativo. Este procedimiento se describe en detalle adicional en la Patente de Estados Unidos n.º 6.165.745 por Ward *et al.*

En otra realización, el anticuerpo es modificado para incrementar su vida media biológica. Son posibles varios procedimientos. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, y T256F, como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 6.277.375 por Ward. Como alternativa, para incrementar la vida media biológica, el anticuerpo puede ser alterado dentro de la región CH1 o C_L para contener un epítopo de enlace al receptor salvaje, tomado a partir de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de un IgG, como se describe en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.869.046 y 6.121.022 por Presta *et al.*

En otras realizaciones más, la región Fc se altera reemplazando al menos un residuo de aminoácido con un residuo diferente de aminoácido, para alterar la(s) función(es) efectora(s) del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados a partir de los restos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322, pueden ser reemplazados con un residuo de aminoácido diferente, de manera que el anticuerpo tiene una afinidad alterada para un ligando efector, pero retiene la capacidad de enlace al antígeno del anticuerpo precursor. El ligando efector al cual la afinidad es alterada, puede ser por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este procedimiento es descrito en detalle adicional en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.624.821 y 5.648.260, ambas por Winter *et al.*

En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados a partir de los restos de aminoácidos 329, 331 y 322, pueden ser reemplazados con un residuo de aminoácido diferente, de manera que el anticuerpo tiene una unión a C1q alterada y/o una citotoxicidad dependiente del complemento abolida o reducida (CDC). Este procedimiento se describe en detalle adicional en las Patentes de Estados Unidos n.º 6.194.551 por Idusogie *et al.*

En otro ejemplo, uno o más restos de aminoácido dentro de las posiciones de aminoácido 231 y 239, son alterados para con ello, alterar la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este procedimiento se describe además, en la Publicación de PCT WO 94/29351 por Bodmer *et al.*

En otro ejemplo más, la región Fc es modificada para incrementar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o, incrementar la afinidad del anticuerpo para un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos en las posiciones siguientes: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Este procedimiento se describe además en la Publicación de PCT WO 00/42072 por Presta. Sin embargo, los sitios de enlace en IgG1 humano para FcγR1, FcγRII, FcγRIII y FcRn, han sido mapeados y se han descrito variantes con enlace mejorad (véase, Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem*. 276:6591-6604). Mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339, se mostraron por mejorar el enlace a FcγRIII. Adicionalmente, se mostraron las siguientes combinaciones mutantes para mejorar el enlace de FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

En otra realización adicional, la glicosilación de un anticuerpo se modifica. Por ejemplo, se puede hacer un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede ser alterada para, por ejemplo, incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos pueden ser realizadas para, por ejemplo, alterar uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia de anticuerpo. Por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácido se pueden hacer, que resulten en eliminación de uno o más sitios de glicosilación de armazón de región variable, para con ello, eliminar la glicosilación en tal sitio. Tal glicosilación puede incrementar la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Tal procedimiento se describe en detalle adicional en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.714.350 y 6.350.861 por Co *et al.*

Adicionalmente o como alternativa, un anticuerpo puede ser elaborado para que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de restos fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras GlcNac bisectantes incrementadas. Tales patrones de glicosilación alterados han sido demostrados por incrementar la capacidad de ADCC de anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden realizar, mediante por ejemplo, expresar el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada, han sido descritas en la técnica y pueden

ser usadas como células hospedadoras en las cuales expresar los anticuerpos recombinantes de la invención para con ello, producir un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709, carecen del gen fucosiltransferasa, FUT8 (alfa(1,6)fucosiltransferasa), de manera que los anticuerpos expresados en las línea celulares Ms704, Ms705, y Ms709, carecen de fucosa en sus carbohidratos. Las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 $FUT8^{-/-}$, se crearon por el rompimiento objetivo del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de reemplazo (véase Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 20040110704 por Yamane *et al.* y Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). Como otro ejemplo, el documento EP 1.176.195 por Hanai *et al.,* describe una línea celular con un gen FUT funcionalmente interrumpido, el cual codifica una fucosil transferasa, de manera que los anticuerpos expresados en tal línea celular, exhiben hipofucosilación reduciendo o eliminando la enzima alfa-1,6- unida relacionada. Hanai *et al.,* también describe líneas celulares las cuales tienen una baja actividad enzimática para agregar fucosa a N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o que no tiene la actividad enzimática, por ejemplo, la línea de células de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La Publicación de PCT WO 03/035835 por Presta, describe que líneas de células celular CHO variantes, células Lec13, con capacidad reducida para unirse a fucosa a carbohidratos Asn(297)-ligados, también resulta en hipofucosilación de anticuerpos expresados en tal hospedera (véase también, Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). La Publicación de PCT WO 99/54342 por Umana *et al.*, describe líneas celulares diseñadas por ingeniería, para expresar glicosil transferasas que modifican glicoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de manera tal que los anticuerpos expresados en las líneas celulares diseñadas por ingeniería, exhiben estructuras GlcNac bisectantes incrementadas, las cuales resultan en actividad ADCC incrementada de los anticuerpos (véase también, Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech*. 17:176-180). Como alternativa, los restos del anticuerpo pueden ser desdoblados usando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa, remueve restos fucosilo a partir de anticuerpos (Tarentino, A.L. *et al.* (1975) *Biochem*. 14:5516-23).

Otra modificación de los anticuerpos del presente documento que se contempla por la invención es pegilación. Un anticuerpo puede ser pegilado para, por ejemplo, incrementar la vida media biológica del anticuerpo (por ejemplo, suero). Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo o fragmento del mismo, normalmente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado aldehído de PEG, bajo condiciones en las cuales uno o más grupos PEG llegan a estar unidos al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferiblemente, la pegilación se lleva a cabo vía una reacción de acilación o una reacción de alquilación, con una molécula PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Tal como se usa en el presente documento el término “polietilenglicol”, se pretende para abarcar cualquiera de las formas de PEG que han sido usadas para derivatizar otras proteínas, tales como monoalcoxi (C1-C10) o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En determinadas realizaciones, el anticuerpo a ser pegilado es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para pegilar proteínas se conocen en la técnica y pueden ser aplicados a los anticuerpos de la invención. Véase por ejemplo, EP 0 154 316 por Nishimura *et al.* y EP 0 401 384 por Ishikawa *et al.*

Propiedades físicas del anticuerpo

Los anticuerpos de la presente invención, pueden ser además caracterizados por las varias propiedades físicas de los anticuerpos anti-Glipicano-3. Pueden ser usados varios ensayos para detectar y/o diferenciar diferentes clases de anticuerpos basadas en estas propiedades físicas.

En algunas realizaciones, anticuerpos de la presente invención pueden contener uno o más sitios de glicosilación en ya sea la región variable de cadena ligera o pesada. La presencia de uno o más sitios de glicosilación en la región variable, puede resultar en inmunogenicidad incrementada del anticuerpo o una alteración del pK del anticuerpo, debido a enlace de antígeno alterado (Marshall *et al* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala FA y Morrison SL (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al* (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al* (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). La glicosilación ha sido mostrada por ocurrir en porciones que contienen la secuencia N-X-S/T. La glicosilación de región variable puede ser probada usando un ensayo Glycoblot, el cual desdobla el anticuerpo para producir un Fab, y después examina para glicosilación usando un ensayo que mide la oxidación de peryodato y formación de base Schiff. Como alternativa, la glicosilación de región variable puede ser probada usando cromatografía de luz Dionex (Dionex-LC), con sacáridos desdoblados a partir de un Fab en monosacáridos, y analiza el contenido de sacárido individual. En algunos casos, es preferido tener un anticuerpo anti-Glipicano-3 que no contiene glicosilación de región variable. Esto se puede lograr ya sea, seleccionando anticuerpos que no contienen la porción de glicosilación en la región variable, o mutando restos dentro de la porción de glicosilación usando técnicas estándares bien conocidas en la técnica.

En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención, no contienen sitios de isomerismo de asparagina. Una desamidación o efecto de ácido isoaspártico puede ocurrir en secuencias N-G o D-G, respectivamente. La desamidación o efecto de ácido isospártico, resulta en la creación de ácido isospártico el cual reduce la estabilidad de un anticuerpo para crear una estructura quebrada de un término de cadena lateral en lugar de la cadena principal. La creación de ácido aspártico puede ser medida usando un ensayo iso-quant, el cual usa HPLC de fase inversa para probar para el ácido aspártico.

Cada anticuerpo tendrá un punto isoeléctrico único (pI), pero en general, los anticuerpos caerán en el intervalo de pH de entre 6 y 9,5. El pI para un anticuerpo IgG1, normalmente cae dentro del intervalo de pH de 7-9,5 y el pI para un anticuerpo IgG4, normalmente cae dentro del intervalo de pH de 6-8. Los anticuerpos pueden tener un pI que está fuera de este intervalo. Aunque los efectos son en general desconocidos, existe especulación de que los anticuerpos con un pI fuera del intervalo normal, pueden tener alguna inestabilidad y despliegue bajo condiciones *in vivo*. El punto isoeléctrico puede ser probado usando un ensayo de enfoque isoeléctrico capilar, el cual crea un gradiente de pH y puede utilizar enfoque láser para exactitud incrementada (Janini *et al* (2002) *Electrophoresis* 23:1605-11; Ma *et al.* (2001) *Chromatographia* 53:S75-89; Hunt *et al* (1998) *J Chromatogr A* 800:355-67). En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-Glipicano-3 que contenga un valor pI que cae en el intervalo normal. Esto se puede lograr ya sea, seleccionando anticuerpos con un pI en el intervalo normal, o mutando restos de superficie cargados, usando técnicas estándares bien conocidas en la técnica.

Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión que es indicativa de la estabilidad térmica (Krishnamurthy R y Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Una estabilidad térmica superior, indica mayor estabilidad de anticuerpo total *in vivo*. El punto de fusión de un anticuerpo puede ser medido usando técnicas tales como calorimetría de exploración diferencial (Chen *et al* (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando *et al* (1999) *Immunol Lett* 68:47-52). T_{M1}, indica la temperatura del despliegue inicial del anticuerpo. T_{M2} indica la temperatura del despliegue completo del anticuerpo. En general, se prefiere que la T_{M1} de un anticuerpo de la presente invención, sea mayor de 60 ºC, preferiblemente, mayor de 65 ºC, aún más preferiblemente, mayor de 70 ºC. Como alternativa, la estabilidad térmica de un anticuerpo puede ser medida usando dicroísmo circular (Murray *et al.* (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

En una realización preferida, son seleccionados anticuerpos que no se degraden rápidamente. La fragmentación de un anticuerpo anti-Glipicano-3 puede ser medida usando electroforesis capilar (CE) y MALDI-MS, como es bien entendido en la técnica (Alexander AJ y Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

En otra realización preferida, son seleccionados anticuerpos que tengan efectos de agregación mínimos. La agregación puede conducir a activación de una respuesta inmune indeseada y/o propiedades farmacocinéticas alteradas o desfavorables. En general, los anticuerpos son aceptables con agregación de 25 % o menos, preferiblemente, 20 % o menos, aún más preferiblemente, 15 % o menos, aún más preferiblemente, 10 % o menos y aún más preferiblemente, 5 % o menos. La agregación puede ser medida por varias técnicas bien conocidas en la técnica, que incluyen cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y dispersión de luz, para identificar monómeros, dímeros, trímeros o multímeros.

Métodos para diseñar anticuerpos por ingeniería genética

Como se discute anteriormente, los anticuerpos anti-Glipicano-3 que tienen secuencias V_H y V_K descritas en la presente, pueden ser usados para crear nuevos anticuerpos anti-Glipicano-3, modificando las secuencias V_H y/o V_K, o la(s) región(es) constante(s) unidas a estas. De este modo, en otro aspecto de la divulgación, las características estructurales de un anticuerpo anti-Glipicano-3 de la invención, por ejemplo, 4A6, 11E7, y 16D10, son usadas para crear anticuerpos anti-Glipicano-3 estructuralmente relacionados, que retienen al menos, una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tales como enlace a Glipicano-3 humano. Por ejemplo, una o más regiones CDR de 4A6, 11E7, y 16D10, o mutaciones de las mismas, pueden ser combinadas recombinantemente con regiones marco conservadas conocidas y/o otras CDRs para crear anticuerpos anti-Glipicano-3, recombinantemente diseñados por ingeniería, adicionales, de la divulgación, como se discute anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen aquellas descritas en la sección previa. El material de partida para el método diseñado por ingeniería es uno o más de las secuencias V_H y/o V_K proporcionadas aquí, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo diseñado por ingeniería, no es necesario preparar actualmente (es decir, expresar como una proteína), un anticuerpo que tiene una o más secuencias V_H y/o V_K proporcionadas aquí, o una o más regiones CDR de las mismas. Preferentemente, la información contenida en la(s) secuencia(s), se usa como el material de partida para crear una secuencia de “segunda generación”, derivada de la(s) secuencia(s) original(es) y después, la(s) secuencia(s) de “segunda generación”, se prepara y expresa como una proteína.

Por consiguiente, en otro aspecto, la divulgación proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-Glipicano que comprende:

(a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada que comprende, una secuencia CDR1 seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº: 1, 2, y 3, una secuencia CDR2 seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 4, 5, y 6, y/o una secuencia CDR3 seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 7, 8, y 9; y/o (ii) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera que comprende, una secuencia CDR1 seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 10, 11, y 12, una secuencia CDR2 seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº: 13, 14, y 15, y/o una secuencia CDR3 seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº: 16, 17, y 18;
(b) alterar al menos, un residuo de aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera, para crear al menos, una secuencia de anticuerpo alterada; y

(c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.
Pueden usarse técnicas de biología molecular estándares, para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada.

Preferiblemente, el anticuerpo codificado por la(s) secuencia(s) de anticuerpo alterada(s) es uno que retiene una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-Glipicano-3 descritos en la presente, en los cuales las propiedades funcionales incluyen, pero no se limitan a:

(i) unirse a Glipicano-3 humano con un K_D de $1x10^{-7}$ M o menor;
(ii) unirse a células CHO humanas transfectadas con Glipicano-3.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados pueden ser valoradas usando ensayos estándares disponibles en la técnica, y/o descritos en la presente, tales como aquellos expuestos en los Ejemplos (por ejemplo, citometría de flujo, ensayos de enlace).

En ciertos aspectos de los métodos de la invención de anticuerpos diseñados por ingeniería, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente o selectivamente, junto con toda o parte de una secuencia codificante de anticuerpo anti-Glipicano-3, y los anticuerpos anti-Glipicano-3 modificados resultantes, pueden ser seleccionados para determinar actividad de enlace y/o otras propiedades funcionales como se describe en la presente. Los métodos mutacionales han sido descritos en la técnica. Por ejemplo, la Publicación de PCT WO 02/092780 por Short, describe métodos para crear y seleccionar mutaciones de anticuerpo usando mutagénesis de saturación, montaje de ligación sintética, o una combinación de los mismos. Como alternativa, la Publicación de PCT WO 03/074679 por Lazar *et al.,* describe métodos para usar métodos de selección por computadora para optimizar propiedades fisicoquímicas de anticuerpos.

Moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos de la invención

Otro aspecto de la invención concierne a moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en forma sustancialmente pura o parcialmente purificada. Un ácido nucleico es “aislado” o “considerado sustancialmente puro”, cuando se purifica lejos de otros componentes u otros contaminantes celulares, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas estándares, que incluyen tratamiento SDS/alcalino, bandas de CsCl, cromatografía de columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase, F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley Interscience, New York. Un ácido nucleico de la invención puede ser por ejemplo, ADN o ARN y puede o no puede contener secuencias intrónicas. En una realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener usando técnicas de biología molecular estándar. Para anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que llevan genes de inmunoglobulina humana como se describe además abajo), los ADNsc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo hecho por el hibridoma, se pueden obtener por amplificación de PCR estándar o técnicas de clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos de una biblioteca de gen de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de despliegue de fago), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede ser recuperado a partir de la biblioteca.

Las moléculas de ácido nucleico preferidas de la invención, son aquellas que codifican las secuencias de V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7, o 16D10. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias V_H de 4A6, 11E7, o 16D10, se muestran en SEC ID Nº: 25, 26, y 27, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de V_L de 4A6, 11E7, o 16D10, se muestran en SEC ID Nº: 28, 29, y 30, respectivamente.

Otros ácidos nucleicos preferidos de la invención, son ácidos nucleicos que tienen al menos, 80 % de identidad de secuencia, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia, con una de las secuencias mostradas en las SEC ID Nº: 25, 26, 27, 28, 29, y 30, en las cuales los ácidos nucleicos codifican un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo.

El porcentaje de identidad entre las dos secuencias de ácido nucleico, es el número de posiciones en la secuencia en la cual el nucleótido es idéntico, tomando en cuenta el número de aperturas y la longitud de cada apertura, la cual necesita ser introducida para alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede realizarse usando un algoritmo matemático, tal como el algoritmo de Meyers y Miller o el programa XBLAST de Altschul descrito anteriormente.

Además, los ácidos nucleicos preferidos de la divulgación comprenden una o más porciones que codifican CDR de las secuencias de ácido nucleico mostradas en las SEC ID Nº: 25, 26, 27, 28, 29, y 30. En esta realización, el ácido nucleico puede codificar la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada de 4A6, 11E7, o 16D10 o la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera de 4A6, 11E7, o 16D10.

Los ácidos nucleicos los cuales tienen al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 9 % de identidad de secuencia, con tal porción que codifica CDR de SEC ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, o 30, también son ácidos nucleicos preferidos de la divulgación. Tales ácidos nucleicos pueden diferir de la porción correspondiente de la SEC ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, o 30, en una región CDR no codificante y/o en una región codificante CDR. En donde la diferencia está en una región codificante de CDR, la región CDR de ácido nucleico codificada por el ácido nucleico, normalmente comprende una o más modificaciones de secuencia conservativa como se define en la presente, comparada con la secuencia CDR correspondiente de 4A6, 11E7, y 16D10.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican segmentos de V_H y V_L, estos fragmentos de ADN pueden ser además manipulados por técnicas de ADN recombinantes estándares, por ejemplo, para convertir los genes de región variable a genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, a genes de fragmento Fab o a un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica a V_L- o V_H-, está operativamente ligado a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. El término “operativamente ligado”, como se usa en este contexto, está propuesto para significar que los dos fragmentos de ADN están unidos, de manera tal que las secuencias de aminoácido codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en la estructura.

El ADN aislado que codifica la región V_H, puede ser convertido a un gen de cadena pesada de longitud completa, operativamente enlazando el ADN que codifica a V_H a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humana, son conocidas en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E. A., *et al*. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones, se pueden obtener por amplificación de PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferiblemente, es una región constante IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica a V_H puede ser operativamente ligado a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región V_L, puede ser convertido a un gen de cadena ligera de longitud completa (así como también un gen de cadena ligera Fab), ligando operativamente el ADN que codifica a V_L a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humana, se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones, sepueden obtener por amplificación de PCR estándar. En realizaciones preferidas, la región constante de cadena ligera, puede ser una región constante Kappa o lambda.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL, son operativamente ligados a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4 -Ser)3, de manera que las secuencias VH y VL pueden ser expresadas como una proteína de cadena única contigua, con las regiones V_L y V_H unidas por el enlazador flexible (véase por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554).

Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) de la presente invención, pueden ser producidos por varias técnicas, que incluyen metodología de anticuerpo convencional, por ejemplo, la técnica estándar de hibridización de células somáticas por Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495. Aunque los procedimientos de hibridización de células somáticas son preferidos, en principio, pueden ser empleadas otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento bien establecido. Los protocolos de inmunización y técnicas para aislamiento de esplenocitos inmunizados por fusión, son conocidos en la técnica. Los patrones de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión, también son conocidos.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente divulgación, pueden ser preparados basados en la secuencia deun anicuerpo monoclonal no humano preparado como se describe anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena ligera y pesada, se puede obtener a partir de hibridoma no humano de interés y diseñado por ingeniería para contener secuencias de inmunoglobulina no murina (por ejemplo, humana), usando técnicas de biología molecular estándar. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murina pueden ser ligadas a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567 por Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado, regiones CDR murinas pueden ser insertads en un armazón humano usando métodos conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 5.225.539 por Winter, y Patentes de Estados Unidos n.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.).

Los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra Glipicano-3, pueden ser generados usando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmune humano en lugarl del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen, ratones referidos aquí como el HuMAb Mouse® y KM Mouse®, respectivamente, y son colectivamente referidos en la presente como “ratones Ig humanos”.

El HuMAb Mouse® (Medarex®, Inc.) contiene minilocus del gen de inmunoglobulina humano que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera κ y pesada humana no reordenada (μ y γ), junto con mutaciones objetivo que inactiva el locus de cadena μ y κ endógena (véase, por ejemplo, Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859). Por lo tanto, el ratón exhibe expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a inmunización, los transgenes de cadena ligera y pesada humana introducidos, experimentan intercambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgGκ humanos de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), supra; revisado en Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546). La preparación y uso del HuMAb Mouse®, y las modificaciones genómicas llevados por los ratones, se describen adicionalmente en Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuaillon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuaillon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; y Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851.. Véase además, Patentes de Estados Unidos Nº. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas de Lonberg y ay; Patente de Estados Unidos n.º 5.545.807 de Surani et al.; Publicaciones PCT N.º WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y Publicación PCT No. WO 01/14424 de Korman et al.

En otra realización, los anticuerpos humanos de la divulgación se pueden construir usando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porta un transgen de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Este ratón se refiere en la presente como un "ratón KM®", y se describe en detalle en la Publicación PCT WO 02/43478 por Ishida et al.

Aún adicionalmente, sistemas animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden usar para construir anticuerpos anti-Glipicano-3 de la divulgación. Por ejemplo, se puede usar un sistema transgénico alternativo se refiere al XenoMouse (Abgenix, Inc.); Kucherlapati y cols describen dichos ratones, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidoss Nº. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 por.

Además, sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden usar para construir anticuerpos anti-Glipicano-3 de la divulgación. Por ejemplo, se pueden usar ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, denominados "ratones TC"; estos ratones se describen en Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Además, se han descrito en la técnica vacas que portan transcromosomas de cadena pesada y ligera humanos (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894) y solicitud PCT No. WO/2002/092812 y se pueden usar para construir anticuerpos anti-Glipicano-3 de la divulgación.

También se pueden preparar los anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación usando métodos de presentación en fagos para selección de bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Se establecen en la técnica los métodos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos. Véase por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 por Ladner et al.; Patentes de Estados Unidos N.º 5.427.908 y 5.580.717 por Dower et al.; Patentes de Estados Unidos N.º 5.969.108 y 6.172.197 por McCafferty et al.; y Patentes de Estados Unidos N.º 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 por Griffiths et al.

También se pueden preparar los anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación usando ratones SCID en los cuales las células inmunes humanas se han reconstituido de forma que se puede generar una respuesta del anticuerpo humano en inmunización. Estos ratones se describen en, por ejemplo, en las patente de Estados Unidoss Nº. 5.476.996 y 5.698.767. Wilson et al.

Inmunización de Ratones Ig Humanos

Cuando se usan ratones Ig humano para construir anticuerpos humanos de la invención, estos ratones se pueden inmunizar con una preparación purificada o enriquecida de antígeno Glipicano-3 y/o Glipicano-3 recombinante, o células que expresan Glipicano-3, o una proteína de fusión Glipicano-3, como se describe por Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; y Publicación PCT WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferiblemente, los ratones pueden ser de 6-16 semanas de edad en la primera infusión. Por ejemplo, se puede usar una preparación purificada o recombinante (5-50 μg) de antígeno Glipicano-3 para inmunizar intraperitonealmente los ratones Ig humano.

Se describen procedimientos detallados para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para Glipicano-3 en el Ejemplo 1 posterior. La experiencia acumulativa con varios antígenos ha mostrado que los ratones transgénicos responde cuando son inicialmente inmunizados intraperitonealmente (IP) con antígeno en adyuvante de Freund completo, seguido por inmunizaciones IP cada semana (hasta un total de 6) con el antígeno en adyuvante de Freund completo. Sin embargo, también se pueden encontrar por ser efectivos adyuvantes diferentes del Freund. Además, se encuentran células completas en la ausencia del adyuvante por ser altamente inmunogénicas. La respuesta inmune se puede monitorear durante el curso del protocolo de inmunización con muestras de plasma siendo obtenidas por hemorragias retroorbitales. El plasma se puede seleccionar por ELISA (como se describe posteriormente), y se pueden usar por fusiones los ratones con tituladores suficientes de inmunoglobulina humana anti-Glipicano-3. Los ratones se pueden reforzar intravenosamente con antígeno 3 días antes del sacrificio y remover el bazo. Se espera que se puedan realizar 2-3 fusiones para cada inmunización. Entre 6 y 24 ratones son normalmente inmunizados por cada antígeno. En una realización, se pueden usar cepas de ratón que portan cepas de transgen de cadena pesada humana HCo7, HCo12 o HCo17. Como alternativa o adicionalmente, se puede usar la cepa KM Mouse®. Además, dos o más de estas cepas se pueden reproducir juntas en un ratón único que tiene una pluralidad de diferentes transgenes de cadena pesada humana.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención, se pueden aislar esplenocitos y/o células del nodo linfático a partir de ratones inmunizados y fusionar a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se pueden seleccionar para la producción de anticuerpos específicos al antígeno. Por ejemplo, las suspensiones celulares únicas de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados se pueden fusionar de uno a seis el número de células de mieloma de ratón no secretada P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50 %. Como alternativa, la suspensión celular única de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados se pueden fusionar usando un método de electrofusión basado en el campo eléctrico, usando un electroporador de fusión celular de cámara grande CytoPulse (CytoPulse Sciences, Inc., Glen Burnie Maryland). Las células se colocan en aproximadamente 2 x 10^5 en placa de microtitulador de fondo plano, seguido por una incubación de dos semanas es medio selectivo que contiene Suero de Clon fetal al 20 %, medio acondicionado "653" al 18 %, origen al 5 % (IGEN), 4 ml de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 5 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma; se agrega el HAT 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células se pueden cultivar en medio en el cual el HAT se reemplaza con HT. Las cavidades individuales se pueden seleccionar por ELISA para anticuerpos IgM e IgG monoclonales humanos. Una vez que ocurre el crecimiento del hibridoma extensivo, el medio se puede observar usualmente después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpo se puede volver a colocar en placas, se seleccionan nuevamente, y si aún es positivo para IgG humano, los anticuerpos monoclonales se pueden subclonar al menos dos veces limitando la dilución. Los subclones estables entonces se pueden cultivar *in vitro* para generar cantidades pequeñas del anticuerpo en medio de cultivo del tejido para caracterización.

Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, los hibridomas seleccionados se hacen crecer en matraces para centrifugar de dos litros para purificación de anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A sefarosa (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La IgG eluida se puede verificar por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para asegurar la pureza. La solución amortiguadora se puede intercambiar en PBS; y la concentración se puede determinar por OD280 usando el coeficiente de extinción 1,43. Se pueden hacer alícuotas de los anticuerpos monoclonales y almacenarlos a -80°C.

Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales

También se pueden producir anticuerpos de la invención en un transfectoma de célula hospedadora usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección del gen como son bien conocidas en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmento de anticuerpo de los mismos, se pueden obtener ADNs que codifican cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o parcial, por técnicas de biología molecular estándar (por ejemplo, amplificación PCR o clonación ADNc usando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y el ADNc se puede insertar en los vectores de expresión de forma que los genes están operativamente enlazados a secuencias de control transcripcional o traduccional. En este contexto, el término "unido operativamente" pretende indicar que un gen de anticuerpo está ligado en un vector de forma que las secuencias de control transcripcional o traduccional dentro del vector sirven para su función planeada de regular la transcripción o traducción del gen de anticuerpo. Las secuencias de vector de expresión y control de expresión se eligen por ser compatibles con la célula hospedadora de expresión usada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vector separado o, más normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementaria en el fragmento del gen de anticuerpo y vector, o ligación de extremo romo si no están presentes los sitios de restricción). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los

anticuerpos descritos en la presente se pueden usar para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena ligera del isotipo deseado de forma que el segmento V_H está unido operativamente a los segmentos C_H dentro del vector y el segmento V_K está unido operativamente al segmento C_L dentro del vector. Adicionalmente o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula hospedadora. El gen de cadena del anticuerpo se puede clonar en el vector de forma que el péptido señal está enlazado en armazón a términos amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterogéneo (es decir, un péptido señal de una proteína no de inmunoglobulina).

Además de los genes de cadenas del anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la invención lleva secuencias regulatorias que controlan la expresión de los genes de cadena del anticuerpo en una célula hospedadora. El término "secuencia reguladora" se pretende por incluir promotores, intensificadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Las secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Será apreciado por aquellos expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión, que incluye la selección de secuencias reguladoras, puede depender de los factores como la elección de la célula hospedadora a ser transformada, el nivel de expresión de proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para expresión de célula hospedadora de mamífero incluyen elementos virales que dirigen niveles altos de expresión de proteína en células de mamífero, tal como promotores y/o intensificadores derivados de citomegalovirus (CMV), Virus de Simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y polioma. Como alternativa, se pueden usar las secuencias regulatorias no virales, tal como el promotor de ubiquitina o promotor β-globina. Aún adicionalmente, los elementos regulatorios compuestos de secuencias a partir de diferentes fuentes, tal como el sistema promotor SRα, el cual contiene secuencias del promotor temprano SV40 y la repetición terminal larga del virus tipo 1 de leucemia en célula T humana (Takebe, Y. et al. (1988) *Mol. Cell. Biol*. 8:466-472.

Además de los genes de cadenas del anticuerpo y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden portar secuencias adicionales, tal como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospedadoras en las cuales el vector se ha introducido (véase por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N.º 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas por Axel et al.). Por ejemplo, normalmente, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tal como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la cual el vector se ha introducido. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen reductasa de dihidrofolato (DHFR) (para uso en células hospedadoras dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para selección G418).

Para expresión de las cadenas ligera y pesada, los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula hospedadora por técnicas estándar. Las formas variadas del término "transfección" se planean abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procariótica o eucariótica, por ejemplo, electroporación, precipitación de calcio-fosfato, transfección de DEAE-dextrano y similares. A pesar que es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en ya sea células procarióticas o eucarióticas, la expresión de anticuerpos en células eucarióticas, y más preferiblemente en células hospedadoras de mamífero, es la más preferida debido a que las células eucarióticas, y en particular las células de mamífero, son más similares que las células procarióticas para montar y secretar un anticuerpo inmunológicamente activo y apropiadamente plegado. La expresión procariótica de los genes del anticuerpo se han reportado por ser inefectivos para la producción de altos rendimientos del anticuerpo activo (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13).

Las células hospedadoras de mamífero preferidas para expresión de los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de Ovario de Hámster Chino (células CHO)(que incluyen células CHO dhfr, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión del gen GS descrito en WO 87/04462 (por Wilson), WO 89/01036 (por Bebbington) y EP 338.841 (por Bebbington). Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpo se introducen en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras por un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras, más preferiblemente, secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual se hacen crecer las células hospedadoras. Los anticuerpos se pueden recuperar a partir del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteína estándar.

Caracterización de la unión del anticuerpo al antígeno

Se pueden probar anticuerpos de la invención para unirse a Glipicano-3, por ejemplo, ELISA estándar. Brevemente, las placas microtituladores se recubren con Glipicano-3 purificado a 0,25 µg/ml en PBS, y después se bloquean con

albúmina suero de bovino al 5 % en PBS. Se agregan diluciones del anticuerpo (por ejemplo, diluciones de plasma a partir de ratones inmunizados con Glipicano-3) a cada cavidad y se incuban por 1-2 horas a 37°C. Las placas se lavan con PBS/Tween y después se incuban con reactivos secundarios (por ejemplo, para anticuerpos humanos, un reactivo policlonal específico a IgG Fc anti-humano de cabra) conjugado a fosfatasa alcalina por 1 hora a 37°C. Después del lavado, las placas, las placas se desarrollan con sustrato pNPP (1 mg/ml), y se analizan a OD de 405-650. Preferiblemente, se pueden usar los ratones los cuales desarrollan los tituladores altos para fusiones.

También se puede usar un ensayo ELISA como se describe anteriormente para seleccionar hibridomas que muestran reactividad positiva con un inmunógeno Glipicano-3. Los hibridomas que se enlazan con alta avidez a Glipicano-3, se subclonan y caracterizan adicionalmente. Un clon de cada hibridoma, el cual retiene la reactividad de las células precursoras (por ELISA), se puede elegir para elaborar un banco celular de 5-10 viales almacenados a -140°C, y para purificación de anticuerpo.

Para purificar anticuerpos anti-Glipicano-3, se pueden hacer crecer hibridomas seleccionadas en matraces para centrifugación de dos litros para purificación de anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A sefarosa (Pharmacia, Piscataway, NJ). Se puede verificar el IgG eluido por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para asegurar la pureza. La solución amortiguadora se puede intercambiar en PBS, y la concentración se puede determinar por OD280 usando el coeficiente de extinción 1,43. Los anticuerpos monoclonales se pueden forman en alícuotas y almacenar a -80°C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-Glipicano-3 seleccionados enlazados a epítopos únicos, cada anticuerpo puede ser biotinilado usando reactivos comercialmente disponibles (Pierce, Rockford, IL). Se pueden realizar los estudios de competición usando anticuerpos monoclonales no etiquetados y anticuerpos monoclonales biotinilados usando placas ELISA recubiertas con Glipicano-3 como se describe anteriormente. El enlace mAb biotinilado se puede detectar con una sonda de fosfatasa alcalina-estreptavidina.

Para determinar el isotipo de anticuerpos purificados, se puede realizar ELISA en el isotipo usando reactivos específicos para anticuerpos de un isotipo particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo monoclonal humano, las cavidades de las placas microtituladoras se puede recubrir con 1 µg/ml de inmunoglobulina anti-humano durante la noche a 4°C. Después del bloqueo con BSA al 1 %, las placas se hacen reaccionar con 1 µg/ml o menos de anticuerpos monoclonales de prueba o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente por una o dos horas. Las cavidades después se pueden hacer reaccionar con cualquiera de las sondas conjugadas de fosfatasa alcalina específica para IgM humano o IgG1 humano. Las placas se desarrollan y analizan como se describe anteriormente.

Los IgG humanos anti-Glipicano-3 se puede además probar para reactividad con antígeno Glipicano-3 por transferencia de Western. Brevemente, se puede preparar Glipicano-3 y someter a electroforesis en gel de dodecil sulfato poliacrilamida de sodio. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero de ternero fetal al 10 % y se sondean con los anticuerpos monoclonales a ser probados. Los enlace IgG humanos se pueden detectar usando fosfatasa alcalina IgG anti-humano y se desarrollan con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem, Co., St. Lous, Mo.).

La especificidad de unión de un anticuerpo de la invención también se puede determinar monitoreando el enlace del anticuerpo a células que expresan Glipicano-3, por ejemplo, por citometría de flujo. Normalmente, una línea celular, tal como una línea de célula CHO, se puede transfectar con un vector de expresión que codifica una forma de transmembrana de Glipicano-3. La proteína transfectada puede comprender una etiqueta, tal como una etiqueta myc, preferiblemente como los términos N, para detección usando un anticuerpo para la etiqueta. Se puede determinar el enlace de un anticuerpo de la invención para Glipicano-3 incubando las células transfectadas con el anticuerpo, y detectando en anticuerpo enlazado. Se puede usar el enlace de un anticuerpo a la etiqueta en la proteína transfectada como un control positivo.

La especificidad de un anticuerpo de la invención para Glipicano-3 se puede estudiar adicionalmente para determinar si o no el anticuerpo se une a otras proteínas (por ejemplo, Glipicano-1, Glipicano-2, Glipicano-4 o Glipicano-6) o se determina para el mismo Glipicano-3 usando los mismos métodos por el cual se une a Glipicano-3.

Inmunoconjugados

En otro aspecto, la presente invención caracteriza un anticuerpo anti-Glipicano-3, o un fragmento del mismo, conjugado a una porción terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Estos conjugados son referidos en la presente como "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas son referidos como "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial a células (por ejemplo, asesinas). Ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracin diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina, y análogos de u homólogos de los mismos. Agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo,

metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes de alquilación (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomannitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que se pueden conjugar a un anticuerpo de la invención, incluyen duocarmicinas, calicamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de los mismos. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo calicamicina que está farmacéuticamente disponible (Mylotarg®; American Home Products).

Las citotoxinas se pueden conjugar a anticuerpos de la invención usando tecnología enlazadora disponible en la técnica. Ejemplos de tipos de enlazadores que se han usado para conjugar una citotoxina a un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, tioésteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptido. Un enlazador se puede elegir por ser, por ejemplo, susceptible a desdoblamiento por pH bajo dentro del compartimiento lisosomal o susceptible a desdoblamiento por proteasas, tal como proteasas preferencialmente expresadas en tejido de tumor tal como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

Ejemplos de citotoxinas se describen, por ejemplo en las Patentes de Estados Unidos N.º 6.989.452, 7.087.600, y 7.129.261, y en las solicitudes PCT N.º PCT/US02/17210, PCT/US2005/017804, PCT/US06/37793, PCT/US06/060050, PCT/US2006/060711, WO/2006/110476, y en la Solicitud de Estados Unidos Nº 60/891.028. Para discusión adicional de tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos a anticuerpos, véase también Saito, G. *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev*. 55:199-215; Trail, P.A. *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother*. 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev*. 53:247-264.

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden conjugar a un isótopo radioactivo para generar radiofarmacéuticos citotóxicos, también referidos como radioinmunoconjugados. Ejemplos de isótopos radioactivos que se pueden conjugar a anticuerpos para uso diagnósticamente o terapéuticamente incluyen, pero no se limita a, yodo^{131}, indio^{111}, itrio^{90} y lutecio^{177}. Se establece en la técnica el método para preparar radioinmunoconjugados. Ejemplos de radioinmunoconjugados están comercialmente disponibles, incluyendo Zevalin® (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals), y se pueden usar métodos similares para preparar radioinmunoconjugados usando los anticuerpos de la invención.

Los conjugados del anticuerpo de la invención, se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada, y la porción del fármaco no se construye para limitar agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción del fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Estas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento del mismo activo, tal como abrina, ricina A, exotoxinas de pseudomonas o toxina de difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón γ, o modificadores de respuesta biológica tal como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor que estimula la colonia macrófaga de granulocito ("GM-CSF"), factor que estimula la colonia de granulocito ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Son bien conocidas las técnicas para conjugar la porción terapéutica a anticuerpos, véase por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, la presente invención caracteriza moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-Glipicano-3, o un fragmento del mismo de la invención. Un anticuerpo de la invención, o porciones que se enlazan al antígeno del mismo, se puede derivatizar o enlazar a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando al receptor) para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos diferentes sitios de enlace o molécula objetivo. El anticuerpo de la invención puede de hecho ser derivatizada o enlazada a más de una molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos diferentes sitios de enlace y/o moléculas objetivo; estas moléculas multiespecíficas también se pretenden sean abarcadas por el término "molécula biespecífica" como se usa en la presente. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención puede ser funcionalmente enlazado (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación monovalente o de otra forma) a uno o más de otras moléculas de enlace, tal

como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de enlace, de forma que resulta una molécula biespecífica.

Por lconsiguiente, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para Glipicano-3 y una segunda especificidad de unión o un segundo epítopo objetivo. En una realización particular de la invención, el segundo epítopo objetivo es un receptor Fc, por ejemplo, FCγRI humano (CD64) o un receptor Fcα humano (CD89). Por lo tanto, la invención incluye moléculas biespecíficas capaces de enlazar tanto células efectoras que expresan FcγR o FCαR (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMNs)), como Glipicano-3 que expresa células diana. Estas células que expresan Glipicano-3 dirigidas a moléculas biespecíficas a células efectoras y provoca actividades de célula efectora medidas por el receptor Fc, tal como fagocitosis de células que expresan Glipicano-3, citotoxicidad mediada por célula dependiente del anticuerpo (ADCC), liberación de citocina o generación de anión de superóxido.

En una realización de la invención en la cual la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede además incluir una tercera especificidad de unión, además a una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-Glipicano-3. En una realización, la tercera especificidad de unión es una porción del factor anti-intensificación (EF), por ejemplo, una molécula la cual se une a una proteína de superficie involucrada en actividad citotóxica y con ello libera la respuesta inmune contra la célula objetivo. La "porción del factor anti-intensificación" puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y con ello resulta en una intensificación del efecto de los determinantes de enlace para el receptor Fc o antígeno de la célula objetivo. La "porción del factor anti-intensificación" puede enlazar un receptor Fc a un antígeno de célula objetivo. Como alternativa, la porción del factor anti-intensificación se puede enlazar a una entrada que es diferente de la entrada a la cual la primera y segunda especificidades de enlace se unen. Por ejemplo, la porción del factor anti-intensificación puede enlazar una célula T citotóxica (por ejemplo, vía CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmune que resulta en una respuesta inmune incrementada contra la célula objetivo).

En una realización, las moléculas biespecíficas de la divulgación comprenden una especificidad de unión al menos un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, que incluye, por ejemplo un Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, Fd, dAb o una cadena Fv única. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv a un constructo de cadena única como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 4.946.778 por Ladner et al., los contenidos lo cuales expresamente se incorpora para referencia.

En una realización, la especificidad de unión para un receptor Fcγ se proporciona por un anticuerpo monoclonal, el enlace el cual no se bloquea por inmunoglobulina humana G (lgG). Tal como se usa en el presente documento el término "receptor lgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena γ localizados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce transmembranas o isoformas del receptor soluble los cuales se agrupan en clases del receptor Fcγ: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), y Fcγ RIII (CD16). En una realización preferida, el receptor Fcγ un FcγRI de alta afinidad humano. El Fcγ RI humano es una molécula de 72 kDa, la cual muestra alta afinidad para lgG monomérico (10^8 – $10^9 M^{-1}$).

La producción y caracterización de ciertos anticuerpos monoclonales anti-Fcγ preferidos se describe en la Publicación PCT WO 88/00052 y en la Patente de Estados Unidos Nº. 4.954.617 por Fanger et al., las enseñanzas las cuales se incorporan completamente para referencia en la presente. Estos anticuerpos enlazados a un epítopo de FcγRI, FcγRII o FcγRIII en un sitio el cual es distinto del sitio de enlace Fcγ del receptor y, de esta forma, su enlace no se bloquea sustancialmente por niveles fisiológicos de lgG. Anticuerpos anti-FcγRI específicos útiles en esta invención son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. Los hibridomas que produce mAb 32 están disponibles a partir de la American Type Culture Collection, ATCC No. de acceso HB9469. En otras realizaciones, el anticuerpo del receptor anti-Fcγ es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R.F. *et al.* (1995) *J. Immunol* 155 (10): 4996-5002 y Publicación PCT WO 94/10332 por Tempest et al. La línea celular que produce el anticuerpo H22 se depositó en la American Type Culture Collection bajo la designación HA022CL1 y tiene en no. de acceso CRL 11177.

En otras realizaciones más preferidas, la especificidad de unión para un receptor Fc se proporciona por un anticuerpo que se une a un receptor lgA humano, por ejemplo, un receptor Fc-alfa (FcαRI (CD89)), el enlace el cual es preferiblemente no bloqueado por inmunoglobulina A humana (lgA). El término "receptor lgA" se planea para incluir el producto del gen de un gen α (FcαRI) localizado en el cromosoma 19. Este gen se conoce por codificar varias isoformas de transmembrana como alternativa empalmadas de 55 hasta 110 kDa. El FcαRI (CD89) es constitutivamente expresado en monocitos/macrófagos, eosinófilos y granulocitos neutrofílicos, pero no en poblaciones celulares no-efectoras. El FcαRI tiene afinidad media (≈ 5×10^7 M^{-1}) para tanto lgA1 como lgA2, la cual se incrementa con la exposición a citocinas tal como G-CSF o GM-CSF (Morton, H.C. *et al.* (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440). Se ha descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos a FcαRI, identificados como A3, A59, A62 y A77, los cuales enlazan FcαRI fuera del dominio de enlace del ligando lgA, (Monteiro, R.C. *et al.* (1992) *J. Immunol*. 148:1764).

FcαRI y FcγRI son receptores activadores preferidos para uso en las moléculas biespecíficas de la invención porque (1) se expresan principalmente en células efectoras inmunes, por ejemplo, monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) expresados a altos niveles (por ejemplo, 5.000-100.000 por célula); (3) mediadores de actividades de citocina (por ejemplo, ADCC, fagocitosis), y (4) mediados por la presentación de antígeno intensificador de antígenos, que incluyen los mismos antígenos, dirigidos a estos.

Mientras se prefieren los anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos los cuales se puede emplear en las moléculas biespecíficas de la divulgación son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

Las moléculas biespecíficas de la presente invención se pueden preparar conjugando las especificidades de enlace constituyente, por ejemplo, las especificidades de enlace anti-FcR y anti-Glipicano-3, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica se puede genera separadamente y después conjugarse a otra. Cuando las especificidades de enlace son proteínas o péptidos, se pueden usar varios agentes de acoplamiento o reticulación para conjugados covalentes. Ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y 4-(N-maleimidometil)ciclohaxan-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) (véase por ejemplo, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med*. 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83, y Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol*. 139: 2367-2375). Agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos comercialmente disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de enlace son anticuerpos, se puede conjugar vía unión de sulfhidrilo de las regiones de articulación C-términos de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferida, la región bisagra contiene un número impar de restos de sulfhidrilo, preferiblemente uno, antes de la conjugación.

Como alternativa, ambas especificidades de enlace se puede codificar en el mismo vector y expresado. y montado en la misma célula hospedadora. Este método es particularmente útil en donde la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x $F(ab')_2$ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de cadena única que comprende un anticuerpo de cadena única y un determinante de enlace, o una molécula biespecífica de cadena única que comprende dos determinantes de enlace. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de cadena única. Se describen métodos para preparar moléculas biespecíficas por ejemplo en Patentes de Estados Unidoss Número 5.260.203; 5.455.030; 4.881.175; 5.132.405; 5.091.513; 5.476.786; 5.013.653; 5.258.498; y 5.482.858.

El enlace de las moléculas biespecíficas a sus objetivos específicos se puede confirmar por, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente similar a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición de crecimiento), o ensayo de Manchado Western. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos proteína-anticuerpo de interés particular empleando un reactivo etiquetado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos FcR-anticuerpo se pueden detectar usando, por ejemplo, un anticuerpo similar a la enzima o fragmento de anticuerpo el cual reconoce y se une específicamente a los complejos anticuerpo-FcR. Como alternativa, los complejos se pueden detectar usando cualquiera de otros varios inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser radioactivamente etiquetado y usado en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, Marzo, 1986.

Se puede detectar el isótopo radioactivo por los medios como el uso de un contador γ o un contador de escintilación o por autoradiografía.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos o porciones de enlace al antígeno del mismo, de la presente invención, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos, o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o biespecíficos) que se enlazan a diferentes epítopos en el antígeno objetivo o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en terapia de combinación, es decir, combinada con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-Glipicano-3 de la presente invención combinado con al menos otro agente anti-inflamatorio o inmunosupresor. Ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden usar en terapia de combinación se describen en mayor detalle posteriormente en la sección de usos de los anticuerpos de la invención.

Tal como se usa en el presente documento "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los

solventes, medio de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el portador es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, inmunoconjugado o molécula biespecífica, se puede recubrir en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puede inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no otorga cualquiera de los efectos biológicos indeseados (véase por ejemplo, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci*. 66:1-19). Ejemplos de las sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tal como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como ácidos orgánicos o tóxicos tal como ácidos mono-alifático y dicarboxílico, ácidos alcanóicos fenil-sustituidos, ácidos hidroxi alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónico alifático y aromático, y similares. Sales de adición de base incluyen aquellos derivados de metales alcalino térreo, tal como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un anti-oxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tal como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tal como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propil galato, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes de quelación de metal, tal como ácido cítrico, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se puede emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tal como glicerol, propilen glicol, polietilen glicol, y similares), y mezcla adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tal como etil oleato. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, para el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión, y para el uso de tensoactivo

.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes como preservativos, agentes de humectación, agentes de emulsificación y agentes de dispersión. Se puede asegura la prevención de presencia de microorganismos tanto por procedimientos de esterilización supra, como por la inclusión de agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, cloroetanol, ácido fenol sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tal como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Demás, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por la inclusión de agentes los cuales retrasan la absorción tal como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Se conoce en la técnica el uso del medio y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Salvo en la medida en que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. También se pueden incorporar en las composiciones compuestos suplementariamente activos.

Las composiciones terapéuticas normalmente pueden ser estériles y estables bajo las condiciones de manufactura y almacenaje. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol y polietilen glicol líquido y similares), y mezclas de los mismos adecuadas. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, para el mantenimiento del tamaño de partícula requerida en el caso de dispersión y por el uso de tensoactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tal como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Se puede provocar la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, como se requiera, seguido por microfiltración por esterilización. Generalmente, se preparan las dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y secado por congelamiento (liofilización) que proporciona un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del

mismo filtrada previamente esterilizada.

La cantidad del ingrediente activo el cual se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto a ser tratado, y la forma particular de administración. La cantidad del ingrediente activo el cual se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única, generalmente será la cantidad de la composición la cual produce un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente 0,01 por ciento hasta aproximadamente noventa y nueve por ciento del ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente 0,1 por ciento hasta aproximadamente 70 por ciento, más preferiblemente de aproximadamente 1 por ciento hasta aproximadamente 30 por ciento del ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se ajustan los regímenes de dosificación para proporcionar una respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un bolo único, se pueden administrar dosis varias veces dividida durante un tiempo o la dosis puede ser proporcionalmente reducida o incrementada como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para fácil administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación tal como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para formas de dosificación unitarios de la invención se dicta por y directamente depende de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a ser logrado, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Para administración del anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 hasta 100 mg/kg, y más usualmente 0,01 hata 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Regímenes de dosificación preferidas para un anticuerpo anti-Glipicano-3 de la invención incluye 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal vía administración intravenosa, con el anticuerpo siendo proporcionado usando uno de los siguientes esquemas de dosificación: (i) cada cuatro semanas por seis dosificaciones, entonces cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido por 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, se administran simultáneamente uno o dos anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de enlace, en este caso la dosificación de cada anticuerpo administrado caen dentro de intervalo indicado. El anticuerpo es usualmente administrado en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones únicas pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica por los niveles de sangre medidos de anticuerpo para en antígeno objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml en algunos métodos aproximadamente 25-300 µg/ml.

Como alternativa, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en este caso se requiere administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varía dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran una vida media prolongada, seguido por anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosificación y frecuencia de administración puede variar dependiendo si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuente durante un periodo de tiempo prolongado. Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento por el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos es algunas veces requerida hasta que el progreso de la enfermedad se reduce o termina, y preferiblemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser variados como para obtener una cantidad del ingrediente activo el cual es efectivo para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y forma de administración, sin ser tóxico al paciente. El nivel de dosificación seleccionada depende de varios factores de farmacocinética, que incluye la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal, amida de las mismas, la ruta de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular a ser empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica anterior del paciente a ser tratado, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Una "dosificación terapéuticamente efectiva" de un anticuerpo anti-Glipicano-3 de la invención, preferiblemente resulta en una disminución en severidad de síntomas de la enfermedad, un incremento en frecuencia y duración de periodo libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debido a la aflicción de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores Glipicano-3$^+$, una "dosificación terapéuticamente efectiva" preferiblemente inhibe el crecimiento celular o crecimiento de tumor por al menos aproximadamente 20 %, más preferiblemente por al menos aproximadamente 40 %, aún más preferiblemente por al menos aproximadamente 60 %, y todavía más preferible por al menos aproximadamente 80 % en relación a sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento del tumor se puede evaluar en un sistema de modelo animal predictivo de eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición se puede evaluar examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular, tal inhibición se puede medir *in vitro* por ensayos conocidos por un experto médico. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto terapéutico pude disminuir el tamaño del tumor, o de otra forma mejorar los síntomas en un sujeto. Un experto ordinario en la técnica puede ser capaz para determinar estas cantidades basándose en los factores como el tamaño del sujeto, la severidad de los síntomas del sujeto y la composición particular o ruta de administración seleccionada.

Una composición de la presente invención se puede administrar vía una o más rutas de administración usando una o más de varios métodos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto el la técnica, la ruta y/o forma de administración puede variar dependiendo de los resultados deseados. Las rutas preferidas de administración para anticuerpos de la invención incluyen intravenosa, intramuscular, intradermal, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras rutas parenterales de administración, por ejemplo por inyección o infusión. La frase "administración pareneral" como se usa en la presente significa modelos de administración diferentes de la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluye, sin limitación inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradermal, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal.

Como alternativa, un anticuerpo de la invención se puede administrar vía una ruta no parenteral, tal como una ruta de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasalemente, oralmente, vaginalmente, rectalmente, sublingualmente o tópicamente.

Los compuestos activos se pueden preparar con portadores que pueden proteger al compuesto contra liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdermales y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles, biodegradables, tal como atinel vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de las formulaciones están patentadas o generalmente conocidas por aquellos expertos en la técnica. Véase por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Se pueden administrar composiciones terapéuticas con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un una realización preferida, se puede administrar una composición terapéutica de la invención con un dispositivo de inyección de agujas hipodérmicas, tal como el dispositivo descrito en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos en la técnica útiles en la presente invención incluyen: Patente de Estados Unidos n.º 4.487.603 la cual describe una bomba de micro-infusión implantable para dispersar medicación a una velocidad controlada; Patente de Estados Unidos n.º 4.486.194, la cual describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; Patente de Estados Unidos n.º 4.447.233, la cual describe una bomba de infusión de medicación para suministrar una medicación a una velocidad de infusión precisa; Patente de Estados Unidos n.º 4.447.224, la cual describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para suministro de fármaco continuo; Patente de Estados Unidos n.º 4.439.196, la cual describe un sistema de suministro de fármaco osmótico que tiene compartimientos de cámaras múltiples; y Patente de Estados Unidos n.º 4.475.196, la cual describe un sistema de suministro del fármaco osmótico. Estas patentes se incorporan en la presente para referencia. Se conocen por aquellos expertos en la técnica muchos otros implantes, sistemas de suministro y módulos.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden formular para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera emato-encefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegura que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la BBB (si desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para métodos para manufacturar liposomas, véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender una o más porciones las cuales selectivamente se transportan en células y órganos específicos, de esta forma de intensifica el suministro de fármaco objetivo (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol*. 29:685). Porciones objetivo ejemplares incluye folato o biotina (véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos 5.416.016 por Low *et al.*); manosidos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother*. 39:180); receptor de proteína A del tensoactivo (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol*. 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem*. 269:9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett*. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Usos y métodos

Los anticuerpos, particularmente los anticuerpos humanos, composiciones de anticuerpo y métodos de la presente divulgación tienen numerosos diagnósticos y utilidades terapéuticas *in vitro* o *in vivo* que involucra el diagnóstico y tratamiento de trastornos mediados por Glipicano-3. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y para diagnosticar varios trastornos. Tal como se usa en el presente documento el término "sujeto" pretende incluir animales humanos y no humano. Animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tal como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios y reptiles. Sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos mediados por actividad de Glipicano-3. Los métodos son particularmente adecuados para tratar pacientes humanos que tienen un trastorno asociado con expresión de Glipicano-3 aberrante. Cuando se administran anticuerpos para Glipicano-3 junto con otro agente, los dos se pueden administrar en cualquier orden o simultáneamente.

Dando el enlace específico de los anticuerpos de la invención para Glipicano-3, los anticuerpos de la invención se pueden usar para específicamente detectar expresión de Glipicano-3 en la superficie de las células, y sin embargo, se pueden usar para purificar Glipicano-3 vía purificación de inmunoafinidad.

Además, dando la expresión de Glipicano-3 en varias células de tumor de hígado, los anticuerpos humanos, composiciones de anticuerpo y métodos de la presente divulgación, se pueden usar para tratar un sujeto con un trastorno tumorigénico del hígado, por ejemplo, un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan Glipicano-3 que incluyen, por ejemplo, células CHC.

En una realización, los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas, y composiciones) de la invención se pueden usar para detectar niveles de Glipicano-3, o niveles de células las cuales contienen Glipicano-3 en su superficie de membrana, los niveles después se pueden unir a ciertos síntomas. Como alternativa, los anticuerpos se pueden usar para inhibir o bloquear la función de Glipicano-3 la cual, a su vez, se puede unir a la prevención o mejora de ciertos síntomas de cierta enfermedad, de este modo se implica a Glipicano-3 como un mediador de la enfermedad. Esto se puede lograr poniendo en contacto una muestra y una muestra control con el anticuerpo anti-Glipicano-3 bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y Glipicano-3. Cualquiera de los complejos formados entre el anticuerpo y Glipicano-3 se detecta y compara en la muestra y el control.

En otra realización, los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas y composiciones) de la invención pueden inicialmente ser probadas para actividad de enlace asociada con uso terapéutico o diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la invención se pueden probar usando los ensayos de citometría de flujo descritos en los Ejemplos posteriores.

Los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas, inmunoconjugados y composiciones) de la invención tienen utilidad adicional en terapia y diagnóstico de enfermedades relacionadas a Glipicano-3. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales humanos, las moléculas multiespecíficas o biespecíficas y los inmunoconjugados se pueden usar para obtener *in vivo* o *in vitro* una o más de las siguientes actividades biológicas: parea inhibir el crecimiento de y/o eliminar una célula que expresa Glipicano-3; para mediar fagocitosis o ADCC de una célula que expresa Glipicano-3 en la presencia de células efectoras humanas, o para bloquear un ligando de Glipicano-3 del enlace a Glipicano-3.

En una realización particular, los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas, y composiciones) se usan *in vivo* para tratar, prevenir o diagnosticar varias enfermedades relacionadas a Glipicano-3. Ejemplos de enfermedades relacionadas a Glipicano-3 incluyen, entre otros, CHC y otros cánceres de hígado.

Rutas adecuadas para administrar las composiciones del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la invención *in vivo* e *in vitro* se conocen bien en la técnica y se pueden seleccionar por aquellos expertos ordinarios. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpo se pueden administrar por inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Dosificaciones adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y peso del sujeto y la concentración y/o formulación de la composición del anticuerpo.

Como previamente se describe, anticuerpos anti-Glipicano-3 humanos de la invención se puden co-administrar con uno o más de los agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente citotóxico, un gente radiotóxico o un agente inmunosupresivo. El anticuerpo se puede enlazar al agente (como un inmunocomplejo) o se puede administrar separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo se puede administrar antes, después o junto con el agente o se puede co-administrar con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anti-cancerígena, por ejemplo, radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes anti-neoplásticos, tal como doxorubicina (adriamicina), cisplatin bleomicin sulfato, carmustina, cloroambicil y ciclofosfamida hidroxiurea los cuales pos si mismos, son únicamente efectivos a niveles los cuales son tóxicos o subtóxicos a un paciente. La cisplatina se administra intravenosamente a una dosis de 100 mg/kg una vez cada cuatro semanas y adramicina se

administra intravenosamente a una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La co-administración de los anticuerpos anti-Glipicano-3, o fragmentos de enlace al antígeno de los mismos, de la presente invención con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anti-cancerígenos los cuales operan vía diferentes mecanismos los cuales proporcionan un efecto citotóxico a células de tumor humanas. La co-administración puede resolver los problemas debido al desarrollo de resistencia a fármacos o cambio en la antigenicidad de las células de tumor las cuales les haría reactivas con el anticuerpo.

Las células efectoras específicas de diana, por ejemplo, células efectoras ligadas a composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención se pueden usar como agentes terapéuticos. Células efectoras para dirección pueden ser leucocitos humanos tal como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, células asesinas naturales y otras células que portan el receptor IgG o IgA. Si se desea, las células efectoras se pueden obtener a partir del sujeto a ser tratado. Las células efectoras específicas de diana se pueden administrar como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas puede estar en el orden de 10^8-10^9 pero variará dependiendo del propósito terapéutico. En general, la cantidad puede ser suficiente para obtener la ubicación en la célula objetivo, por ejemplo, una célula tumoral que expresa Glipicano-3, y no afecta la eliminación celular por, por ejemplo, fagocitosis. Las rutas de administración también pueden variar.

La terapia con células específicas de diana se puede realizar junto con otras técnicas para remover las células diana. Por ejemplo, terapia anti-tumor usando las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención y/o células efectoras armadas con estas composiciones se pueden usar junto con quimioterapia. Adicionalmente, la inmunoterapia de combinación se puede usar para dirigir dos distintas poblaciones efectoras citotóxicas hacia rechazo de célula de tumor. Por ejemplo, anticuerpos anti-Glipicano-3 enlazados a gamma RI anti-Fc o anti-CD3 se pueden usar junto con agentes de enlace específicos al receptor IgG o IgA.

Moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la invención también se pueden usar para modular FcγR o niveles de FcγR en células efectoras, tal como tapando y eliminación de los receptores en la superficie celular. Las mezclas de receptores anti-Fc también se pueden usar para este propósito.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la invención las cuales tienen sitios de enlace al complemento, tal como porciones de IgG1, -2 o -3, o IgM los cuales se unen al complemento, también se pueden usar en la presencia del complemento. En una realización, tratamiento *ex vivo* de una población de células que comprenden células diana con un agente de enlace de la invención y células efectoras apropiadas se puede suplementar por la adición del complemento o suero que contiene el complemento. La fagocitosis de las células diana recubiertas con un agente de enlace de la invención se puede mejorar enlazando las proteínas del complemento. En otra realización, las células diana recubiertas con las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención también se pueden lisar por el complemento. En otra realización más, las composiciones de la invención no activan el complemento.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, moléculas multiespecíficas y biespecpificas e inmunoconjugados) de la invención también se pueden administrar junto con el complemento. En determinadas realizaciones, las moléculas multiespecíficas o biespecíficas y suero o complemento. Estas composiciones pueden ser ventajosas cuando el complemento se localiza en proximidad cercana a los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas. Como alternativa, los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas de la invención y el complemento o suero se pueden a administrar separadamente.

También dentro del alcance de la presente invención están kits que comprenden las composiciones del anticuerpo de la invención (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas, o inmunoconjugados) e instrucciones para uso. El kit puede además contener uno o más reactivos adicionales, tal como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos humanos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria la cual se une a un epítopo en el antígeno Glipicano-3 distinto del primer anticuerpo humano).

Por consiguiente, los pacientes tratados con las composiciones del anticuerpo de la invención pueden ser adicionalmente administrar (antes a, simultáneamente con, o después de la administración de un anticuerpo humano de la invención) con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, el cual intensifica o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos.

En otras realizaciones, el sujeto puede ser adicionalmente tratado con un agente que modula, por ejemplo, intensifica o inhibe, la expresión o actividad de Fcγ o receptores Fcγ por, por ejemplo, tratar al sujeto con una citocina. Citocinas preferidas para administración durante el tratamiento con la molécula multiespecífica incluye el factor que estimula la colonia de granulocito (G-CSF), factor que estimula la colonia macrófaga de granulocito (GM-CSF), interferón γ (IFN-γ) y factor de necrosis tumoral (TNF).
Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención

también se pueden usar a células diana que expresan FcγR o Glipicano-3, por ejemplo para etiquetar las células. Para este uso, el agente de enlace se puede unir a una molécula que se puede detectar. De esta forma, la invención proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vivo*, células que expresan los receptores Fc, tal como FcγR o Glipicano-3. La etiqueta detectable puede ser, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un co-factor de enzima.

En una realización particular, la invención proporciona métodos para detectar la presencia de antígeno Glipicano-3 en una muestra, o medir la cantidad de antígeno Glipicano-3, que comprende poner en contacto la muestra, y una muestra control, con un anticuerpo monoclonal humano, o una porción del mismo enlazado al antígeno, el cual se une específicamente a Glipicano-3, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o porción del mismo y Glipicano-3. La formación de un complejo después se detecta, en donde una diferencia de formación del complejo entre la muestra comparada a la muestra control es indicativo de la presencia de antígeno Glipicano-3 en la muestra.

En otros aspectos, la divulgación proporciona métodos para tratar un trastorno mediado por Glipicano-3 en un sujeto, por ejemplo, CHC u otros cánceres hepáticos.

En aún otra realización, los inmunoconjugados de la invención se pueden usar para compuestos objetivo (por ejemplo, agentes terapéuticos, etiquetas, citotoxinas, radiotoxinas, inmunosupresores, etc.) a células las cuales tienen receptores de superficie de célula Glipicano-3 enlazando los compuestos al anticuerpo. Por ejemplo, se puede conjugar un anticuerpo anti-Glipicano-3 a cualquiera de los compuestos de toxina descritos en las Patentes de Estados Unidos n.º 6.281.354 y 6.548.530, publicaciones de patente de Estados Unidos N.º 20030050331, 20030064984, 20030073852, y 20040087497, o publicado en WO 03/022806. De esta forma, la divulgación también proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vivo* células que expresan Glipicano-3 (por ejemplo, con una etiqueta detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor de enzima). Como alternativa, los inmunoconjugados se pueden usar para matar células las cuales tienen receptores de superficie celular de Glipicano-3 dirigiendo citotoxinas o radiotoxinas al Glipicano-3.

La presente invención además se ilustra mediante los siguientes ejemplos, los cuales no deben interpretarse para limitarla.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de Anticuerpos Monoclonales Humanos Contra Antígeno Glipicano-3

Antígeno

Se crea una proteína de fusión recombinante, Glipicano-3 que comprende el dominio extracelular de la proteína Glipicano-3 enlazada a polipéptido no-Glipicano-3, una marca de histidina. El Glipicano-3-his se genera por métodos recombinantes estándar y se usa como un antígeno para inmunización. Además, las células CHO transfectadas con un constructo de expresión Glipicano-3-Myc y una línea celular, se usan Hep-G2 como antígenos para inmunización.

HuMAb Mouse® y KM Mouse® transgénicos

Se prepararan anticuerpos monoclonales completamente humanos para Glipicano-3 usando una cepa HCo17 del HuMAb Mouse® y la cepa KM de ratones transcromosómicos transgénicos, cada uno de los cuales expresa genes de anticuerpo humano. La cepa HCo17 se construye como se describe en el documento WO/2005/058815. La cepa KM se construye como se describe en el documento WO 02/43478.

Inmunizaciones de HuMab Mouse y KM Mouse

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para Glipicano-3, se inmunizan ratones del HuMAb Mouse® y KM Mouse® con proteínas Glipicano-3-his expresada en células CHO, células CHO que expresan la proteína Glipicano-3-Myc y células Hep-G2. Se describen esquema de inmunización general para el HuMAb Mouse® en Lonberg, N. *et al* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 y Publicación PCT WO 98/24884. Los ratones tenían de 6-16 semanas de edad en la primera infusión del antígeno. Una preparación recombinante purificada (5-25 µg) de proteína de fusión Glipicano-3 o Células de expresión de Glipicano-3 ($1x10^7$ células) se usaron para inmunizar cada HuMab mouse® y KM mouse®.

Ratones transgénicos se inmunizaron con antígeno en adyuvante completo Freund o adyuvante Ribi, ya sea intraperitonealmente (IP), subcutáneamente (Sc) o vía la planta del pie (FP), seguido por 3-21 días de inmunización IP, Sc o FP (hasta un total de 12 inmunizaciones), con el adyuvante Ribi o Freund incompleto. La respuesta inmune se monitoreó por sangrados retroorbitales. El plasma se seleccionó por ELISA (como se describe abajo), y FACS, y los ratones con suficientes tituladores de inmunoglobulina humana anti-Glipicano-3, se usaron para infusiones. Los ratones se reforzaron intravenosamente con antígeno, 3 y 2 días antes del sacrificio y remoción del vaso. Como es típico, se realizaron entre diez y 35 fusiones para cada una de las fusiones. Se inmunizaron varias docenas de

ratones para cada antígeno.

Selección de HuMab Mouse® o KM Mouse® productor de Anticuerpos Anti-Glipicano-3

Para seleccionar un HuMab Mouse® o un KM Mouse® que produce anticuerpos que se unen a Glipicano-3, suero de ratones inmunizados se probaron por ELISA como se describe por Fishwild, D. et al. (1996)(supra). Brevemente, las placas microtituladoras se revistieron con Glipicano-3 recombinante purificado a 1-2 µg /ml en PBS, 50 µl/cavidad incubada a 4°C durante la noche, después se bloqueó con 200 µl/cavidad de suero de pollo al 5 % en PBS/Tween (0,05 %). Las diluciones de plasma a partir de ratones Glipicano-3 inmunizados, se agregaron a cada cavidad y se incubaron por 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y después se incubaron con un anticuerpo policlonal Fc IgG anti-humano de cabra, conjutado con peroxidasa de rábano picante (HRP) por 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas se desarrollaron con sustrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) y se analizaron por espectrofotómetro a OD 415-495.

Los sueros de ratones inmunizados entonces se seleccionaron adicionalmente por citometría de flujo por enlace a una línea celular que expresa Glipicano-3 humano recombinante, pero no en una línea de células de control que no expresa Glipicano-3. Brevemente, el enlace de anticuerpos anti-Glipicano-3 se valoró incubando células CHO que expresan Glipicano-3 con el anticuerpo anti-Glipicano-3 a una dilución de 1:20. Las células se lavaron y el enlace se detectó con un Ab IgG anti-humano etiquetado con FITC. Los análisis citométricos de flujo se realizaron usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los ratones que desarrollaron los tituladores más altos de anticuerpos anti-Glipicano-3, se usaron por fusiones. Las fusiones se realizaron como se describe abajo, y se probaron los sobrenadantes de hibridoma para determinar la actividad anti-Glipicano-3 por ELISA y FACS.

Generación de Hibridomas productores de Anticuerpos Monoclonales a Glipicano-3:

Los esplenocitos de ratón, aislados de un HuMab mouse® o un KM mouse®, se fusionaron usando electrofusión a base de campo eléctrico, usando un electroporador de fusión de desecho de cámara grande de Pulso Cyto, (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Los hibridomas resultantes entonces se seleccionaron para la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Las suspensiones celulares únicas de linfocitos esplénicos a partir de ratones inmunizados, se fusionaron con células de mieloma de ratón no secretante SP2/0 (ATCC, CRL 1581), usando electrofusión a base de campo eléctrico usando un electroporación de desecho de cámara grande de Pulso Cyto (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Las células se plaquearon a aproximadamente $1x10^4$ células/cavidad en placas microtituladoras de fondo plano, seguidas por aproximadamente dos semanas de incubación en medio selectivo que contiene suero bovino fetal al 10 %, 10 % de medio acondicionado P388D1 (ATCC, CRL TIB-63), 3-5 % de origen (IGEN) en DMEM (Mediatech, CRL 10013, con alta glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio), mas 5 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 mg/ml de gentamicina y 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Después de 1-2 semanas, las células se cultivaron en medio, en el cual el HAT se reemplazó con HT. Las cavidades individuales entonces se seleccionaron por ELISA y FACS (descrito anteriormente), para anticuerpos IgG monoclonales anti-Glipicano-3 humanos. Una vez que ha ocurrido el crecimiento extensivo de hibridoma, el medio se monitorea usualmente después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpo se replaquearon, seleccionaron nuevamente y, si todavía son positivos para anticuerpos monoclonales anti-Glipicano-3, IgG humanos, se subclonaron al menos, dos veces por dilución limitante. Los subclones estables entonces se cultivaron *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejido para caracterización adicional.

Los clones de hibridoma 4A6, 11E7, y 16D10, generados a partir de un HuMAb Mouse®, se seleccionaron para análisis adicional.

Ejemplo 2: Caracterización Estructural de los Anticuerpos Monoclonales Humanos 4A6, 11E7, y 16D10

Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7, y 16D10, se obtuvieron a partir de los hibridomas 4A6, 11E7, y 16D10, respectivamente, usando técnicas de PCR estándares y se secuenciaron usando técnicas de secuenciamiento de ADN estándar.

Las secuencias de aminoácido y nucleótido de la región variable de cadena pesada de 4A6, se muestran en la Figura 1A y en la SEQ ID Nº:25 y 19, respectivamente.

Las secuencias de aminoácido y nucleótido de la refión variable de cadena ligera de 4A6, se muestran en la Figura 1B y en la SEC ID Nº: 28 y 22, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 4A6 a las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocida, demuestra que la cadena pesada 4A6 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 5-51 y un segmento J_H a partir de la línea germinal humana JH4b. El alineamiento de la secuencia de V_H 4A6 a la secuencia V_H 5-51 de línea germinal, se muestra en la Figura 4. Análisis adicional de la secuencia V_H de 4A6 usando el sistema Kabat de la determinación de región CDR, conduce a el delineamiento de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 1A y 4, y en las SEC ID Nº: 1, 4 y 7, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 4A6 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocida, demostraron que la cadena ligera 4A6 utiliza un segmento V_L de una línea germinal humana V_K A27 y un segmento J_K de la línea germinal humana JK4. El alineamiento de la secuencia V_L 4A6 con la secuencia V_K A27 de línea germinal, se muestra en la Figura 7. El análisis adicional de la secuencia V_L 4A6 usando el sistema Kabat de la determinación de región CDR, condujo al delineamiento de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, como se muestra en las Figuras 1B y 7, y en las SEC ID Nº: 10, 13, y 16, respectivamente.

Las secuencias de aminoácido y nucleótido de la región variable de cadena pesada de 11E7, se muestran en la Figura 2A y en las SEC ID Nº: 26 y 20, respectivamente.

Las secuencias de aminoácido y nucleótido de la región variable de cadena ligera de 11E7, se muestran en la Figura 2B y en SEC ID Nº: 29 y 23, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 11E7 a las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas, demuestran que la cadena pesada 11E7 utiliza un segmento V_H a partir del V_H 5-51 de línea germinal humana y un segmento J_H a partir de una línea germinal humana JH4b. El alineamiento de la secuencia V_H de 11E7 a la secuencia V_H 5-51 de línea germinal humana, se muestra en la Figura 5. Análisis adicional de la secuencia 11E7 usando un sistema Kabat de la determinación de región CDR, conduce al delineamiento de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, como se muestra en las Figuras 2A y 5, y en las SEC ID Nº: 2, 5, y 8, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 11E7 a las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas, demuestra que la cadena ligera 11E7 utiliza un segmento V_L a partir del segmento V_K A27 y J_K de línea germinal humana a partir de JK4 de línea germinal humana. El alineamiento de la secuencia V_L de 11E7 a la secuencia V_K A27 de línea germinal, se muestra en la Figura 8. Análisis adicional de la secuencia V_L 11E7 usando el sistema Kabat de la determinación de región CDR, conduce al delineamiento de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 2B y 8, y en las SEC ID Nº: 11, 14, y 17, respectivamente.

Las secuencias de aminoácido y nucleótido de la región variable de cadena pesada de 16D10, se muestran en la Figura 3A y en las SEC ID Nº: 27 y 21, respectivamente.

Las secuencias de aminoácido y nucleótido de la región variable de cadena ligera de 16D10, se muestran en la Figura 3B y en las SEC ID Nº: 30 y 24, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 16D10 a las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas, demuestra que la cadena pesada 16D10 utiliza un segmento V_H a partir de un segmento J_H y V_H 5-51 de línea germinal humana a partir de la línea germinal humana JH4b. El alineamiento de la secuencia V_H 16D10 a la secuencia de línea germinal V_H 5-51, se muestra en la Figura 6. Análisis adicional de la secuencia V_H 16D10 usando el sistema Kabat de determinación de región CDR, conduce al delineamiento de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, como se muestra en las Figuras 3A y 6, y en las SEC ID Nº: 3, 6, y 9, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 16D10 a las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas, demuestra que la cadena ligera 16D10, utiliza un segmento V_L del segmento J_K y V_K A27 de línea germinal humana a partir de la línea germinal humana JK1. El alineamiento de la secuencia V_L 16D10 a la secuencia V_K A27 de línea germinal, se muestra en la Figura 9. Análisis adicional de la secuencia V_L de 16D10 usando el sistema Kabat de determinación de región CDR, conduce al delineamiento de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, como se muestra en las Figuras 3B y 9, y en las SEC ID Nº: 12, 15, y 18, respectivamente.

Ejemplo 3: Caracterización de Especificidad de unión y Cinética de Enlace de Anticuerpos Monoclonales Humanos Anti-Glipicano-3

En este ejemplo, la afinidad de enlace, cinética y especificidad de anticuerpos anti-Glipicano-3, se examinaron por análisis Biacore y citometría de flujo.

Afinidad y Cinética de unión

Los anticuerpos anti-Glipicano-3 se caracterizaron para determinar cinéticas y afinidades de enlace por análisis Biacor (Biacore AB, Uppsala, Sweden). El Glipicano-3 se enlazó covalentemente a un chip CM5 (chip revestido de carboximetil dextrano), vía aminas primarias, usando química de acoplamiento de amina estándar y kit proporcionado por Biacore. El enlace se midió fluyendo una serie de concentraciones de los anticuerpos monoclonales anti-Glipicano-3 en amortiguador HBS-EP (proporcionado por Biacore AB) a 20, 10, 5, 2,5 y 1,25

µg/ml a una velocidad de flujo de 40 µL/min. El enlace antecedente se contó fluyendo a series de concentración de IgG1 a través del mismo chip. Las cinéticas de asociación de antígeno-anticuerpo, se siguieron por 3 minutos y las cinéticas de disociación se siguieron por 10 minutos. Las curvas de asociación y disociación se ajustaron a un modelo de enlace Langmuir 1: usando software BIAevaluation (Biacore AB). Los valores K_D, k_{asoc} y k_{disoc}, que se determinaron, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Datos de unión de Biacore para anticuerpos monoclonales anti-Glipicano-3

Anticuerpo anti-Glipicano-3	K_D de afinidad x 10^{-9} (M)	Constante de asoc. K_{asoc} x 10^6 (1/ms)	Constante de disoc. K_{disoc} x 10^{-4} 1/s
4A6	0,20	1,6	3,2
16D10	0,31	1,8	5,4
11E7	0,40	1,8	7,3

Afinidad de unión medida por FACS

Los anticuerpos anti-Glipicano-3, se mostraron por unirse a las proteínas de Glipicano-3 de la superficie celular, con una alta afinidad usando un ensayo clasificador celular activado por fluorescencia ("FACS"). Se agregó la línea celular CHC Hep-3B a una densidad de 2 x 105 células en cada cavidad de placa de 96 pocillos. Los anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7, y 16D10, se agregaron a una concentración de partida de 20µg/ml y se diluyó serialmente el anticuerpo a una dilución 1:3. Las células se lavaron y se detectó el enlace con un Ab IgG anti-humano etiquetado con FITC. Los análisis citométricos de flujo se realizaron usando citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA). Las afinidades de enlace resultantes, trazadas como la intensidad de fluorescencia media ("MFI"), se muestran en la Figura 10. Las afinidades de enlace de los anticuerpos se unen a las células CHC en una manera dependiente de la concentración. La concentración efectiva ("EC50") para cada anticuerpo, se determinó como la concentración que resulta en una intensidad de fluorescencia media al 50 % ("MFI"). En este ejemplo, se observó la afinidad de enlace más fuerte con el anticuerpo 4A6, el cual mostró un MFI de 0,83. La siguiente mejor afinidad observada fue para 16D10, el cual tiene un EC50 de 1,39. La afinidad observada más baja de los tres anticuerpos, fue para 11E7, la cual tiene un EC50 de 1,98.

Especificidad de unión medida por FACS

Los anticuerpos anti-Glipicano-3, se mostraron por unirse a proteínas Glipicano-3 de la superficie celular, con una alta especificidad usando un ensayo FACS. Las líneas de células CHC Hep-3B y Hep-G2, se hicieron crecer en DMEM + 10 % de FBS, a una densidad de 1 x 10^5 células. Los anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7 y 16D10, se agregaron a una concentración de 10 µg/ml. Adicionalmente, se analizaron tres controles negativos por comparación. Estos controles negativos fueron (1) no todos teñidos, (2) el anticuerpo secundario agregado solo, y (3) un anticuerpo de control de isotipo $hIgG_1$. Las células se lavaron y se detectó enlace con un Ab IgG anti-humano etiquetado con FITC. Se realizaron análisis citométricos de flujo usando un citómetro de flujo FACSCalibur. La Figura 11 muestra que los anticuerpos anti-Glipicano-3 unidos a las células CHC con una alta afinidad. Por el contrario, las muestras de control negativo no mostraron algún enlace a las células CHC.

Líneas de células de ovario de Hámster chino (CHO), que expresan establemente Glipicano-3 en la superficie celular, se desarrollaron y usaron para determinar la especificidad de los anticuerpos monoclonales Glipicano-3 por citometría de flujo. Las células CHO se transfectaron con plásmidos de expresión que contienen ADNc de longitud completa que codifican a Glipicano-3. El enlace de los tres anticuerpos monoclonales anti-Glipicano-3, se valoró incubando las células transfectadas con cada uno de los anticuerpos Glipicano-3 a una concentración de 10 µg/ml. Las células se lavaron y se detectó el enlace con un Ab IgG anti-humano etiquetado con picoeritrina (BD Biosciences). El anticuerpo secundario solo, se usó como un control negativo. Los resultados se representan en la Figura 12. Los anticuerpos monoclonales de Glipicano-3, 4A6, 11E7, y 16D10, unidos a la línea de células CHO transfectados con Glipicano-3 pero no con las líneas de células CHO progenitores. Estos daos demuestran que la especificidad de los anticuerpos monoclonales para Glipicano-3.

Agrupamiento de epítopos de anticuerpos monoclonales anti-Glipicano-3 por Biacore

Se realizó agrupamiento de epítopo por análisis Biacore, para determinar si los anticuerpos anti-Glipicano-3 se enlazan a epítopos traslapantes. Los anticuerpos que tienen epítopos traslapantes, competirán para enlace a Glipicano-3, mientras aquellos con distintos epítopos no competirán y simultáneamente se enlazarán al antígeno. Los 4A6 y 16D10 purificados, se inmovilizaron a 4000 RU en un chip CM5 usando un protocolo de acoplamiento estándar. El Glipicano-3-his (50 nM), se pre-incubó por al menos 1 hora con los anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7, o 16D10, previo a la inyección. Las concentraciones de anticuerpo fueron en una serie de dilución en dos partes partiendo a 400 nM. Las mezclas de anticuerpo-antígeno se inyectaron a una velocidad de flujo de 5 µl/min por 5 minutos. Cada uno de los anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7 y 16D10, fuera capaz de competir para enlace a los anticuerpos 4A6 y 16D10 inmovilizados en una manera dependiente de la concentración. Esto muestra que 4A6, 16D10, y 11E7, tienen epítopos trasplantes.

Ejemplo 4: Los anticuerpos Glipicano-3 se unen a tejido canceroso hepático

El anticuerpo monoclonal anti-Glipicano-3 4A6, se mostró por unirse a tejidos cancerosos hepáticos humanos. Se obtuvieron biopsias de pacientes con cáncer hepático y los anticuerpos se usaron para teñido por inmunohistoquímica (Cytomyx, MA). Se usaron núcleos de tejidos de 5 µm. Después del secado por 30 minutos en los portaobjetos, las secciones de tejido se fijaron con acetona a temperatura ambiente por 5 minutos. Los portaobjetos se enjuagaron en PBS y después se bloquearon con proteína libre de suero y bloqueador de peroxidasa (Dako S2001, CO) y subsecuentemente se incubaron con complejo de anticuerpo primario a 5 µg/ml por 45 minutos a temperatura ambiente. Después, los portaobjetos se lavaron e incubaron por 30 minutos con anticuerpo secundario conjugado con FITC (Jackson Immunoresearch Lab, 109-097-003) y se lavaron nuevamente con PBS e incubaron con conjugados HRP de polímero (Dako, CO, K4063) por 20 minutos. Se usó cromógeno (Dako K3464) como un sustrato, resultando en teñido marrón. Los portaobjetos se montaron en un Medio de Montaje Acuoso Faramount (Dako, S3025). El 4A6 se mostró por unirse específicamente a células de tumor hepático. Como se ejemplifica en la Figura 13, el anticuerpo monoclonal específicamente tiñe tejido hepático canceroso pero no el tejido normal circundante. Cuando se tiñe con los anticuerpos monoclonales, otros órganos exhiben teñido no específico o negativo, los cuales incluyen útero, pulmón, hígado, riñón, colon, cuello de útero, mama, médula ósea, glándulas suprarrenales, cerebelo, cerebro, esófago, corazón, próstata, placenta, pituitaria, ovario, páncreas, mesotelio, glándulas salivales, amígdalas, piel, intestino delgado, músculo esquelético, estómago, vaso, testículos, timo y tiroides. Los datos demuestran que 4A6 HuMab anti-Gpc3, reconocen Gpc3 expresadas en tumores hepáticos.

Ejemplo 5: Actividad de los anticuerpos anti-Glipicano-3

Se demostró que los anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7 y 16D10 eliminan a las células Hep-G2 positivas para Gcp3 en presencia células T citolíticas naturales usando un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo ("ADCC").

Se prepararon células efectoras humanas a partir de sangre completa como sigue. Células mononucleares de sangre periférica humana, se purificaron a partir de sangre completa heparinizada por separación de paca Ficoll estándar. Las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 que contiene 10 % de FBS 200U/ml de IL-2 humano (PeproTech, NJ), y se incubaron durante la noche a 37 ºC. Al siguiente día, las células se recolectaron y se lavaron dos veces en RPMI + 1 % de BSA (medio de ensayo) y se resuspendieron a 1x10e6/ml.

100 µl de células diana a 1x10e4/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano, se incubaron en medio de ensayo durante la noche a 37 ºC. Después que las células diana se lavaron dos veces en medio de ensayo, 100 µl del medio de ensayo se agregaron en cada cavidad y se incubó por 50 µl de las células efectoras y 50 µl de ya sea anticuerpos anti-Gpc3 o IgG1 humano como control de isotipo a una concentración final de 10 µg/ml. La línea de células Hep-G2 de Gpc3, se probó por especificidad de anticuerpo ADCC a anticuerpos anti-Gpc3 usando el kit de detección de citotoxicidad Takara LDH (Roche, 04744 926001, Suiza), un análisis de emisión de fluorescencia como sigue. La línea de células objetiva, Hep-G2, se incubó con células efectoras a una relación de objetivo a efector de 1:50. Después de una incubación de 18 horas a 37 ºC, se recolectaron 100 µl de los sobrenadantes y se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos de fondo plano. Se agregaron 100 µl de Solución C a cada cavidad y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. La absorbancia de las muestras a 490 nM, se midió por SPECTRAMAX 340 PC (MTX Lab System, VA). El % de lisis se determinó calculando la absorbancia promedio de los triplicados, y sustrayendo el antecedente.

Como se puede ver en la Figura 14, los anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7 y 16D10, cada uno causa lisis específica de las células Hep-3b por células T asesinas naturales, comparadas con el anticuerpo de control de isotipo hIgG1.

Ejemplo 6: Internalización de Anticuerpo Anti-Glipicano-3

Los anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7, y 16D10, se mostraron por ser internalizados por células Hep-3b después del enlace a las células usando un ensayo Hum-Zap. El ensayo Hum-ZAP, mostró la internalización de los anticuerpos monoclonales anti-Glipicano-3 a través del enlace de un anticuerpo secundario IgG anti-humano, conjugado a la saporina toxina. (Advanced Targeting System, San Diego, CA, IT-22-100). Primero, 4A6, 11E7, y 16D10 se unieron a la superficie de las células Hep-3B. Después, los anticuerpos Hum-ZAP se unieron a los anticuerpos primarios. Después, el complejo primario anticuerpo/Hum-ZAP se internalizó por las células. La entrada de Saporina en las células resultó en la inhibición de síntesis de proteína y eventual muerte celular.

El ensayo Hum-ZAP se condujo como sigue. Cada una de las células se sembró a una densidad de $3x10^3$ células por cavidad. Los anticuerpos monoclonales anti-Glipicano-3 o un IgG humano de control de isotipo, se diluyeron serialmente, después se agregaron a las células. El Hum-ZAP entonces se agregó a una concentración de 2 µg/ml y las placas se dejaron incubar por 96 horas. La viabilidad celular en las placas se detectó por kit de Ensayo de Viabilidad de Célula Luminiscente CellTiter-Glo® (Promega, G7571) y las placas se leyeron a 490nM por un Luminomitor (Tuner BioSystems, Sunnyvale, CA). Los datos se analizaron por Prism (Graphpad). Como se puede ver en la Figura 15, la muerte celular fue proporcional a la concentración de anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7, y

16D10. De este modo, los anticuerpos monoclonales anti-Glipicano-3 se internalizaron eficientemente por células Hep-3b, comparado con el anticuerpo de control de isotipo hIgG1.

Los anticuerpos monoclonales 4A6, 11E7, y 16D10, también se mostraron por ser internalizados por células Hep-3b, usando un ensayo de teñido por inmunohistoquímica. Las células, recolectadas con la solución de disociación celular, se sembraron a 104 células por 100ul de medio en cada cavidad de una placa de 96 pocillos y se incubó con cada anticuerpo monoclonal a una concentración de 5µg/ml en amortiguador FACS (PBS + 5 % FBS) por 30 minutos en hielo. Se usó un control de isotipo IgG1 humano, como un control negativo. Las células se lavaron dos veces, se resuspendieron en medio (100ul por cavidad), y después se incubaron en anticuerpo secundario anti-humano de cabra conjugado con ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch Lab, PA) a una dilución 1:100 por 30 minutos. Las células entonces se lavaron con el medio y ya sea inmediatamente se formaron en imagen bajo un microscopio de fluorescencia o se incubaron a 37° C para formación de imagen a puntos de tiempo posteriores. Las imágenes de morfología celular e intensidad de inmunofluorescencia de las células teñidas, se tomaron con una cámara Nikon TE200 camera a 0, 30 o 60 minutos como se indica en la Figura 16. La fluorescencia fue solamente observad en las células teñidas con los anticuerpos 4A6, 11E7, y 16D10. No se detectó fluorescencia con el anticuerpo de control IgG1.

Como se puede ver en la Figura 16, a 0 minutos después de la adición de los anticuerpos, las células se tiñeron en la superficie celular. Después de 30 minutos, las células han comenzado a internalizar los anticuerpos. Después de 60 minutos, los anticuerpos han sido casi completamente internalizados por las células. Esto muestra que los anticuerpos monoclonales anti-Glipicano-3 humanos, son específicamente internalizados después del enlace a células CHC que expresan Glipicano-3.

Ejemplo 7: Estabilidad del anticuerpo anti-Glipicano-3

Estabilidad Térmica

Se determinó la estabilidad térmica de los anticuerpos monoclonales anti-Glipicano-3, por análisis calorimétrico de las temperaturas de fusión para los anticuerpos 4A6, 11E7, y 16D10. Las mediciones calorimétricas de temperaturas de fusión (T_m), se realizaron en una plataforma microcalorimétrica de exploración diferencial DSC VP-Capilar, que se combinó con un automuestreador (MicroCal LLC, Northampton, MA, USA). El volumen de célula de muestra fue 0,144 mL. Los datos de desnaturalización sobre los anticuerpos, se obtuvieron calentando las muestras, a una concentración de 2,3 µM, desde 30 hasta 95 ºC a una velocidad de 1 ºC/min en salina amortiguada con fosfato (PBS) a pH 7,4. Se usó el mismo amortiguador en la célula de referencia para obtener la capacidad de calor molar por comparación. Los termogramas observados fueron corregidos de la línea base y los datos normalizados se analizaron basados en un modelo sin 2- estados, usando el software Origin v7.0. Como se muestra en la Tabla 2, el 16D10 se observó por tener el grado más alto de estabilidad térmica de los tres anticuerpos monoclonales anti-Glipicano-3.

Tabla 2: Calorimetría de exploración diferencial:

Anti-Glipicano-3	T_m1 (ºC)	T_m2 (ºC)	T_m3 (ºC)
16D10	72,1	74,3	83,5
4A6	70,7	80,9	83,1
11E7	70,6	82,6	84,9

Estabilidad Química medida por espectroscopio de fluorescencia

Se comparó la estabilidad de 4A6, 11E7, y 16D10, midiendo el punto medio de desnaturalización química por espectroscopio de fluorescencia. Las mediciones de fluorescencia de desnaturación química se realizaron en un SPEX Fluorolog 3,22, equipado con un lector de placa Micromax (SPEX, Edison, NJ). Las mediciones se realizaron en las muestras de anticuerpo que han sido equilibradas por 20 horas en 16 diferentes concentraciones de clorhidrato de guanidinio en amortiguador de PBS. Las mediciones se hicieron en placas de 384 cavidades de superficie no enlazante, de bajo volumen, negras (Corning, Acton, MA) y requieren 1 µM de anticuerpo en un volumen de cavidad de 12 µL. La fluorescencia se excitó a 280 nm y los espectros de emisión se midieron entre 320 y 400nm. La velocidad de exploración fue 1 segundo por nm y los deslizamientos se ajustaron a un paso de banda de 5nm. Se realizó un blanco amortiguador usando PBS y se sustrajo automáticamente a partir de los datos. Los datos se ajustaron a un modelo de desnaturalización de dos estados usando software GraphPad Prism software. Como se muestra en la Tabla 3, se observó que 16D10 y 4A6, tienen estabilidades similares, pero el 11E7 mostró despliegue bifásico.

Tabla 3: Desnaturalización química determinada por espectroscopio de fluorescencia

Clon	Punto medio dedespliegue (M)
4A6	2,84
16D10	2,74
11E7	bifásico

La discusión de las referencias aquí, se pretende para resumir meramente las afirmaciones hechas por sus autores, no se hace admisión de que cualquier referencia constituye la técnica anterior y los Solicitantes reservan el derecho a cambiar la exactitud y pertinencia de las referencias citadas.

Aunque la invención mencionada anteriormente ha sido descrita en algún detalle por medio de ilustración y ejemplos, para propósitos de claridad de entendimiento, será fácilmente aparente para aquellos de habilidad ordinaria en la técnica en vista de las enseñanzas de esta invención, que ciertos cambios y modificaciones pueden hacerse a esta, sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones dependientes.

Tabla 4: Sumario de listado de secuencias

SEC ID NO:	SECUENCIA	SEC ID NO:	SECUENCIA
1	CDR1 de VH a.a. 4A6	25	VH n.t. 4A6
2	CDR1 de VH a.a. 11E7	26	VH n.t. 11E7
3	CDR1 de VH a.a. 16D10	27	VH n.t. 16D10
4	CDR2 de VH a.a. 4A6	28	VK n.t. 4A6
5	CDR2 de VH a.a. 11E7	29	VK n.t. 11E7
6	CDR2 de VH a.a. 16D10	30	VK n.t. 16D10
7	CDR3 de VH a.a. 4A6	31	línea germinal VH 5-51 a.a.
8	CDR3 de VH a.a. 11E7	32	línea germinal JH JH4b a.a.
9	CDR3 de VH a.a. 16D10	33	línea germinal VK A27 a.a.
10	CDR1 de VK a.a. 4A6	34	línea germinal JK JK4 a.a.
11	CDR1 de VK a.a. 11E7	35	línea germinal JK JK1 a.a
12	CDR1 de VK a.a. 16D10	36	Glipicano-3 a.a.
13	CDR2 de VK a.a. 4A6		
14	CDR2 de VK a.a. 11E7		
15	CDR2 de VK a.a. 16D10		
16	CDR3 de VK a.a. 4A6		
17	CDR3 de VK a.a. 11E7		
18	CDR3 de VK a.a. 16D10		
19	VH a.a. 4A6		
20	VH a.a. 11E7		
21	VH a.a. 16D10		
22	VK a.a. 4A6		
23	VK a.a. 11E7		
24	VK a.a. 16D10		

Listado de secuencias

<110> Medarex Inc.

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA GLIPICANO-3

<130> P34550EP-PCT

<140> EP08796249.4
<141> 17-07-2008

<150> US 60/959845
<151> 17-07-2007

<160> 48

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Ser Tyr Trp Ile Ala
1 5

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Asn Tyr Trp Ile Ala
1 5

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Asn Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Ile Ile Phe Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 17
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Thr Arg Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Thr Arg Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Thr Arg Glu Gly Phe Phe Asp Tyr
1 5

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Arg Ala Val Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 12
<211> 12

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 13

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Thr
1 5

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Thr
1 5

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Thr
1 5

<210> 19
<211> 117
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Phe Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Arg Ser Ile Arg Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Arg Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 117
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Arg Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Arg Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 117
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Asp Val Thr Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Met Arg Gln Met Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Arg Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Arg Glu Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 22
<211> 107
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Val Gln Ser Val Ser Ser Ser
            20                  25                  30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65                  70                  75                  80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 23
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 23

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
            20                  25                  30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45
```

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 24
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 24

Glu Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 25
<211> 351
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

gaggtgcagc tggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60

tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcgcctgggt gcgccagatg 120

cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctttcctg gtgactctga taccagatac 180

agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca ggtccatcag aaccgcctac 240

ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccttgt attactgtgc gagaacccgg 300

gaggggtact ttgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc a 351

<210> 26
<211> 351
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

gaggtgcagc tggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60

tcctgtaagg gttctggata cagctttacc aactactgga tcgcctgggt gcgccagatg 120

cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180

agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag aaccgcctac 240

ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagaacccgg 300

gaggggtact ttgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc a 351

<210> 27
<211> 351
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

gaggtgcaac tggtgcagtc tggagcagat gtgacaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60

tcctgtaagg tttctggata caggtttacc aactactgga tcggctggat gcgccagatg 120

tccgggaaag gcctggaatg gatgggcatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180

agtccgtcct tccaaggcca cgtcaccatc tcagccgaca aatccatcaa caccgcctac 240

ctacggtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccattt attactgtgc gcgaacccgg 300

gaggggttct ttgactactg gggccaggga accccggtca ccgtctcctc a 351

<210> 28
<211> 321
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccgttca gagtgttagc agcagctatt tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacccac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 29
<211> 321
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacccac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 30
<211> 321
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 30

gaaattctgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 31
<211> 98
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 31

```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1               5                  10                  15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg
```

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 32

```
Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1               5                  10                  15
```

<210> 33
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 33

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
            20                  25                  30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45
```

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 34

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 35

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 36
<211> 580
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 36

Met Ala Gly Thr Val Arg Thr Ala Cys Leu Val Val Ala Met Leu Leu
1 5 10 15

Ser Leu Asp Phe Pro Gly Gln Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp
20 25 30

Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly
35 40 45

Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val
50 55 60

```
Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys
65                  70                  75                  80

Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala
                85                  90                  95

Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln
            100                 105                 110

Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala
        115                 120                 125

Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe
    130                 135                 140

Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp
145                 150                 155                 160

Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro
                165                 170                 175

Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu
            180                 185                 190

Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe
        195                 200                 205

Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln
    210                 215                 220

Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile
225                 230                 235                 240

Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu
                245                 250                 255

Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys
            260                 265                 270

Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly
        275                 280                 285
```

```
Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu
    290                 295                 300

Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu
305                 310                 315                 320

Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys
                325                 330                 335

Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser
            340                 345                 350

Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile
        355                 360                 365

Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala His Val Glu His Glu Glu Thr Leu
    370                 375                 380

Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser
385                 390                 395                 400

Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala
                405                 410                 415

Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr
            420                 425                 430

Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His
        435                 440                 445

Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp
    450                 455                 460

Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys
465                 470                 475                 480

Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly
                485                 490                 495

Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu Cys Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly
            500                 505                 510
```

Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr
515 520 525

Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro
530 535 540

Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser
545 550 555 560

Pro Leu Lys Leu Leu Thr Ser Met Ala Ile Ser Val Val Cys Phe Phe
565 570 575

Phe Leu Val His
580

<210> 37
<211> 408
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 37

atggggtcaa ccgccatcct cgccctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag 60

gtgcagctgg tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc 120

tgtaagggtt ctggatacag ctttaccagc tactggatcg cctgggtgcg ccagatgccc 180

gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatc tttcctggtg actctgatac cagatacagc 240

ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaggt ccatcagaac cgcctacctg 300

cagtggagca gcctgaaggc ctcggacacc gccttgtatt actgtgcgag aacccgggag 360

gggtactttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctca 408

<210> 38
<211> 136
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 38

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
1 5 10 15

Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe

35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Ile Ile Phe Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
65 70 75 80

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Arg Ser Ile Arg
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Leu
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Arg Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 39
<211> 381
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 39

atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120

ctctcctgca gggccgttca gagtgttagc agcagctatt tagcctggta ccagcagaaa 180

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacccac tttcggcgga 360

gggaccaagg tggagatcaa a 381

<210> 40
<211> 127
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 40

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

```
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
            20                  25                  30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Val Gln Ser
        35                  40                  45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
    50                  55                  60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
                85                  90                  95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
            100                 105                 110

Gly Ser Ser Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
        115                 120                 125
```

<210> 41
<211> 408
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 41

```
atggggtcaa ccgccatcct cgccctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag      60

gtgcagctgg tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc     120

tgtaagggtt ctggatacag ctttaccaac tactggatcg cctgggtgcg ccagatgccc     180

gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatc tatcctggtg actctgatac cagatacagc     240

ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaagt ccatcagaac cgcctacctg     300

cagtggagca gcctgaaggc ctcggacacc gccatgtatt actgtgcgag aacccgggag     360

gggtactttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctca                  408
```

<210> 42
<211> 136
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 42

```
Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
1               5                  10                  15

Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
            20                  25                  30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
        35                  40                  45

Thr Asn Tyr Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
65                  70                  75                  80

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Arg
                85                  90                  95

Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Arg Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
        115                 120                 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    130                 135
```

<210> 43
<211> 381
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 43

```
atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga   60

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc  120

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa  180

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca  240

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag  300

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacccac tttcggcgga  360

gggaccaagg tggagatcaa a                                             381
```

<210> 44
<211> 127
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 44

```
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1               5                  10                  15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
            20                  25                  30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
    50                  55                  60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
                85                  90                  95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
            100                 105                 110

Gly Ser Ser Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
        115                 120                 125
```

<210> 45
<211> 408
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 45

```
atggggtcaa ccgccatcct cgccctcctc ctggctattc tccgaggagt ctgtgccgag      60

gtgcaactgg tgcagtctgg agcagatgtg acaaagcccg gggagtctct gaagatctcc     120

tgtaaggttt ctggatacag gtttaccaac tactggatcg gctggatgcg ccagatgtcc     180

gggaaaggcc tggaatggat gggcatcatc tatcctggtg actctgatac cagatacagt     240

ccgtccttcc aaggccacgt caccatctca gccgacaaat ccatcaacac cgcctaccta     300

cggtggagca gcctgaaggc ctcggacacc gccatttatt actgtgcgcg aacccgggag     360

gggttctttg actactgggg ccagggaacc ccggtcaccg tctcctca                  408
```

<210> 46
<211> 136
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 46

```
Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ile Leu Arg Gly
1               5                  10                  15

Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Asp Val Thr Lys
            20                  25                  30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Arg Phe
        35                  40                  45

Thr Asn Tyr Trp Ile Gly Trp Met Arg Gln Met Ser Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
65                  70                  75                  80

Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn
                85                  90                  95

Thr Ala Tyr Leu Arg Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Arg Glu Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
        115                 120                 125

Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
    130                 135
```

<210> 47
<211> 381
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 47

```
atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga   60

gaaattctgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc   120

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa   180

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca   240

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag   300

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgac gttcggccaa   360

gggaccaagg tggaaatcaa a                                              381
```

<210> 48
<211> 127
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 48

```
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1               5                  10                  15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
            20                  25                  30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
    50                  55                  60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
                85                  90                  95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
            100                 105                 110

Gly Ser Ser Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
        115                 120                 125
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano aislado o una porción de unión a antígeno del mismo seleccionados entre el grupo que consiste en:

(i) un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que comprenden:

a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 1;
b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 4;
c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 7;
d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 10;
e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 13; y
f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 16;

(ii) un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que comprenden:

a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 2;
b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 5;
c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 8;
d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 11;
e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 14; y
f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 17; y

(iii) un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que comprenden:

a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 3;
b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 6;
c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 9;
d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 12;
e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 15; y
f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 18;
en donde el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo se unen a Glipicano-3.

2. El anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 que comprenden:

a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 1;
b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 4;
c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 7;
d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 10;
e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 13; y
f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 16.

3. El anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 que comprenden:

a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 2;
b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 5;
c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 8;
d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 11;
e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 14; y
f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 17.

4. El anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 que comprenden:

a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 3;
b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 6;
c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID Nº: 9;
d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 12;
e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 15; y
f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID Nº: 18.

5. Un anticuerpo monoclonal humano aislado o porción de unión a antígeno del mismo seleccionados entre el grupo que consiste en:

i) un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que comprenden:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 19; y
(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 22;

ii) un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que comprenden:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 20; y
(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 23; y

iii) un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que comprenden:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 21; y
(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 24;
en el que el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo se unen a Glipicano-3.

6. El anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 5, que comprenden:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 19; y
(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 22.

7. El anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 5, que comprenden:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 20; y
(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 23.

8. El anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 5, que comprenden:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 21; y
(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 24.

9. El anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo hipofucosilado.

10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, el cual es un anticuerpo de longitud completa de un isotipo IgG1 o una porción de unión a antígeno del mismo.

11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, el cual es un anticuerpo de longitud completa de un isotipo IgG4 o una porción de unión a antígeno del mismo.

12. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, ligado a un agente terapéutico.

13. El inmunoconjugado de la reivindicación 12, en el que el agente terapéutico es una citotoxina.

14. El inmunoconjugado de la reivindicación 12, en el que el agente terapéutico es un isótopo radiactivo.

15. Una composición que comprende el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o el inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 12-14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

16. Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

17. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 16.

18. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 17.

19. El anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para su uso en un método de inhibición del crecimiento de células tumorales que expresan Glipicano-3, en donde el método comprende poner en contacto las células con el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo.

20. El anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, para su uso en un método como se define en la reivindicación 19, en donde las células tumorales proceden de tejido hepático.

21. El anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, para su uso en un método como se define en la reivindicación 19, en donde el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, es un inmunoconjugado.

Figura 1A : Anti-Glipicano-3 4A6 V_H

```
segmento V:      5-51
segmento J:      JH4b

      E   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G   E   S   L
  1 GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                                           CDR1
                                                   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      K   I   S   C   K   G   S   G   Y   S   F   T   S   Y   W   I   A   W
 55 AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT ACC AGC TAC TGG ATC GCC TGG

                                                               CDR2
                                                       ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      V   R   Q   M   P   G   K   G   L   E   W   M   G   I   I   F   P   G
109 GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TTT CCT GGT

                        CDR2
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      D   S   D   T   R   Y   S   P   S   F   Q   G   Q   V   T   I   S   A
163 GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

      D   R   S   I   R   T   A   Y   L   Q   W   S   S   L   K   A   S   D
217 GAC AGG TCC ATC AGA ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                                   CDR3
                                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      T   A   L   Y   Y   C   A   R   T   R   E   G   Y   F   D   Y   W   G
271 ACC GCC TTG TAT TAC TGT GCG AGA ACC CGG GAG GGG TAC TTT GAC TAC TGG GGC

      Q   G   T   L   V   T   V   S   S
325 CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

>Glypican-3 4A6, VH-NT con líder
ATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTCCTCCTGGCTGTTCTCCAAGGAGTCTG
TGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGA
GTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGA
TCGCCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCAT
CTTTCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCA
CCATCTCAGCCGACAGGTCCATCAGAACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCT
GAAGGCCTCGGACACCGCCTTGTATTACTGTGCGAGAACCCGGGAGGGGTAC
TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

> Glypican-3 4A6, VH-AA con líder
MGSTAILALLLAVLQGVCAEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIA
WVRQMPGKGLEWMGIIFPGDSDTRYSPSFQGQVTISADRSIRTAYLQWSSLKAS
DTALYYCARTREGYFDYWGQGTLVTVSS

Figura 1B : Anti-Glipicano-3 4A6 V_K

segmento V: A27
segmento J: JK4

```
    E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E   R
  1 GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
    A   T   L   S   C   R   A   V   Q   S   V   S   S   S   Y   L   A   W
 55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC GTT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAT TTA GCC TGG

                                                            CDR2
                                                        ~~~~~~~~~~~~~~~~
    Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S   S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR2
    ~~~~~~~~~~~~
    R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                                                CDR3
                                                                ~~~
    T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

            CDR3
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
    Q   Y   G   S   S   P   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I   K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
```

>Glypican-3 4A6, VK-NT con líder
ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATAC
CACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAG
GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCGTTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTA
TTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATG
GTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTC
TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCA
GTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCCACTTTCGGCGGAGGGACCA
AGGTGGAGATCAAA

>Glypican-3 4A6, VK-AA con líder
METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAVQSVSSSYLA
WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ
YGSSPTFGGGTKVEIK

Figura 2A : Anti-Glipicano-3 11E7 V_H

segmento V: 5-51
segmento J: JH4b

```
   E   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G   E   S   L
 1 GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                                     CDR 1
                                                 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
   K   I   S   C   K   G   S   G   Y   S   F   T   N   Y   W   I   A   W
55 AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT ACC AAC TAC TGG ATC GCC TGG

                                                             CDR 2
                                                 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
   V   R   Q   M   P   G   K   G   L   E   W   M   G   I   I   Y   P   G
109 GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                     CDR 2
   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
   D   S   D   T   R   Y   S   P   S   F   Q   G   Q   V   T   I   S   A
163 GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

   D   K   S   I   R   T   A   Y   L   Q   W   S   S   L   K   A   S   D
217 GAC AAG TCC ATC AGA ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                         CDR 3
                                 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
   T   A   M   Y   Y   C   A   R   T   R   E   G   Y   F   D   Y   W   G
271 ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA ACC CGG GAG GGG TAC TTT GAC TAC TGG GGC

   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
325 CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

> Glypican-3 11E7, VH-NT con líder

ATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTCCTCCTGGCTGTTCTCCAAGGAGT
CTGTGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCG
GGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAAC
TACTGGATCGCCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGAT
GGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCC
AAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGAACCGCCTACCTG
CAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAG
AACCCGGGAGGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG
TCTCCTCA

>Glypican-3 11E7, VH-AA con líder

MGSTAILALLLAVLQGVCAEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIA
WVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSIRTAYLQWSSLKAS
DTAMYYCARTREGYFDYWGQGTLVTVSS

Figura 2B : Anti-Glipicano-3 11E7 V_K

segmento V: A27
segmento J: JK4

```
    E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E   R
  1 GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR 1
                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
    A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   Y   L   A   W
 55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                                            CDR 2
                                                            ~~~~~~~~~~~~~~~~
    Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S   S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR 2
    ~~~~~~~~~~~
    R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                                                    CDR
                                                                    ~~~
    T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

            CDR 3
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
    Q   Y   G   S   S   P   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I   K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
```

>Glypican-3 11E7, VK-NT con líder
ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGA
TACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGT
CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGC
AGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCT
CCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCA
GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCCAC
TTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

> Glypican-3 11E7, VK-AA con líder
METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW
YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY
GSSPTFGGGTKVEIK

Figura 3A : Anti-Glipicano-3 16D10 V_H

segmento V: 5-51
segmento J: JH4b

```
    E   V   Q   L   V   Q   S   G   A   D   V   T   K   P   G   E   S   L
  1 GAG GTG CAA CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAT GTG ACA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                                        CDR1
                                                ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
    K   I   S   C   K   V   S   G   Y   R   F   T   N   Y   W   I   G   W
 55 AAG ATC TCC TGT AAG GTT TCT GGA TAC AGG TTT ACC AAC TAC TGG ATC GGC TGG

                                                            CDR2
                                                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
    M   R   Q   M   S   G   K   G   L   E   W   M   G   I   I   Y   P   G
109 ATG CGC CAG ATG TCC GGG AAA GGC CTG GAA TGG ATG GGC ATC ATC TAT CCT GGT

                    CDR2
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
    D   S   D   T   R   Y   S   P   S   F   Q   G   H   V   T   I   S   A
163 GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGT CCG TCC TTC CAA GGC CAC GTC ACC ATC TCA GCC

    D   K   S   I   N   T   A   Y   L   R   W   S   S   L   K   A   S   D
217 GAC AAA TCC ATC AAC ACC GCC TAC CTA CGG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                        CDR3
                                ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
    T   A   I   Y   Y   C   A   R   T   R   E   G   F   F   D   Y   W   G
271 ACC GCC ATT TAT TAC TGT GCG CGA ACC CGG GAG GGG TTC TTT GAC TAC TGG GGC

    Q   G   T   P   V   T   V   S   S
325 CAG GGA ACC CCG GTC ACC GTC TCC TCA
```

>Glypican-3 16D10, VH-NT con líder
ATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTCCTCCTGGCTATTCTCCGAGGAGTCTG
TGCCGAGGTGCAACTGGTGCAGTCTGGAGCAGATGTGACAAAGCCCGGGGA
GTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGTTTCTGGATACAGGTTTACCAACTACTGGA
TCGGCTGGATGCGCCAGATGTCCGGGAAAGGCCTGGAATGGATGGGCATCAT
CTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGTCCGTCCTTCCAAGGCCACGTCA
CCATCTCAGCCGACAAATCCATCAACACCGCCTACCTACGGTGGAGCAGCCT
GAAGGCCTCGGACACCGCCATTTATTACTGTGCGCGAACCCGGGAGGGGTTC
TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCGGTCACCGTCTCCTCA

> Glypican-3 16D10, VH-AA con líder
MGSTAILALLLAILRGVCAEVQLVQSGADVTKPGESLKISCKVSGYRFTNYWIG
WMRQMSGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGHVTISADKSINTAYLRWSSLKAS
DTAIYYCARTREGFFDYWGQGTPVTVSS

Figura 3B : Anti-Glipicano-3 16D10 V_K

segmento V: A27
segmento J: JK1

```
   E   I   L   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E   R
 1 GAA ATT CTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   Y   L   A   W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                                                CDR2
                                                    ~~~~~~~~~~~~~~~~
   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S   S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

     CDR2
    ~~~~~~~~~~~
   R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                                                    CDR3
                                                                    ~~~
   T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

            CDR3
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
   Q   Y   G   S   S   P   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
```

>Glypican-3 16D10, VK-NT con líder
ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATAC
CACCGGAGAAATTCTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAG
GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTA
CTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
GGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGT
CTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGC
AGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGACGTTCGGCCAAGGGACC
AAGGTGGAAATCAAA

>Glypican-3 16D10, VK-AA con líder
METPAQLLFLLLLWLPDTTGEILLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW
YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY
GSSPTFGQGTKVEIK

Figura 4: Anti-Glipicano -3 4A6 V_H

```
                                                                                      _CDR1____
5-51 línea geminal   E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T S Y W I G W
4A6  VH              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - A -

                                               _CDR2_____________________________
5-51 línea geminal   V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
4A6  VH              - - - - - - - - - - - - - - - F - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                                   _CDR3__________
5-51 línea geminal   D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R
JH4b línea geminal                                                               Y F D Y W G
4A6  VH              - R - - R - - - - - - - - - - - - - - - L - - - - - T R E G - - - - - -

JH4b línea geminal   Q G T L V T V S S
4A6  VH              - - - - - - - - -  (JH4b)
```

Figura 5: Anti-Glipicano-3 11E7 V_H

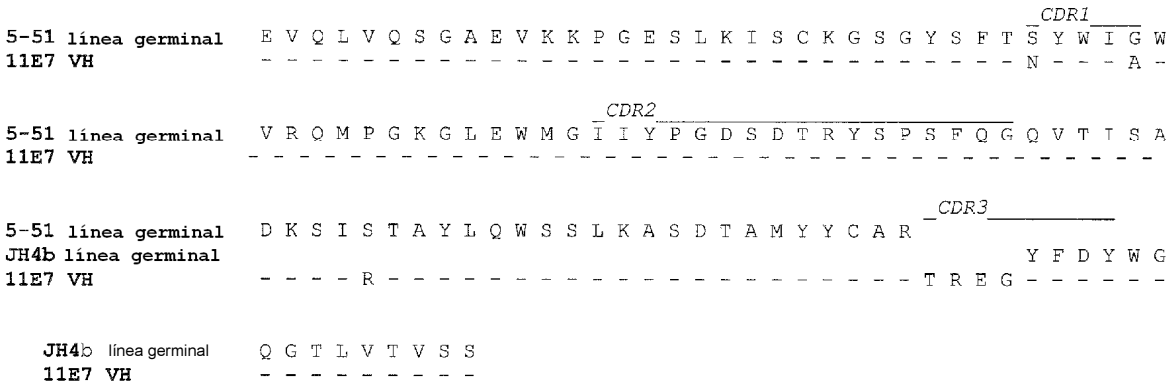


Figura 6 : Anti-Glipicano-3 16D10 V_H

```
5-51 línea geminal   E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K
16D10 VH             - - - - - - - - - - D - T - - - - - - - -

                                          _CDR1____
5-51 línea geminal   I S C K G S G Y S F T S Y W I G W V R
16D10 VH             - - - - V - - - R - - N - - - - - - M -

                                          _CDR2__________
5-51 línea geminal   Q M P G K G L E W M G I I Y P G D S D
16D10 VH             - - S - - - - - - - - - - - - - - - -

                     ____________________
5-51 línea geminal   T R Y S P S F Q G Q V T I S A D K S I
16D10 VH             - - - - - - - - - - H - - - - - - - - - -

5-51 línea geminal   S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y
16D10 VH             N - - - - R - - - - - - - - - - I - -

                          _CDR3__________
5-51 línea geminal   C A R
JH4b línea geminal                     F D Y W G Q G T L V T
16D10 VH             - - - T R E G F - - - - - - - - - P - -

JH4b línea geminal   V S S
16D10 VH             - - -
```

Figura 7: Anti-Glipicano- 3 4A6 V_K

```
A27 línea germinal      E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
4A6 VK                  - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                              _CDR1_____________________
A27 línea germinal      A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
4A6 VK                  - - - - - - - V - - - - - - - - - -

                                                  _CDR2__
A27 línea germinal      Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
4A6 VK                  - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                        CDR2_
A27 línea germinal      R A T G I P D R F S G S G S G T D F
4A6 VK                  - - - - - - - - - - - - - - - - - -

A27 línea germinal      T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
4A6 VK                  - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                        CDR3_________
A27 línea germinal      Q Y G S S P
JK4 línea germinal                T F G G G T K V E I K
4A6 VK                  - - - - - - - - - - - - - - - - - - (JK4)
```

Figura 8 : Anti-Glipicano -3 11E7 V_K

```
A27 línea germinal    E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
11E7 VK               - - - - - - - - - - - - - - - - -

                          CDR1
A27 línea germinal    A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
11E7 VK               - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                  CDR 2
A27 línea germinal    Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
11E7 VK               - - - - - - - - - - - - - - - - -

                      CDR 2
A27 línea germinal    R A T G I P D R F S G S G S G T D F
11E7 VK               - - - - - - - - - - - - - - - - -

A27 línea germinal    T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
11E7 VK               - - - - - - - - - - - - - - - - -

                      CDR3
A27 línea germinal    Q Y G S S P
JK4 línea germinal                T F G G G T K V E I K
11E7 VK               - - - - - - - - - - - - - - - - -
```

Figura 9 : Anti-Glipicano-3 16D10 V_K

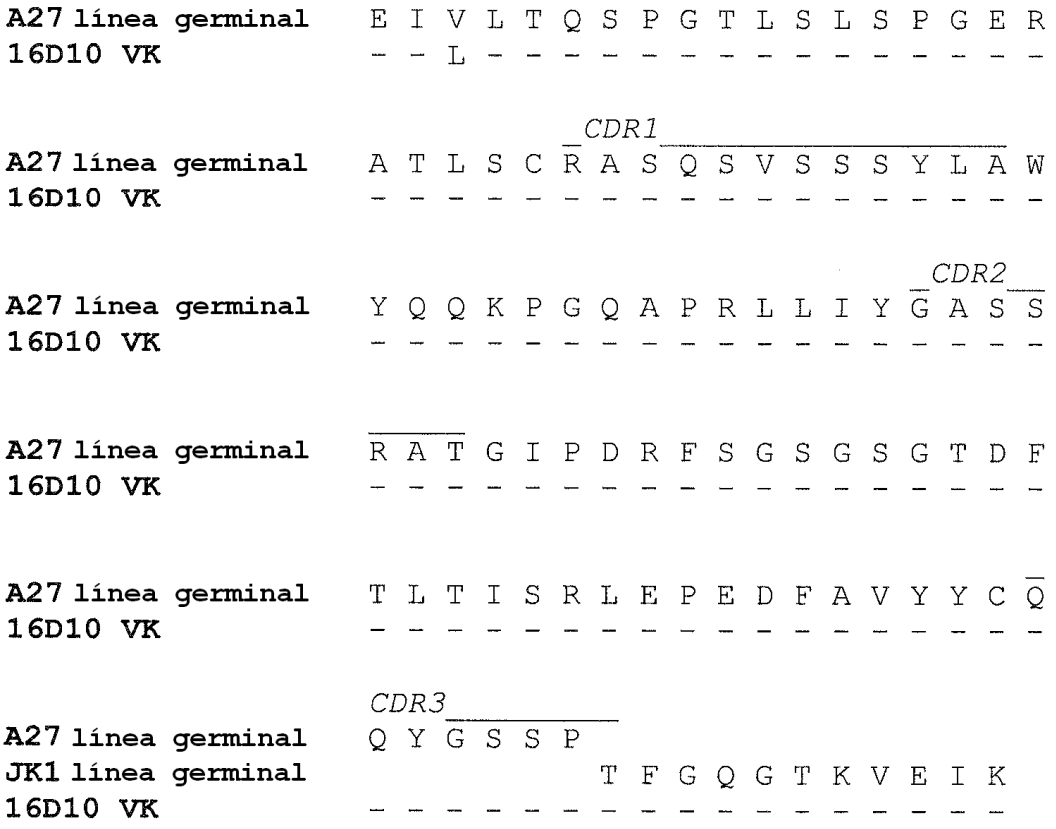


Figura 10: Titulación FACS (EC50)

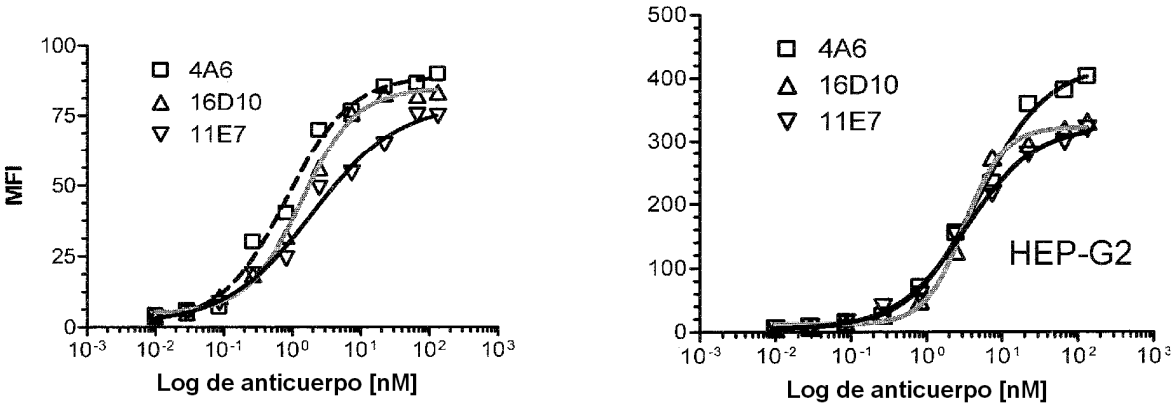


Figura 11: Análisis FACS que muestra enlace específico a células HCC

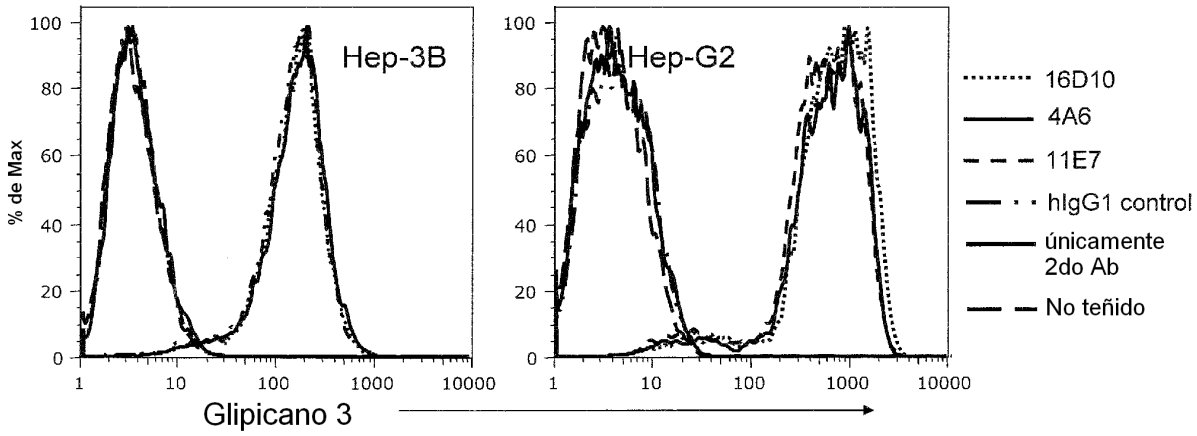


Figura 12: Análisis FACS muestra anticuerpo específico enlazado a Glipicano 3

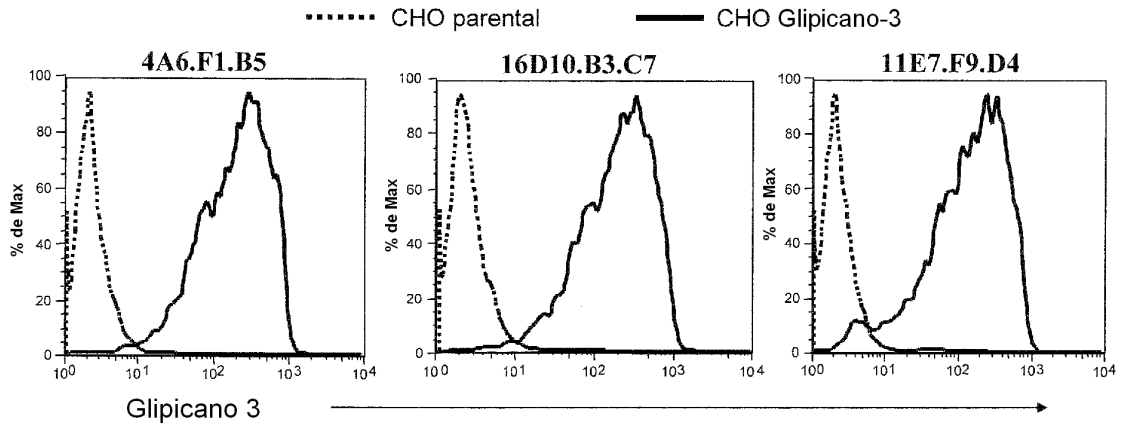


Figura 13: Anticuerpos 4A6 enlazados a tejidos cancerígenos hepáticos

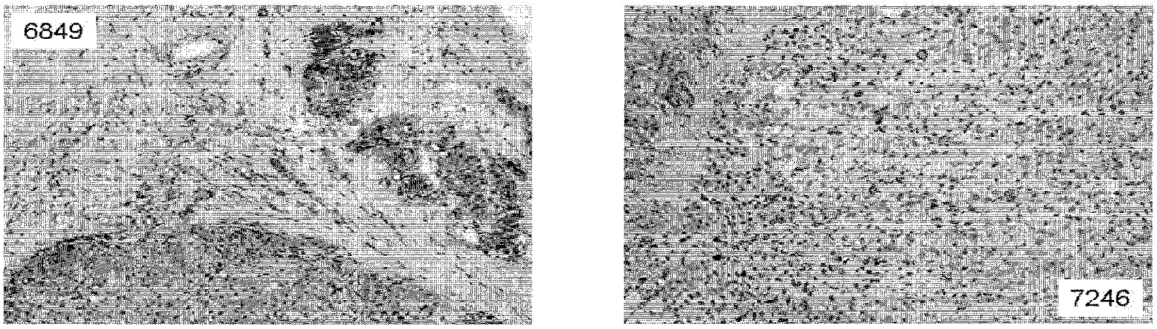


Figura 14: Citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo

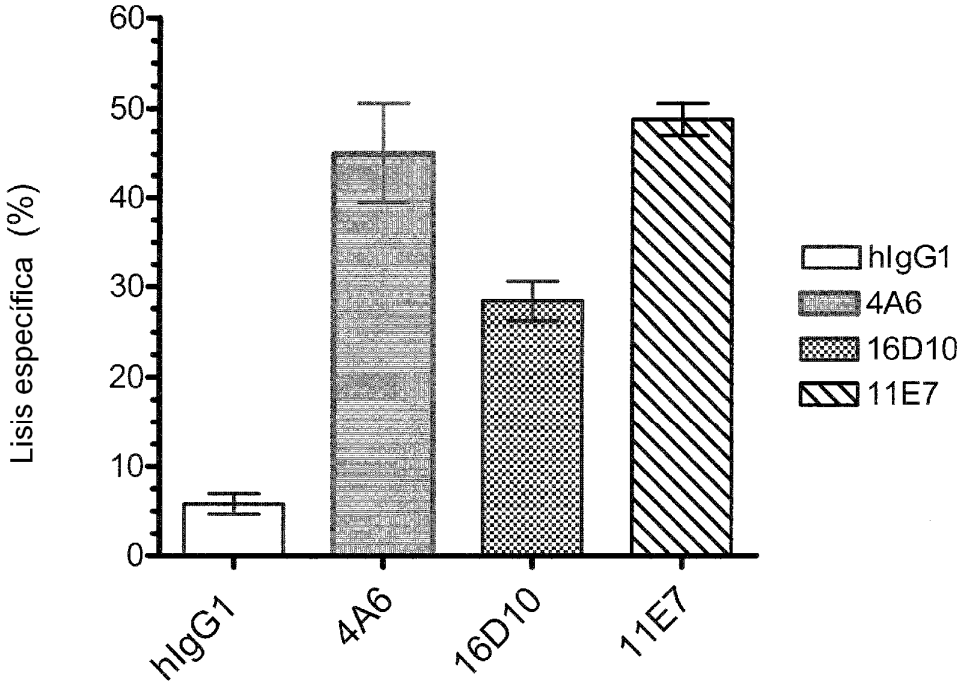
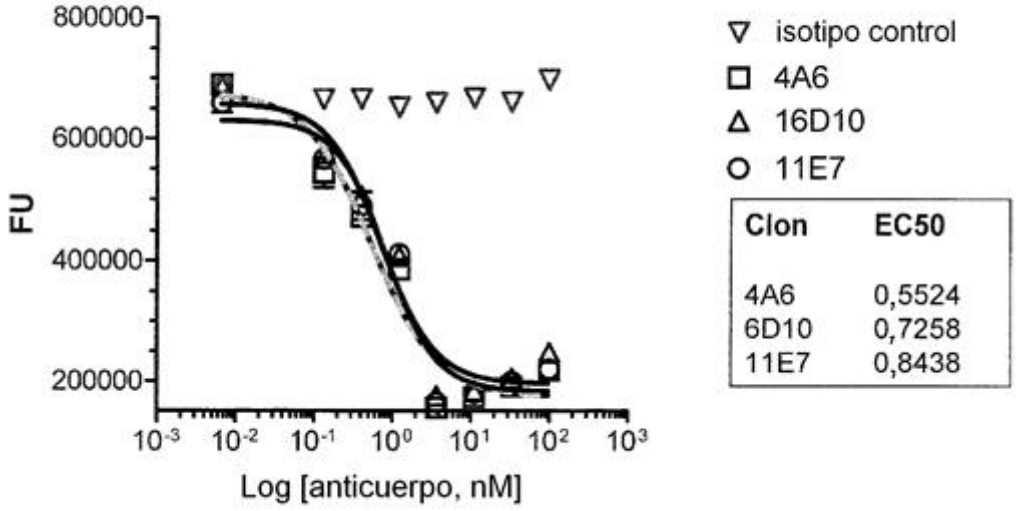


Figura 15: Ensayo de internalización HumZap



Clon	EC50
4A6	0,5524
6D10	0,7258
11E7	0,8438

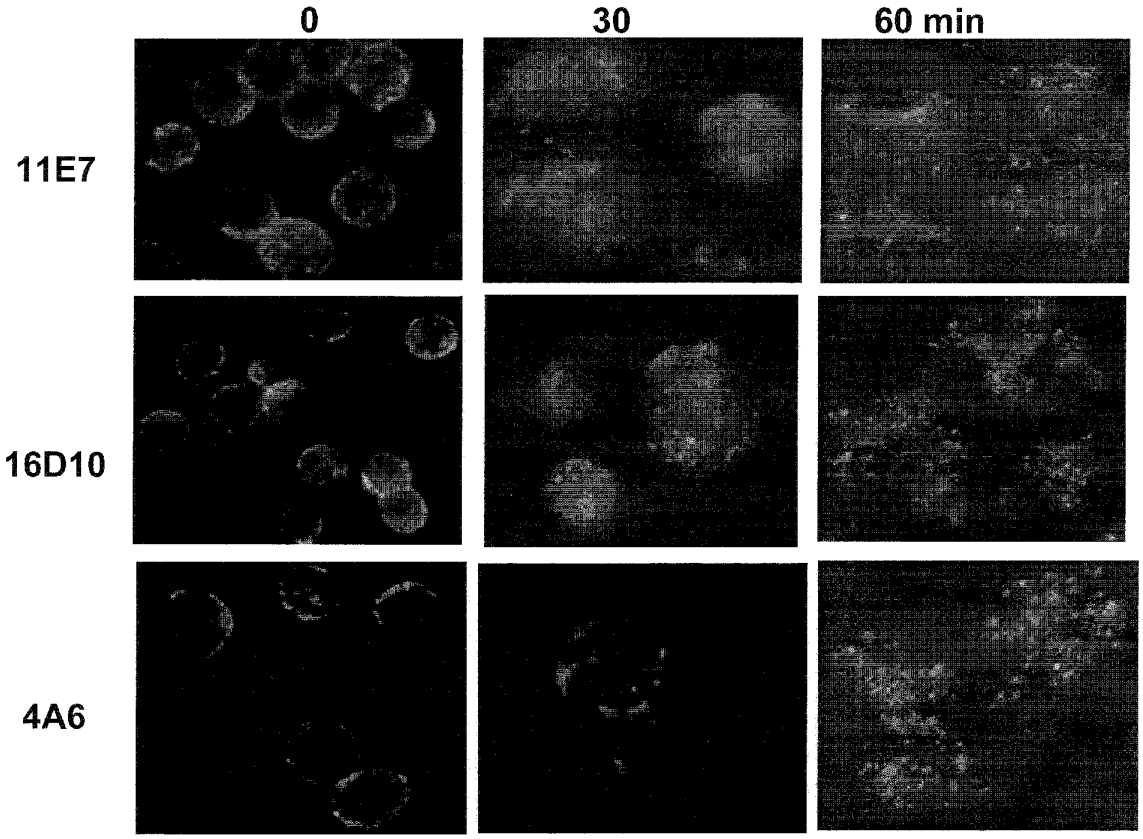



Figura 16: Inmunofluorescencia muestra internalización de anticuerpo