



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PGT

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

10-41193

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO ANTICUERPO ANTI-GLIPICAN-3 QUE TIENE CINÉTICAS

MEJORADAS EN EL PLASMA.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12P 21/08

71. SOLICITANTE CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

DOMICILIO Kita-ku, Tokyo, Japón

74. APODERADO DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C. _____

28-04-2010



No. 10-041193- -00000-0000

Fecha: 2010-04-09 15:30:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 229

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

**2
SOLICITANTE
(71)**

Nombre: CHUGAI SEYAKU KABUSHIKI
KAISHA

Dirección: 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku,
Tokyo 115-8543 Japón.

Nacionalidad o domicilio: Kita-ku,
Tokyo, Japón.

Lugar de Constitución: Japón

Teléfono: **Fax:**

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ **NIT** ☐

C.E. ☐ **Otro** ☐

Número

**3
REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN

Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6

Teléfono: 6 181088 **Fax:** 6350824

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ **NIT** ☐

C.E. ☐ **Otro** ☐

Número 41.654.882
TP 20824 CSJ

**4
INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER HOJA ANEXA

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/JP2008/002690 **Fecha** 26 de septiembre de 2008

Publicación Internacional No. WO 2009/041062 A1 **Fecha** 2 de abril de 2009

6 TÍTULO (54) ANTICUERPO ANTI-GLIPICAN-3 QUE TIENE CINÉTICAS MEJORADAS EN EL PLASMA.

7 Clasificación Internacional (51) C12P 21/08

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

JAPÓN

(32) Fecha

28 de septiembre de 2007

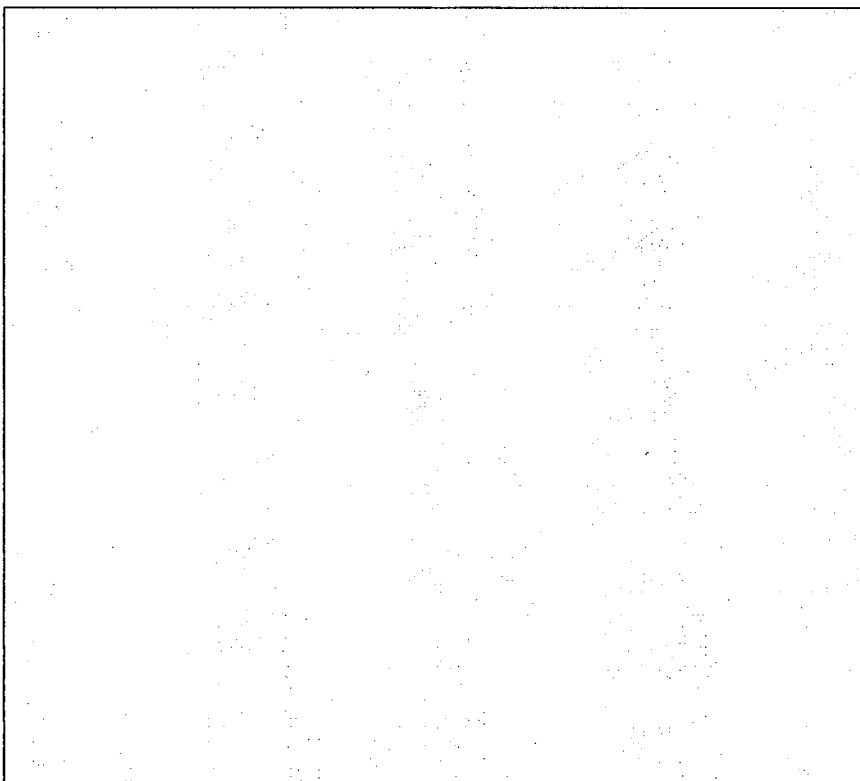
(31) Número de Solicitud

2007-256063

9 Comprobante de pago No. 10-11,105 // 10-18,193 // 10-18,056 // 10-18,046 // 10-18,045 // 10-18,044
Fecha 10/02/10 // 08/03/10 // 08/03/10 // 08/03/10 // 08/03/10 // 08/03/10

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros Reporte de examen preliminar

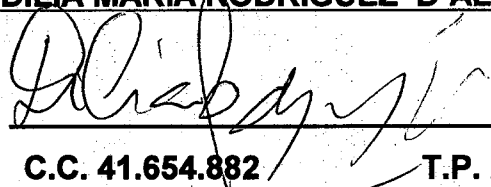
11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:


C.C. 41.654.882 T.P. 20824

ANEXOS

INVENTORES

1.)

IGAWA, Tomoyuki /

(c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, 135, Komakado 1-chome, Gotemba-shi, Shizuoka
412-8513 Japón);

2.)

KURAMOCHI, Taichi /

(c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, 135, Komakado 1-chome, Gotemba-shi, Shizuoka
412-8513 Japón);

3.)

SHIRAIWA, Hirotake /

(c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, 135, Komakado 1-chome, Gotemba-shi, Shizuoka
412-8513 Japón);

4.)

TSUNODA, Hiroyuki /

(c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, 135, Komakado 1-chome, Gotemba-shi, Shizuoka
412-8513 Japón);

5.)

TACHIBANA, Tatsuhiko

(c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, 135, Komakado 1-chome, Gotemba-shi, Shizuoka
412-8513 Japón);

6.)

ISHIGURO, Takahiro

(c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, 200, Kajiwara, Kamakura-shi, Kanagawa 247-8530
Japón).

P-7504.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 80017667

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 11,105
FECHA : FEBRERO 10 DE 2010



No. 10-041193-00000-0000

Fecha: 2010-04-09 15.30.02 Dep. 2020 DIP.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 229

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175684132	10/02/2010	68,215,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 1,000.00

SON: MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 18,198
FECHA : MARZO 8 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-041193- -00000-0000

Fecha: 2010-04-09 15:30:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 229

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MOSET Y CG. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062734387	16937491	08/03/2010	89,370,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	21 CERTIFICACIONES
			13,000.00
TOTAL :			\$ 13,000.00

SON: TRECE MIL PESOS

RESPONSABLE :

(Handwritten signature)

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 18,056
FECHA : MARZO 8 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-041193-00000-0000

Fecha: 2010-04-09 15:30:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 229

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754367	16937491	08/03/2010	89,370,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTADO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		114 PTC CAP-II EXAMEN DE PATENTIBILIDAD	470,000.00
		TOTAL :	\$ 470,000.00

SON: CUATROCIENTOS SETENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 18,046
FECHA : MARZO 8 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-041193- -00000-0000

Fecha: 2010-04-09 15:30:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEI/II Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 229

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754367	16937491	08/03/2010	89,370,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

[Handwritten Signature]

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 18,045
FECHA : MARZO 8 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-041193-00000-0000

Fecha: 2010-04-09 15:30:02 Dep. 2020 DIP. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 229

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CG. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	16937491	08/03/2010	89,370,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CASH APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 90017

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-041193- -00000-0000

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 -- 18,044

FECHA : MARZO 8 DE 2010

Fecha: 2010-04-09 15:30:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE/II Evs: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 229

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	16937491	08/03/2010	39,370,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL :
			\$ 500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 - Fax: (57 1) 6350824 - Email: info@clarkemodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de
CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de
Japón

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en **5-1. Ukiina 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115-8543, Japón**

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de **DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN**, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y **CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ**, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñar comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia decenal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutela y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculta (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieran.

Dado y firmado en

a los días de

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

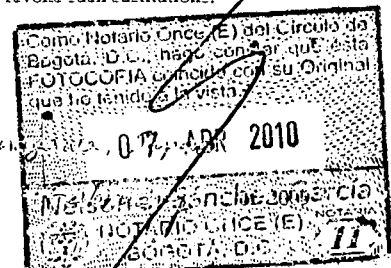
legal representative(s) of
CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

an organization existing under the laws of
Japan

and in present execution of its business activity, domiciled **5-1. Ukiina 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115-8543, Japan**

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to **DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN**, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and **CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ**, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration court, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extra-judicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitution.



Granted and signed at **Kanagawa, 07 APR 2010**

on this **07th** day of

Masahisa Yamaguchi
Firma / signature

YAMAGUCHI, Masahisa

General Manager, Intellectual Property Department

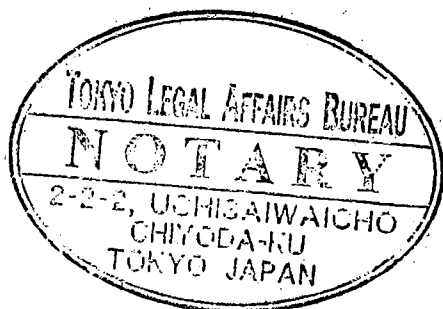
NOTARIAL CERTIFICATE

I, the undersigned NOTARY, duly authorized and practicing at TOKYO,
JAPAN, DO HEREBY CERTIFY THAT:

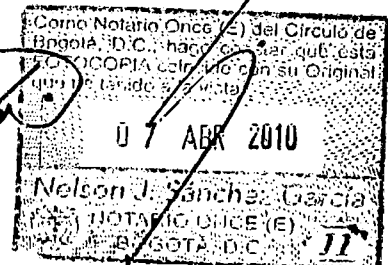
The signature that appears at the foot of the written Power of Attorney is
the genuine and authentic signature of Mr. MASAHIKA YAMAGUCHI,
General Manager, Intellectual Property Department of CHUGAI SEIYAKU
KABUSHIKI KAISHA, a corporation existing and organized under the laws
of Japan, who has produced sufficient proof of his power to execute the said
instrument on behalf of the above mentioned corporation.

IN TESTIMONY WHEREOF, I have hereto subscribed my name and
affixed my seal of office.

Dated this 10th day of March, 2009,



Makazu Ikeda
MAKAZU IKEDA
NOTARY



囑託人中外製薬株式会社知的財産部長山口雅久の代理人弘藤瑞恵は、本公証人に対し、囑託人が別添文書に署名したことを自認している旨陳述した。



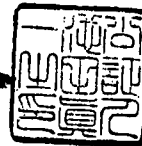
よって、これを認証する。

平成21年 3 月 10 日、本公証人役場において
東京都千代田区内幸町2丁目2番2号

東京法務局所属

公 証 人
Notary

池田真一
MAKAZU IKEDA



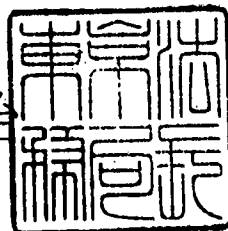
証 明

上記署名は、東京法務局所属公証人の署名に相違ないものであり、かつ、その押印は、真実のものであることを証明する。

平成21年 3 月 10 日

東京法務局長

五十嵐義治



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN

This public document

2. has been signed by **MAKAZU IKEDA**

3. acting in the capacity of Notary of the Tokyo Legal Affairs Bureau

4. bears the seal/stamp of **MAKAZU IKEDA, NOTARY**

Certified

5. at Tokyo

6. **MAR 10 2009**

7. by the Ministry of Foreign Affairs

8. 09- NO 000148

9. Seal/stamp:

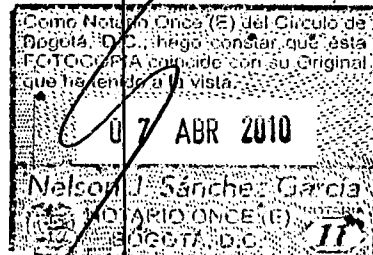
10. Signature



K. Oyabe

Ezutoyo OYABE

For the Minister for Foreign Affairs



Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe, traductora e intérprete oficial según resolución No. 0369 del Ministerio de Justicia, del documento legalizado mediante la APOSTILLA No. 000148 de 10 de marzo de 2009 expedida en Japón, el cual corresponde a un documento de poder en inglés con su correspondiente traducción al español (razón por la cual no se hace traducción del mismo texto), otorgado por la sociedad CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, domiciliada en Tokio, Japón, firmado el 6 de febrero de 2009 por YAMAGUCHI, Masahisa, Director General del departamento de propiedad intelectual.

Registro No. 394 de 2009

Certificado Notarial

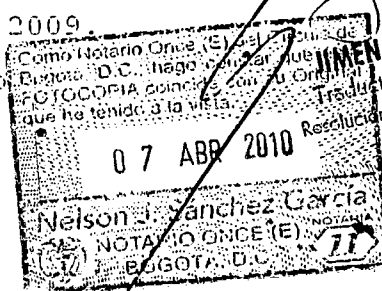
Yo, el suscrito NOTARIO, debidamente autorizado y practicante en TOKIO, JAPÓN, POR MEDIO DEL PRESENTE CERTIFICO QUE:

La firma que aparece al pie del Poder escrito es la firma genuina y auténtica del señor MASAHAISA YAMAGUCHI, director general del departamento de propiedad intelectual de CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, una sociedad existente y organizada bajo las leyes de Japón, quien ha producido suficiente prueba de su poder para ejecutar dicho instrumento a nombre de la mencionada sociedad.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he suscrito mi nombre y fijado el sello de mi oficina.

Fechado este día 10 de marzo de 2009.

Firmado: Masakazu Ikeda, Notario



Jimena Escobar Uribe
Traductora e Intérprete Oficial
Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995

Sello: Oficina de Asuntos Legales de Tokio
No. 2-2-2, Uchisaiwaicho, Chiyoda-Ku, Tokio, Japón

APOSTILLA

(Convención de la Haya de 5 de octubre de 1961)

1. País: **JAPÓN**

Este documento público

2. Ha sido firmado por **Masakazu Ikeda**

3. Actuando en su calidad de **Notario de la Oficina de Asuntos Legales de Tokio**

4. Lleva el sello de **Masakazu Ikeda, Notario**

CERTIFICADO

5. En Tokio

6. Marzo 10 de 2009

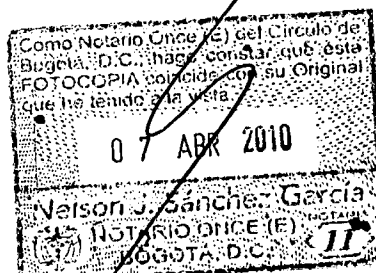
7. Por el Ministerio de Asuntos Exteriores

8. NO. 000149

9. Sello/Estampilla: Ministerio de Asuntos Exteriores, Japón

10. Firma (ilegible), **Hasutoyo OYABE**, Por el Ministro de Asuntos Exteriores

Jimena Escobar Uribe
JIMENA ESCOBAR URIBE
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995



RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

Método para modular la vida media del plasma del anticuerpo anti-glipican 3, una composición farmacéutica que comprende un componente efectivo del anticuerpo anti-glipican 3 que tiene una vida media de plasma que ha sido modulada, se suministra un método para preparar el anti-glipican 3 y una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-glipican 3 como un componente efectivo. Se describe un método para modular la vida media del plasma del anticuerpo anti-glipican 3 que al modificar el residuo de aminoácido que se expone sobre la superficie del anticuerpo anti-glipican 3; un anticuerpo anti-glipican 3 que tiene una vida media del plasma que se ha modulado mediante la modificación de residuo de aminoácido, una composición farmacéutica que comprende como un componente efectivo el anticuerpo anti-glipican 3, y un método para preparar el anticuerpo anti-glipican 3 y producir una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-glipican 3 como un componente efectivo.

ANTICUERPO ANTI-GLIPICAN-3 QUE TIENE CINÉTICAS MEJORADAS EN
EL PLASMA

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Solicitudes Relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud de Patente Japonesa No. 2007-256063, presentada en Septiembre 28, 2007, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia.

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con un método para mejorar las cinéticas del plasma (sangre) de los anticuerpos anti-glipican 3, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-glipican 3 que tiene las cinéticas de plasma mejoradas como un componente efectivo, y un método para preparar el mismo.

Descripción de la Técnica Relacionada

Anticuerpos son estables en la sangre y exhiben pocos efectos colaterales y por estas razones su uso como fármaco ha estado recibiendo atención. Entre los varios isotipos de anticuerpo, un gran número de anticuerpos terapéuticos isotipo IgG están en el mercado y un gran número de los

anticuerpos terapéuticos también están habitualmente bajo desarrollo (Janice M. Reichert, Clark J. Rosensweig, Laura B. Faden, y Matthew C. Dewitz, Monoclonal antibody successes in the clinic, *Nature Biotechnology* (2005) 23, 1073-8; Pavlou A. K. y Belsey M. J., The therapeutic antibodies market to 2008, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2005) 59(3), 389-96; y Janice M. Reichert y Vila E. Valge-Archer, Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics, *Nat. Rev. Drug Disc.* (2007) 6, 349-356). Los anticuerpos anti-glipican 3 se conocen por exhibir actividad antitumoral mediante el ejercicio de citotoxicidad contra, por ejemplo, las células de cáncer de hígado y las células de cáncer de pulmón (WO 2003/000883). Los conjugados anti-fármaco que comprenden un anticuerpo anti-glipican 3 unidos a una sustancia citotóxica también se conocen por exhibir actividad antitumoral contra el cáncer de hígado, el cáncer de ovario, el melanoma, y así sucesivamente (Albina Nesterova, Paul J. Carter, y Leia M. Smith, Glypican 3 as a Novel Target for an Antibody-Drug Conjugate, AACR Abstract No. 656 (2007), Los Angeles, CA, Abril, 4-18).

Además, las tecnologías para mejorar las funciones efectuatoras se están desarrollando para producir anticuerpos terapéuticos de segunda generación. Por ejemplo, se conoce que la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y la actividad de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) se mejoran mediante una sustitución del aminoácido en la cual los aminoácidos constituyen la región

Fc de los anticuerpos del isotipo IgG (denominados como anticuerpos IgG) se reemplazan por diferentes aminoácidos (Kim S. J., Park Y., y Hong H. J., *Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies*, *Mol. Cells* (2005) 20(1), 17-29). Cuando un anticuerpo anti-glipican 3 se produce en las células CHO a las que se le ha borrado el transportador fucosa, la fucosa no se une a las cadenas de azúcar unidas al anticuerpo anti-glipican 3. Tal anticuerpo anti-glipican 3 tiene una actividad ADCC significativamente mayor que el anticuerpo anti-glipican 3 que contiene fucosa en la cadena ramificada de la cadena de azúcar, y se cree que exhibe una mayor actividad antitumoral como un anticuerpo terapéutico (WO 2006/067913).

Además de tales tecnologías para mejorar las funciones efectuatoras, también se conocen otras tecnologías en las cuales la vida media del plasma de un anticuerpo se incrementa o disminuye mediante la sustitución de aminoácido sobre los aminoácidos que constituyen la región Fc del anticuerpo (Hinton P. R., Xiong J. M., Johlfis M. G., Tang M. T., Keller S., y Tsurushita N., *An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life*, *J. Immunol.* (2006) 176(1), 346-56; y Ghetie V., Popov S., Borvak J., Radu C., Matesoi D., Medesan C., Ober R. J., y Ward E. S., *Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis*, *Nat. Biotechnol.* (1997) 15(7), 637-40). Si se aplica una tecnología que prolonga la vida media del plasma de los anticuerpos a los anticuerpos terapéuticos, se espera

que la dosis del anticuerpo terapéutico administrado se reduzca y su intervalo de administración se extienda, lo cual posibilitará el suministro de menos anticuerpos terapéuticos costosos con un factor de conveniencia alto.

En términos específicos, la vida media del plasma se puede extender al sustituir un aminoácido de la región Fc de un anticuerpo IgG con otro aminoácido que resulta en mejorar la afinidad del anticuerpo IgG para el receptor Fc neonatal, que se conoce por ser un receptor salvaje para el anticuerpo IgG. Además, también se conoce que la vida media del plasma se incrementa al reagrupar los dominios individuales (CH1, CH2, CH3) que constituyen la región constante del anticuerpo (Zuckier L. S., Chang C. J., Scharff M. D., y Morrison S. L., Chimeric human-mouse IgG antibodies with shuffled constant region exons demonstrate that multiple domains contribute to *in vivo* half-life, *Cancer Res.* (1998) 58(17), 3905-8). Sin embargo, en razón a que la secuencia del aminoácido de la región constante del anticuerpo IgG se conserva en humanos, un anticuerpo que tiene una sustitución de aminoácido artificial como se describe anteriormente en los aminoácidos que constituyen la región constante puede originar efectos colaterales al exhibir inmunogenicidad en el cuerpo humano. Por lo tanto se prefiere que se sustituya solamente un número pequeño de aminoácidos.

Las tecnologías que involucran la sustitución de aminoácido en la región variable (también denominada como

región V) de los anticuerpos IgG reportados hasta la fecha incluyen tecnología de humanización (Tsurushita N., Hinton P. R., y Kumar S., Design of humanized antibodies: from anti-Tac to Zenapax, *Methods* (2005) 36(1), 69-83), maduración de afinidad donde los aminoácidos en la región de determinación de complementariedad (CDR) es sustituye con el fin de incrementar la actividad de unión (Rajpal A., Beyaz N., Haber L., Cappuccilli G., Yee H., Bhatt R. R., Takeuchi T., Lerner R. A., y Crea R., A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2005) 102(24), 8466-7) y la sustitución del aminoácido en los aminoácidos que constituyen la región de estructura (FR) para mejorar la estabilidad fisicoquímica (Ewert S., Honegger A., y Pluckthun A., Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering, *Methods* (2004) 34(2), 184-99). A diferencia del caso con la sustitución del aminoácido en la región constante (también denominada como región C), la sustitución del aminoácido en la región variable se utiliza generalmente para mejorar las características (por ejemplo, estabilidad) y mejorar la función (por ejemplo, actividad de unión de antígeno) de los anticuerpos. En razón a que la secuencia del aminoácido que constituye el CDR de los anticuerpos humanizados se deriva de la secuencia del aminoácido de una especie animal no humana, el riesgo de generar la inmunogenicidad al introducir una sustitución de aminoácido artificial en esta secuencia se

creo que es inferior que las sustituciones de aminoácido en una secuencia en otras regiones. Más aún, con relación a una sustitución de aminoácido artificial en la secuencia de aminoácido que constituye el FR de los anticuerpos humanizados, se cree que tal sustitución posee poco riesgo de generar inmunogenicidad si la secuencia del aminoácido FR obtenida como una consecuencia de la sustitución es la misma que cualquiera de la pluralidad de las secuencias de aminoácido FR de anticuerpo humano que se publican en, por ejemplo, la base de datos Kabat (<http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>), la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr/>), y así sucesivamente. Adicionalmente, la inmunogenicidad se puede reducir a la reselección de una secuencia de anticuerpo humano que es muy similar a la secuencia del aminoácido FR obtenida como una consecuencia de sustitución, desde la pluralidad de las secuencias amino FR del anticuerpo humano que se publican en la base de datos Kabat, la base de datos IMGT, y así sucesivamente (WO 1999/018212).

En contraste, los únicos métodos conocidos para mejorar la vida media del plasma de los anticuerpos IgG son, como se describió anteriormente, la sustitución de aminoácido de los aminoácidos que constituyen la región Fc, que es una parte de la región constante, y no se ha reportado ningún método hasta la fecha que efectúe una mejora en la vida media del plasma de los anticuerpos IgG mediante la sustitución de aminoácido de los aminoácidos que constituyen la región variable, que se

cree que lleva un pequeño riesgo de invocar inmunogenicidad. La razón para esto, es en parte, que la vida media del plasma de los anticuerpos IgG se cree que depende principalmente de la supresión dependiente de antígeno y la unión al receptor FC neonatal, un receptor salvaje para los anticuerpos IgG (Lobo E. D., Hansen R. J., y Balthasar J. P., *Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics*, J. Pharm. Sci. (2004) 93(11), 2645-68), y que las funciones y propiedades de la región variable pueden no tener una influencia significativa sobre la vida media del plasma.

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

disminuye. Así, un incremento en la vida media del plasma de los anticuerpos IgG no se puede realizar mediante la modificación del pI del anticuerpo IgG por medio de la modificación química anteriormente descrita del anticuerpo IgG.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se realiza en vista de las circunstancias descritas anteriormente. Un objeto de la presente invención es suministrar un método de modular la vida media del plasma (sangre) del anticuerpo anti-glipican 3, un anticuerpo anti-glipican 3 que tiene una vida media de plasma modulada y una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo como un componente efectivo, así como también un método para preparar el anticuerpo anti-glipican 3 y la composición farmacéutica. Otro objeto de la presente invención es suministra un método para modular citotoxicidad de un anticuerpo al modular la vida media del plasma del anticuerpo que tiene citotoxicidad, un anticuerpo con citotoxicidad modulada y una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo, así como también un método para preparar el anticuerpo y la composición farmacéutica.

Los actuales inventores llevan a cabo investigaciones enfocadas en métodos para modular la vida media del plasma de un anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo anti-glipican 3). Como resultado, los presentes inventores descubrieron que la

vida media del plasma de un anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo anti-glipican 3) se puede modular al modificar - entre los residuos de aminoácido que constituyen la región variable y la región constante de un anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo anti-glipican 3) - los residuos de aminoácido expuestos sobre la superficie de esta molécula de anticuerpo y controlar de esta manera la carga de superficie de la molécula del anticuerpo. Específicamente, entre los residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácido que constituye la región variable y la región constante de un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3), se identifican residuos de aminoácido particulares que puedan modular la vida media del plasma del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) a través de modificar la carga de superficie sobre la molécula del anticuerpo sin afectar la estructura o función del anticuerpo, por ejemplo, la actividad de unión del antígeno. Los actuales inventores también confirman que un anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo anti-glipican 3) que tiene una vida media modulada de esta manera de hecho retiene su actividad de unión de antígeno. Los actuales inventores también encontraron que esa modulación de la vida media del plasma de un anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo anti-glipican 3) incrementa la actividad que inhibe la proliferación tumoral sobre las células de cáncer exhibidas mediante anticuerpos citotóxicos, tal como el anticuerpo anti-glipican 3.

La presente invención se relaciona con un método para

modular la vida media del plasma de un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) al modificar un residuo de aminoácido que se expone sobre la superficie del anticuerpo, un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) que tiene una vida media de plasma modulada por la modificación del residuo de aminoácido, una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo como un componente efectivo, y el método para preparar tal composición farmacéutica. Más específicamente, la presente invención suministra lo siguiente: [1] Un método para preparar el anticuerpo anti-glipican 3 con las cinéticas de plasma moduladas, dicho método comprende las etapas de:

(a) Cultivar una célula huésped que lleva un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-glipican 3 bajo condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico, en donde el anticuerpo anti-glipican 3 tiene una secuencia de aminoácido alterada para causar una modificación en la carga de al menos un residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie del anticuerpo; y

(b) recuperar el anticuerpo anti-glipican 3 del cultivo de la célula huésped;

[2] El método de acuerdo con [1], en donde la modulación de las cinéticas del plasma se incrementa o disminuye en un parámetro seleccionado de la vida media del plasma, el tiempo medio de residencia del plasma, y la separación del plasma;

[3] El método de acuerdo con [1], en donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante la sustitución del aminoácido;

[4] El método de acuerdo con [1], en donde el residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie del anticuerpo anti-glipican 3 se localiza en una región en el anticuerpo anti-glipican 3 diferente de la región de unión FcRn;

[5] El método de acuerdo con [4], en donde la región de unión FcRn comprende la región Fc;

[6] El método de acuerdo con [4], en donde la región de unión FcRn comprende los residuos de aminoácido de los números EU 250, 253, 310, 311, 314, 428, 435, 436 de acuerdo con la numeración Kabat;

[7] El método de acuerdo con [1], en donde el anticuerpo anti-glipican 3 es un anticuerpo IgG;

[8] El método de acuerdo con [1]-[7], en donde el residuo de aminoácido cuya carga se modifica es un residuo de aminoácido presente en la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera;

[9] El método de acuerdo con [8], en donde el anticuerpo anti-glipican 3 comprende una región de determinación de

complementariedad (CDR) derivada de un animal no humano, una región de estructura (FR) derivada de humano, y una región constante derivada de humano, y en donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante la sustitución de al menos un residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie del anticuerpo en el CDR o FR del anticuerpo con un residuo de aminoácido que tiene una carga diferente de aquella del residuo de aminoácido;

[10] El método de acuerdo con [9], en donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante:

(1) por lo menos una sustitución en la región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 1 seleccionada de:

(a) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 43 con K,

(b) sustitución de D que es el residuo de aminoácido número 52 con N, y

(c) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 107 con R;

y/o

(2) al menos una sustitución en la región de cadena variable ligera mostrada en la SEQ ID NO: 7 seleccionada de:

(d) sustitución de E que es el residuo de aminoácido número 17 con Q,

(e) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 27 con R, y

(f) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 105 con R;

[11] El método de acuerdo con [9], en donde la modificación en la carga del residuo aminoácido se logra mediante:

(1) al menos una sustitución en la región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 1 seleccionada de:

(a) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 19 con T,

(b) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 43 con E,

(c) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 62 con E,

(d) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 63 con S,

(e) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 65 con Q, y

(f) sustitución de G que es el residuo de aminoácido número 66 con D;

y/o

(2) al menos una sustitución en la región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO:7 seleccionada de:

(g) sustitución de R que es el residuo de aminoácido número 24 con Q,

(h) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número

27 con E,

(i) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 79 con T,

(j) sustitución de R que es el residuo de aminoácido número 82 con S, y

(k) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 112 con E;

[12] El método de acuerdo con [11], que comprende además al menos una modificación en la región constante de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 31 seleccionada de:

(a) sustitución de H que es el residuo de aminoácido número 151 con Q,

(b) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 157 con Q,

(c) sustitución de R que es el residuo de aminoácido número 238 con Q,

(d) sustitución de D que es el residuo de aminoácido número 239 con E,

(e) sustitución de L que es el residuo de aminoácido número 241 con M, y

(f) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 302 con E;

[13] El método de acuerdo con [9]-[12], en donde el anticuerpo anti-glipican 3 tiene un contenido reducido de fucosa unido a la región Fc del anticuerpo;

[14] Un anticuerpo anti-glipican 3 preparado mediante el método de acuerdo con [1]-[13];

[15] Un método para preparar un anticuerpo con las cinéticas de plasma moduladas, dicho método comprende las etapas de:

(a) cultivar una célula huésped que lleva un ácido nucleico que codifica el anticuerpo bajo condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico, en donde el anticuerpo tiene una secuencia de aminoácido alterada para originar una modificación en la carga de al menos un residuo de aminoácido en la región constante en el anticuerpo diferente de la región de unión FcRn; y

(b) recuperar el anticuerpo del cultivo de la célula huésped;

[16] El método de acuerdo con [15], en donde la modulación de las cinéticas del plasma es incrementar o disminuir en un parámetro seleccionado de la vida media del plasma, el tiempo medio de residencia del plasma, y la separación del plasma;

[17] El método de acuerdo con [15], en donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante la sustitución del aminoácido;

[18] El método de acuerdo con [17], en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG;

[19] El método de acuerdo con [18], en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1;

[20] El método de acuerdo con [17], en donde la modificación en la carga del residuo del aminoácido se logra mediante la sustitución de al menos un residuo de aminoácido de un anticuerpo IgG1 con un residuo de aminoácido correspondiente de un anticuerpo IgG4;

[21] El método de acuerdo con [15]-[20], en donde la región de unión FcRn comprende los residuos de aminoácido de los números EU 250, 253, 310, 311, 314, 428, 435, y 436 de acuerdo con la numeración Kabat;

[22] El método de acuerdo con [20], en donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante al menos una sustitución en la región constante de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:31 seleccionada de:

- (a) sustitución de H que es el residuo de aminoácido número 151 con Q,
- (b) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 157 con Q,
- (c) sustitución de R que es el residuo de aminoácido número 238 con Q,
- (d) sustitución de D que es el residuo de aminoácido número 239 con E,
- (e) sustitución de L que es el residuo de aminoácido número

241 con M, y

(f) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 302 con E;

[23] El método de acuerdo con [15]-[22], en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-glipican 3;

[24] Un método para estabilizar un anticuerpo anti-glipican 3 que comprende una región de determinación de complementariedad (CDR) derivada de un animal no humano, una región de estructura (FR) derivada del humano, y una región constante derivada de humano, dicho método comprende las etapas de:

(a) cultivar una célula huésped que lleva un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-glipican 3 bajo condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico, en donde el anticuerpo anti-glipican 3 tiene una secuencia de aminoácido alterada para incrementar en el valor T_m del anticuerpo mediante una modificación de al menos un residuo de aminoácido; y

(b) recuperar el anticuerpo del cultivo de la célula huésped;

[25] El método de acuerdo con [24], en donde el residuo de aminoácido está presente en la región FR1 y/o la región FR2 de cadena pesada o la cadena ligera;

[26] El método de acuerdo con [25], en donde un residuo de

aminoácido en la región FR2 de cadena pesada se sustituye con un residuo de aminoácido de la región FR2 de la subclase VH4;

[27] El método de acuerdo con [25], en donde un residuo de aminoácido en la región FR2 de la cadena ligera se sustituye con un residuo de aminoácido de la región FR2 de la subclase VK3;

[28] El método de acuerdo con [24]-[27], en donde la sustitución del residuo de aminoácido se logra mediante:

(1) al menos una sustitución en la región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:1 seleccionada de:

(a) sustitución de V que es el residuo de aminoácido número 37 con I,

(b) sustitución de A que es el residuo de aminoácido número 40 con P,

(c) sustitución de M que es el residuo de aminoácido número 48 con I, y

(d) sustitución de L que es el residuo de aminoácido número 51 con I;

y/o

(2) al menos una sustitución en la región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO:7 seleccionada de:

(e) sustitución de L que es el residuo de aminoácido número

42 con Q,

(f) sustitución de S que es el residuo de aminoácido número 48 con A, y

(g) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 50 con R;

[29] Un método para preparar un anticuerpo con citotoxicidad modulada, que comprende las etapas de:

(a) cultivar una célula huésped que lleva un ácido nucleico que codifica el anticuerpo bajo condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico, en donde el anticuerpo tiene una secuencia de aminoácido alterada que origina una modificación en la carga de al menos un residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie de un anticuerpo citotóxico; y

(b) recuperar el anticuerpo del cultivo de la célula huésped;

[30] El método de acuerdo con [29], en donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante la sustitución de aminoácido;

[31] El método de acuerdo con [29], en donde el residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie del anticuerpo se localiza en una región en el anticuerpo diferente de la región de unión FcRn;

[32] El método de acuerdo con [31], en donde la región de

unión FcRn comprende la región Fc;

[33] El método de acuerdo con [31], en donde la región de unión FcRn comprende los residuos de aminoácido de los números EU 250, 253, 310, 311, 314, 428, 435, 436 de acuerdo con la numeración Kabat;

[34] El método de acuerdo con [29], en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG;

[35] El método de acuerdo con [29]-[34], en donde el residuo de aminoácido cuya carga se modifica es un residuo de aminoácido presente en la región constante del anticuerpo.

[36] El método de acuerdo con [29]-[34], en donde el residuo de aminoácido cuya carga se modifica es un residuo de aminoácido presente en la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera del anticuerpo;

[37] El método de acuerdo con [36], en donde el anticuerpo es un anticuerpo que comprende una región de determinación de complementariedad (CDR) derivada de un animal no humano, una región de estructura (FR) derivada de humano, y una región constante derivada de humano y en donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante la sustitución de al menos un residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie del anticuerpo en el CDR o FR del anticuerpo con un residuo de aminoácido que tiene una carga

diferente de aquella del residuo de aminoácido;

[38] El método de acuerdo con [37], en donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante:

(1) al menos una sustitución en la región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:1 seleccionada de:

(a) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 19 con T,

(b) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 43 con E,

(c) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 62 con E,

(d) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 63 con S,

(e) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 65 con Q, y

(f) sustitución de G que es el residuo de aminoácido número 66 con D;

y/o,

(2) al menos una sustitución en la región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO:7 seleccionada de:

(g) sustitución de R que es el residuo de aminoácido número 24 con Q,

(h) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número

27 con E,

(i) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 79 con T,

(j) sustitución de R que es el residuo de aminoácido número 82 con S, y

(k) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 112 con E;

[39] El método de acuerdo con [38], que comprende además al menos una sustitución en la región constante de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 31 seleccionada de:

(a) sustitución de H que es el residuo de aminoácido número 151 con Q,

(b) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 157 con Q,

(c) sustitución de R que es el residuo de aminoácido número 238 con Q,

(d) sustitución de D que es el residuo de aminoácido número 239 con E,

(e) sustitución de L que es el residuo de aminoácido número 241 con M, y

(f) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 302 con E;

[40] El método de acuerdo con [36] en donde, el anticuerpo comprende una región de determinación de complementariedad (CDR) derivada de un animal no humano, una región de

estructura (FR) derivada de humano, y una región constante derivada de humano y en donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante la sustitución de al menos un residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie del anticuerpo en la región constante del anticuerpo con un residuo de aminoácido que tiene una carga diferente de aquella del residuo de aminoácido;

[41] El método de acuerdo con [40], en donde la sustitución es al menos una sustitución en la región constante de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 31 seleccionada de:

- (a) sustitución de H que es el residuo de aminoácido número 151 con Q,
- (b) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 157 con Q,
- (c) sustitución de R que es el residuo de aminoácido número 238 con Q,
- (d) sustitución de D que es el residuo de aminoácido número 239 con E,
- (e) sustitución de L que es el residuo de aminoácido número 241 con M, y
- (f) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 302 con E;

[42] El método de acuerdo con [37]-[41], en donde el anticuerpo tiene un contenido reducido de fucosa unido a la región Fc del anticuerpo;

[43] Un anticuerpo preparado mediante el método de acuerdo con [29]-[42];

[44] El anticuerpo de acuerdo con [43], en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-glipican 3;

[45] Un anticuerpo que comprende:

(1) una región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:1 en la cual la secuencia de aminoácido comprende al menos una sustitución seleccionada de:

(a) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 19 con T,

(b) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 43 con E,

(c) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 62 con E,

(d) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 63 con S,

(e) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 65 con Q, y

(f) sustitución de G que es el residuo de aminoácido número 66 con D;

y/o,

(2) una región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO:7 en la cual la secuencia de aminoácido comprende al

menos una sustitución seleccionada de:

(g) sustitución de R que es el residuo de aminoácido número 24 con Q,

(h) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 27 con E,

(i) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 79 con T,

(j) sustitución de R que es el residuo de aminoácido número 82 con S, y

(k) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 112 con E;

[46] El anticuerpo de acuerdo con [45], que comprende la cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:3 y la cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO:9;

[47] El anticuerpo de acuerdo con [45], que comprende la cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:5 y la cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO:11;

[48] El anticuerpo de acuerdo con [45] que comprende una región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:27 y una región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO:28;

[49] El anticuerpo de acuerdo con [45] que comprende una región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:27

y una región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO:29;

[50] El anticuerpo de acuerdo con [45]-[49] comprende una región constante de un anticuerpo humano;

[51] El anticuerpo de acuerdo con [50], en donde la región constante comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO:32 o la SEQ ID NO:33;

[52] Un anticuerpo que comprende:

(1) una región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:1 en la cual la secuencia de aminoácido comprende al menos una sustitución seleccionada de:

(a) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 43 con K,

(b) sustitución de D que es el residuo de aminoácido número 52 con R,

(c) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 107 con R;

y

(2) una región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO:7 en la cual la secuencia de aminoácido comprende al menos una sustitución seleccionada de:

- (d) sustitución de E que es el residuo de aminoácido número 17 con Q,
- (e) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 27 con R, y
- (f) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 105 con R;

[53] El anticuerpo de acuerdo con [52], que comprende la región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:4 y la región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO:10;

[54] El anticuerpo de acuerdo con [52], que comprende la región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:6 y la región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO:12;

[55] El anticuerpo de acuerdo con [52]-[54] comprende una región constante de un anticuerpo humano;

[56] Un anticuerpo que comprende al menos una sustitución en la secuencia de aminoácido de la región constante de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:31 seleccionada de:

- (a) sustitución de H que es el residuo de aminoácido número 151 con Q,
- (b) sustitución de K que es el residuo de aminoácido número 157 con Q,
- (c) sustitución de R que es el residuo de aminoácido número

238 con Q,

(d) sustitución de D que es el residuo de aminoácido número 239 con E,

(e) sustitución de L que es el residuo de aminoácido número 241 con M, y

(f) sustitución de Q que es el residuo de aminoácido número 302 con E;

[57] Un anticuerpo que comprende una región constante de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:33;

[58] El anticuerpo de acuerdo con [45]-[57], en donde el anticuerpo tiene un contenido reducido de fucosa unido a la región Fc del anticuerpo;

[59] Una composición que comprende el anticuerpo de acuerdo con [45]-[58] y un portador farmacéuticamente aceptable.

[60] Un agente antineoplásico que comprende como un componente efectivo el anticuerpo de acuerdo con [45]-[58];

[61] El agente antineoplásico de acuerdo con [60], en donde el cáncer es un cáncer de hígado;

[62] Un ácido nucleico que codifica un polipéptido del anticuerpo de acuerdo con [45]-[58];

[63] Una célula huésped que comprende un ácido nucleico de

acuerdo con [62];

[64] La célula huésped de acuerdo con [63], en donde la célula huésped es una célula de animal deficiente en transportador fucosa, una célula de animal a la que se le ha suprimido la fucosiltransferasa, o una célula animal en la cual el complejo de modificación de la cadena de azúcar ramificada se modifica;

[65] Un método para preparar un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con [63] o [64] y recuperar un polipéptido del cultivo celular.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una gráfica obtenida de la medición calorimétrica de exploración diferencial (DSC) del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2);

La Figura 2 es un electroforetograma del anticuerpo H0L0 y el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2) en una electroforesis isoeléctrica pI alta, en donde los carriles 1 y 4 muestran los marcadores pI, el carril 2 muestra el anticuerpo H0L0, y el carril 3 muestra el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), donde los valores numéricos muestran los valores de las moléculas marcadoras pI y las flechas muestran las movilidades electroforéticas de las correspondientes moléculas marcadoras pI;

La Figura 3 es un electroforetograma del anticuerpo H0L0 y el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) en una electroforesis isoeléctrica pI baja, en donde los carriles 1 y 4 muestran los marcadores pI, el carril 2 muestra el anticuerpo H0L0, y el carril 3 muestra el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6), donde los valores numéricos muestra los valores pI de las moléculas marcadoras pI y las flechas muestran las movilidades electroforéticas de las correspondientes moléculas marcadoras pI;

La Figura 4 es una diagrama que muestra la afinidad de unión del anticuerpo H15L4 y el anticuerpo H0L0 para el antígeno glipican 3 en un ELISA competitivo, en donde el diamante negro se refiere a la afinidad de unión del anticuerpo H0L0 y el cuadrado gris se refiere a la afinidad de unión del anticuerpo H15L4;

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

La Figura 6 es un diagrama que muestra la afinidad de unión del anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) y el

anticuerpo H0L0 para el antígeno glipican 3 en ELISA competitivo, en donde el diamante negro se refiere a la afinidad de unión del anticuerpo H0L0 y el cuadrado gris se refiere a la afinidad de unión del anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6);

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

La Figura 7A muestra la actividad antitumoral en el modelo de ratón de trasplante de cáncer de hígado humano del anticuerpo H0L0, el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), y el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) cuando cada anticuerpo de prueba se administra al modelo en una dosis de 5 mg/kg, en donde el diamante negro muestra la actividad para la administración del vehículo, el triangulo negro muestra el efecto de la administración del anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6), el círculo blanco muestra el efecto de la administración del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), y el cuadrado negro muestra el efecto de la administración del anticuerpo H0L0;

La Figura 7B muestra la actividad antitumoral en el modelo de ratón de trasplante de cáncer de hígado humano del anticuerpo H0L0, el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), y el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) cuando cada

anticuerpo de prueba se administra al modelo a una dosis de 1 mg/kg, en donde el diamante negro muestra la actividad de la administración del vehículo, el triángulo negro muestra el efecto de la administración del anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6), y el círculo blanco muestra el efecto de la administración del el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), y el cuadrado negro muestra el efecto de la administración del anticuerpo H0L0;

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

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

La Figura 8B muestra la concentración del anticuerpo

sanguíneo en un modelo de ratón de trasplante de cáncer de hígado humano, del anticuerpo H0L0, el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), y el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) cuando cada anticuerpo de prueba se administra al modelo en una dosis de 1 mg/kg, en donde el triángulo negro muestra la concentración sanguínea del anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6), el círculo blanco la concentración sanguínea del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), y el cuadrado negro muestra la concentración sanguínea del anticuerpo H0L0; y

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

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

actividad de unión del anticuerpo pH7pL16.

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

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

La Figura 13 muestra la actividad ADCC mediante el anticuerpo H0L0, el anticuerpo Hd1.8Ld1.6, el anticuerpo pH7pL14, y el anticuerpo pH7pL16 contra las células HepG2, una estirpe celular de cáncer de hígado humano, en donde el círculo negro muestra la actividad ADCC mediante el

anticuerpo H0L0, el círculo blanco la actividad ADCC mediante el anticuerpo Hd1.8Ld1.6, el cuadrado negro la actividad ADCC mediante el anticuerpo pH7pL14, y el cuadrado blanco la actividad ADCC mediante el anticuerpo pH7pL16.

La Figura 14 muestra la afinidad de unión por el antígeno glipican 3 medido mediante ELISA competitivo del anticuerpo H0L0, el anticuerpo H0M85L0, el anticuerpo pH7pL16 y el anticuerpo pH7M85pL16, en donde el triangulo negro muestra la actividad de unión del anticuerpo H0L0, el cuadrado negro muestra la actividad de unión del anticuerpo H0M85L0, el asterisco muestra la actividad de unión del anticuerpo pH7pL16, y el diamante blanco muestra la actividad de unión del anticuerpo pH7M85pL16.

La Figura 15 muestra la actividad ADCC mediante el anticuerpo pH7pL16 y el anticuerpo pH7M85pL16 contra las células HepG2, una estirpe celular de cáncer de hígado humano, en donde el cuadrado blanco muestra la actividad ADCC mediante el anticuerpo pH7pL16, y el triangulo negro muestra la actividad ADCC mediante el anticuerpo pH7M85pL16.

DESCRIPCIÓN DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

La presente invención suministra un método de modular las cinéticas del plasma de un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3). En una modalidad preferida de la presente invención, el método comprende la modificación en la

carga de al menos un residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3). Esto es, las cinéticas del plasma del anticuerpo (por ejemplo, anti-glipican 3) se puede modular al modificar la carga de un residuo de aminoácido en el anticuerpo para originar un cambio en el punto isoeléctrico (pI) de éste. El anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) que tiene las cinéticas de plasma moduladas es capaz de exhibir una actividad antitumoral sobre las células de cáncer que sea superior a aquella del anticuerpo no modulado.

Entre los varios isotipos de anticuerpo, las sendas metabólicas principales del anticuerpo IgG no proceden por vía de excreción renal debido al peso molecular suficientemente alto del anticuerpo IgG. El anticuerpo IgG, que contiene la región Fc como parte de su molécula, es conocida por tener una vida media in vivo larga debido al reciclamiento mediante una senda salvaje mediada por el receptor Fc neonatal (FcRn), que se expresa mediante las células endoteliales en, por ejemplo, el sistema vascular. Se cree que el anticuerpo IgG se metaboliza principalmente mediante las sendas metabólicas en células endoteliales (He, X. Y., Xu Z., Melrose J., Mullowney A., Vasquez M., Queen C., Vexler V., Klingbeil C., Co M. S., y Berg E. L., Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin, *J. Immunol.* (1998), 160(2), 1029-35). Esto es, se cree que el anticuerpo IgG se

recicla a través de la unión al FcRn del anticuerpo IgG no específicamente tomado mediante la célula endotelial, mientras que el anticuerpo IgG que no se puede unir se metaboliza. El anticuerpo IgG que tiene la región Fc modificada para disminuir la actividad de unión al FcRn exhibe una vida media más corta en la sangre. En contraste, la vida media del plasma del anticuerpo IgG se puede incrementar al modificar los residuos de aminoácido que constituyen la región Fc del anticuerpo IgG con el fin de incrementar la actividad de unión del FcRn (He, X. Y., Xu Z., Melrose J., Mullowney A., Vasquez M., Queen C., Vexler V., Klingbeil C., Co M. S., y Berg E. L., Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin, *J. Immunol.* (1998), 160(2), 1029-35); y LinksOber RJ, Radu CG, Ghetie V, Ward ES. Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int Immunol.* (2001) 13(12), 1551-9). Como se describió anteriormente, los métodos conocidos para modular las cinéticas del plasma del anticuerpo IgG involucrado en la modificación de la actividad de unión al FcRn mediante la modificación de los residuos de aminoácido que constituyen la región Fc. Ejemplos específicos de los residuos de aminoácido anteriores incluyen los residuos de aminoácido H250, H253, H310, H311, H314, H428, H435 y H436, de acuerdo con la numeración Kabat. Además, los residuos de aminoácido H254, H255, H257, H288, H296, H307, H309, H315, H415, H433, que involucran indirectamente la interacción entre los anticuerpos IgG y el FcRn, se creía que

eran el objetivo para la modificación. Estos residuos de aminoácido corresponden a, por ejemplo, los residuos de aminoácido 130, 133, 190, 191, 194, 308, 315 y 316, y los residuos de aminoácido 134, 135, 137, 168, 176, 187, 189, 195, 295 y 313 en la SEQ ID NO: 30, así como también los residuos de aminoácido 133, 136, 193, 194, 197, 311, 318 y 319 y los residuos de aminoácido 137, 138, 140, 171, 179, 190, 192, 198, 298 y 316 en la SEQ ID NO:31, respectivamente. Sin embargo, como se muestra en los ejemplos suministrados adelante, se ha encontrado ahora por medio de la presente invención que la vida media del plasma de un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) depende del pI con una correlación alta. Así, se muestra ahora entonces que la vida media del plasma del anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo anti-glipican 3) se puede modular sin modificar los residuos de aminoácido que constituyen la región de unión FcRn, cuya modificación invocaría la inmunogenicidad, en particular los residuos de aminoácido H250, H253, H310, H311, H314, H428, H435 y H436, así como también H254, H255, H257, H288, H296, H307, H309, H315, H415 y H433 de acuerdo con la numeración Kabat. También fue un resultado sorprendente que la modificación en los residuos de aminoácido diferentes del H250, H253, H310, H311, H314, H428, H435 y H436, así como también H254, H255, H257, H288, H296, H307, H309, H315, H415 y H433 exhibieran una disminución en el valor pI y cambiaron en la actividad de unión a FcRn.

Aunque no se quiere estar ligado a ninguna teoría

particular, los actuales inventores mantienen la siguiente visión actualmente. La tasa de toma no específica del anticuerpo IgG mediante las células endoteliales se cree que depende en la interacción fisicoquímica Coulómbica entre el anticuerpo IgG y la superficie celular negativamente cargada. Por lo tanto se cree que esa disminución (incremento) en la interacción Coulómbica al disminuir (elevar) el pI del anticuerpo puede causar la disminución (incremento) en la toma no específica mediante la célula endotelial, que a su vez originar disminución (incremento) en el metabolismo de la célula endotelial que resulta en la modulación de las cinéticas sanguíneas. Como se utiliza aquí, "disminuir la interacción Coulómbica" significa un incremento en el adelanto Coulómbico como se expresa en la fuerza repulsiva. En razón a que la interacción Coulómbica entre el anticuerpo y la carga negativa de la superficie celular de la célula endotelial es una interacción fisicoquímica, se cree que esta interacción no depende principalmente de la secuencia de aminoácido per se que constituye el anticuerpo. Por lo tanto, el método para modular las cinéticas del plasma descubierto en la presente invención se puede aplicar ampliamente a cualquiera de los anticuerpos o los anticuerpos anti-glipican 3 pero no limitados a solamente un anticuerpo específico o un anticuerpo anti-glipican 3.

Cuando un anticuerpo IgG se utiliza como el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de la presente invención, cualquier subtipo se puede utilizar en tanto que

éste sea una molécula del anticuerpo tipo IgG. También se puede utilizar un anticuerpo IgG biespecífico. Cuando el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de la presente invención es un anticuerpo biespecífico, el anticuerpo también se puede unir específicamente tanto al antígeno correspondiente (molécula de glipican 3 en el caso del anticuerpo anti-glipican 3) y un epítipo diferente de ese antígeno. Por ejemplo, con el fin de reclutar las células NK, las células T citotóxicas, las células LAK, y así sucesivamente, un antígeno de superficie que se une específicamente a estas células se puede utilizar adecuadamente como otro antígeno. Se ha mostrado que la citotoxicidad por las células LAK se exhibe contra el cáncer de ducto biliar utilizando un anticuerpo biespecífico producido del anticuerpo MUSE11 que reconoce el MUC1 (un antígeno relacionado con adenocarcinoma), y el anticuerpo OKT3, reconoce el antígeno de superficie de la célula LAK (Katayose Y., Kudo T., Suzuki M., Shinoda M., Saijyo S., Sakurai N., Saeki H., Fukuhara K., Imai K., y Matsuno S., MUC1-specific targeting immunotherapy with bispecific antibodies: inhibition of xenografted human bile duct carcinoma growth, *Cancer Res.* (1996) 56(18), 4205-12). El anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) que tiene las cinéticas de plasma mejoradas de la presente invención se puede utilizar adecuadamente en lugar del anticuerpo MUSE11 que reconoce MUC1. Además, el anticuerpo que reconoce diferentes epítopos del antígeno al cual se une el anticuerpo (molécula de glipican 3 en el caso del

anticuerpo anti-glipican 3) también se puede utilizar adecuadamente como el anticuerpo biespecífico (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de la presente invención. En el caso de anticuerpos de bajo peso molecular para los cuales la excreción renal es la senda metabólica principal, tal como el scFv y Fab, las cinéticas del plasma de tales anticuerpos pueden no ser moduladas mediante el pI como se describió anteriormente. Sin embargo, la presente invención se puede aplicar a cualquier tipo de molécula de anticuerpo si ésta es una proteína acoplada a Fc para lo cual la excreción renal no es la senda metabólica principal. Ejemplos de tales moléculas incluyen las proteínas de fusión scFv-Fc, dAb-Fc y Fc. En razón a que la senda metabólica principal de estas moléculas no es por vía del metabolismo mediante excreción renal, las cinéticas del plasma de estas moléculas se pueden modular al cambiar el pI de acuerdo con el método de la presente invención. Las moléculas similares a anticuerpo están incluidas en las moléculas de anticuerpo previstas por la invención. Las moléculas similares a anticuerpo son moléculas que funcionan mediante la unión a una molécula objetivo (Binz H. K., Amstutz P., y Pluckthun A., Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains, *Nat. Biotechnol.* (2005) 23(10), 1257-68); y ejemplos incluyen DARPins, Affibody, y Avimer.

El término "cinéticas de plasma moduladas" como se utiliza aquí significa que las cinéticas del plasma se modifican en una dirección deseada cuando las cinéticas del

plasma del anticuerpo después de la modificación de los aminoácidos que constituyen el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) se comparan con las cinéticas del plasma antes de la modificación. Así, cuando se desea incrementar la vida media del plasma del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3), "modulación de las cinéticas del plasma" se refiere a un incremento en la vida media del plasma del anticuerpo. Cuando se desea disminuir la vida media del plasma del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3), "modulación de las cinéticas del plasma" se refiere a la disminución en la vida media del plasma del anticuerpo.

Si la cinética del plasma del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de la presente invención se ha modificado en la dirección deseada, esto es, si la cinética del plasma se ha modulado como se desea, se puede evaluar apropiadamente al utilizar pruebas farmacocinéticas, por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, mono, y así sucesivamente. Además una "extensión de la vida media del plasma" o una "disminución de la vida media del plasma" como se utiliza aquí también puede ser comprendida por vía de parámetros diferentes del parámetro de la vida media del plasma, tal como el tiempo medio de residencia del plasma y la separación del plasma (Analysis by Pharmacokinetic Practice, (Nanzando)). Por ejemplo, la "modulación de la cinética del plasma" de acuerdo con la presente invención se puede evaluar adecuadamente con estos parámetros al llevar a

cabo análisis no compartimental de acuerdo con las instrucciones que acompañan WinNonlin (Pharsight) en un software de análisis farmacocinético in vivo.

La frase "residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie" como se utiliza aquí denota en general un residuo de aminoácido que reside sobre la superficie del polipéptido que constituye el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3). La frase "residuo de aminoácido que reside sobre la superficie del polipéptido" se refiere a un residuo de aminoácido cuya cadena lateral puede entrar en contacto con moléculas de disolvente (típicamente moléculas de agua). Todas sus cadenas laterales no necesitan entrar en contacto con las moléculas de disolvente. Si aún una porción de la cadena lateral del residuo de aminoácido entra en contacto con moléculas del disolvente, tal residuo de aminoácido se considera que es un residuo de aminoácido que reside sobre la superficie. Aquellos expertos en la técnica pueden construir un modelo de homología del polipéptido o anticuerpo utilizando software de modelamiento de homología comercialmente disponible. Con base en este modelo de homología, los residuos de aminoácido sobre la superficie del polipéptido que constituyen el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) se pueden seleccionar apropiadamente como un "residuo de aminoácido que reside sobre la superficie del polipéptido".

El "residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la

superficie" no está particularmente limitado en la presente invención, pero es preferiblemente un residuo de aminoácido que reside por fuera de la región de unión FcRn del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3). La región de unión FcRn es preferiblemente la región Fc, pero también incluye, por ejemplo, una región que consiste de uno o más residuos de aminoácido H250, H253, H310, H311, H314, H428, H435 y H436 de acuerdo con la numeración Kabat. Además los residuos de aminoácido H254, H255, H257, H288, H296, H307, H309, H315, H415, H433, que involucra indirectamente las interacciones entre los anticuerpos IgG y FcRn, se creyeron que eran el objetivo para la modificación. Estos residuos de aminoácido corresponden a, por ejemplo, los residuos de aminoácido 130, 133, 190, 191, 194, 308, 315 y 316, y los residuos de aminoácido 134, 135, 137, 168, 176, 187, 189, 195, 295 y 313 en la SEQ ID NO:30, así como los residuos de aminoácido 133, 136, 193, 194, 197, 311, 318 y 319 y los residuos de aminoácido 137, 138, 140, 171, 179, 190, 192, 198, 298 y 316 en la SEQ ID NO: 31, respectivamente.

El residuo de aminoácido que se va a someter a la modificación de carga en el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo anti-glipican 3) de acuerdo con la presente invención es preferiblemente un residuo de aminoácido que constituye la región variable de cadena pesada (cadena H) o la región variable de cadena ligera (cadena L) del anticuerpo. Los ejemplos preferidos específicos de estas

regiones variables son la región de determinación de complementariedad (CDR) y la región de estructura (FR).

Aquellos expertos en la técnica pueden seleccionar apropiadamente un residuo de aminoácido de superficie en la región variable del anticuerpo con base en un modelo de homología construido mediante modelamiento de homología. Así, un residuo de aminoácido de superficie en la región variable del anticuerpo se puede seleccionar adecuadamente de H1, H3, H5, H8, H10, H12, H13, H15, H16, H19, H23, H25, H26, H39, H42, H43, H44, H46, H68, H71, H72, H73, H75, H76, H81, H82b, H83, H85, H86, H105, H108, H110, y H112, que son residuos de aminoácido de acuerdo con la numeración Kabat. Por ejemplo, en el FR de cadena pesada de anticuerpo anti-glipican 3 humanizado mostrada en la SEQ ID NO:1, los residuos de aminoácido pueden incluir, pero no se limitan a, los residuos de aminoácido en las posiciones 1, 3, 5, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 19, 23, 25, 26, 39, 42, 43, 44, 46, 69, 72, 73, 74, 76, 77, 82, 85, 87, 89, 90, 107, 110, 112, y 114. Un residuo de aminoácido de superficie en el CDR de cadena pesada también se puede seleccionar utilizando el mismo modelo de homología. Así, H97, un residuo de aminoácido de acuerdo con la numeración Kabat, se expone en la superficie para casi todos los anticuerpos. Por ejemplo, la serina en la posición 101 en el CDR de cadena pesada del anticuerpo anti-glipican 3 humanizado mostrado en la SEQ ID NO:1 corresponde a aquel residuo de aminoácido. Ejemplos adecuados de otros residuos de aminoácido en el CDR de cadena pesada del anticuerpo anti-

glipican 3 humanizado mostrado en la SEQ ID NO:1 son los residuos de aminoácido en las posiciones 52, 54, 62, 63, 65, y 66.

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

El término "modificación" en un residuo de aminoácido en el método de la presente invención denota específicamente,

entre otros, sustitución de un residuo de aminoácido original con otro residuo de aminoácido, supresión de un residuo de aminoácido original, y adición de un nuevo residuo de aminoácido, y preferiblemente indica la sustitución de un residuo de aminoácido original con otro residuo de aminoácido. Así, la "modificación en la carga de un residuo de aminoácido" en la presente invención es preferiblemente una sustitución de aminoácido.

Con el fin de llevar a cabo la "modificación en la carga de un residuo de aminoácido" sobre el anticuerpo anti-glipican 3 de la presente invención, por ejemplo, la carga se modifica preferiblemente para al menos un residuo de aminoácido seleccionado de los residuos de aminoácido en las posiciones 19, 43, 52, 54, 62, 63, 65, 66, y 107 en la región variable de cadena pesada que constituye el anticuerpo anti-glipican 3 humanizado mostrado en la SEQ ID NO:1. Además, la carga se modifica preferiblemente, por ejemplo, para al menos un residuo de aminoácido seleccionado de los residuos de aminoácido en las posiciones 17, 24, 27, 33, 55, 59, 79, 82, 105 y 112 en la región variable de cadena ligera que constituye el anticuerpo anti-glipican 3 humanizado mostrado en la SEQ ID NO:7. Entre los residuos de aminoácido listados anteriormente, los residuos de aminoácido diferentes de aquellos modificados en su carga no necesitan modificarse en tanto que el efecto modulador deseado sobre las cinéticas del plasma se está obteniendo; sin embargo, tales residuos de aminoácido se pueden modificar convencionalmente con el fin

de no tener carga o de tener el mismo tipo de carga que el o los residuos de aminoácido modificados.

Los aminoácidos que llevan la carga se conocen por estar presentes. En general, la lisina (K), arginina (R), e histidina (H) se conocen como aminoácidos cargados positivamente. El ácido aspártico (D) y el ácido glutámico (E) se conocen como aminoácidos cargados negativamente. Los aminoácidos diferentes de estos se conocen como los aminoácidos no cargados.

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

- (a) ácido glutámico (E), ácido aspártico (D)
- (b) lisina (K), arginina (R), e histidina (H) cuando el residuo de aminoácido original (pre-modificación) ya lleva una carga, la modificación con el fin de suministrar un residuo de aminoácido no cargado también es una modalidad preferida de la presente invención. Así, la modificación en la presente invención comprende (1) la sustitución de un aminoácido cargado con un aminoácido no cargado, (2) la sustitución de un aminoácido cargado con un aminoácido que lleva una carga opuesta, y (3) la sustitución de un aminoácido no cargado con un aminoácido cargado.

Modificación de un residuo de aminoácido que constituye el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) con el fin de cambiar el punto isoeléctrico (pI) del anticuerpo se prefiere para la presente invención. Además, en aquellos casos donde la pluralidad de los residuos de aminoácido se modificará, los residuos de aminoácido sometidos a la modificación pueden incluir un número pequeño de residuos de aminoácido no cargados.

Ejemplos adecuados de la "modificación en la carga de un residuo de aminoácido" en el anticuerpo anti-glipican 3 de la presente invención son como sigue. Con relación a una modificación que incrementa el valor pI, por ejemplo, en al menos una sustitución seleccionada de Q43K, D52N, y Q107R en la región variable de cadena pesada que constituye el anticuerpo anti-glipican 3 humanizado mostrado en la SEQ ID NO:1 se puede hacer, y una modificación a la secuencia de aminoácido mostrada en la SEQ ID NO:4 o 6 se prefiere particularmente. Además, por ejemplo, al menos una sustitución seleccionada del E17Q, Q27R, y Q105R en la región variable de cadena ligera constituye el anticuerpo anti-glipican 3 humanizado mostrado en la SEQ ID NO:7 se puede utilizar, y una modificación a la secuencia de aminoácido mostrada en la SEQ ID NO:10 o 12 se prefiere particularmente. Con relación, de otra parte, a la modificación que disminuye el valor pI, al menos se puede hacer una sustitución seleccionada de K19T, Q43E, G62E, K63S, K65Q, y G66D en la región variable de cadena pesada que constituye el anticuerpo

anti-glipican 3 humanizado mostrado en la SEQ ID NO:1, y se prefiere particularmente la modificación a la secuencia del aminoácido mostrada en la SEQ ID NO:3, 5 o 27. Además, por ejemplo, al menos se puede hacer una sustitución seleccionada del R24Q, Q27E, K79T, R82S y K112E en la región variable de cadena ligera constituye el anticuerpo anti-glipican 3 humanizado mostrado en la SEQ ID NO:7, y se prefiere particularmente la modificación a la secuencia de aminoácido mostrada en la SEQ ID NO:9, 11, 28 o 29. Además, la modificación que disminuye el valor pI también incluye la sustitución de uno o más residuos de aminoácido en la región constante de cadena pesada designada por H268, H274, H355, H356, H358 y H419 de acuerdo con la numeración Kabat. Ejemplos preferidos de sustitución es al menos una modificación en la región constante de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:31 incluye, por ejemplo, la sustitución de H que es el residuo del aminoácido número 151 con Q, la sustitución de K que es el residuo del aminoácido número 157 con Q, la sustitución de R que es el residuo del aminoácido número 238 con Q, la sustitución de D que es el residuo del aminoácido número 239 con E, la sustitución de L que es el residuo del aminoácido número 241 con M, y la sustitución de Q que es el residuo del aminoácido número 302 con E. La sustitución anterior resulta en una quimera de la región constante del IgG1 y la región constante del IgG4 de un anticuerpo humano. Así tal sustitución permite la preparación de un anticuerpo modificado con un valor pI deseado sin afectar la inmunogenicidad del anticuerpo.

No existen limitaciones particulares en la presente invención sobre el número de los residuos de aminoácido sometidos a modificación; cuando, por ejemplo, la región variable del anticuerpo se está modificando, preferiblemente el número más pequeño de residuos de aminoácido necesarios para lograr las cinéticas del plasma modulado deseadas se modifica, con el fin de evitar la disminución de la actividad de unión con el antígeno y con el fin de evitar elevar la inmunogenicidad. También puede ser adecuado implementar una combinación adecuada con una modificación del residuo de aminoácido que origina una declinación en la inmunogenicidad y/o una modificación del residuo de aminoácido que origina un incremento en la actividad de unión con el antígeno.

Se pueden utilizar técnicas conocidas para medir la actividad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, por ejemplo el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), el inmunoensayo de enzima (EIA), el radioinmunoensayo (RIA), o se puede utilizar un inmunoensayo fluorescente. Estos métodos se describen en un texto común, Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor laboratory, 1988.

Los métodos descritos en las páginas 359 a 420 de Antibodies: A Laboratory Manual, (Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor laboratory, 1988) son ejemplos de métodos que se pueden utilizar para medir la actividad de unión del anticuerpo para las células. La actividad de unión se puede

65

evaluar con base en los FACS (selección de célula fluorescente activada) o el principio de ELISA que utiliza las células como un antígeno. En el formato ELISA, la actividad de unión del anticuerpo para las células se evalúa cuantitativamente al comparar los niveles de señal generados mediante una reacción enzimática. Así, se agrega un anticuerpo de prueba a una placa ELISA sobre la cual las células que se sobre-expresan se han inmovilizado y el anticuerpo unido a las células se detecta mediante un anticuerpo marcado con enzima que reconoce el anticuerpo de prueba. En el caso de los FACS, la actividad de unión de las células se puede comparar al construir una serie de dilución del anticuerpo de prueba y comparar los títulos que se unen al anticuerpo para las células de sobre expresión.

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

En un ejemplo de un método adecuado para medir la actividad de unión de un anticuerpo anti-glipican 3 de prueba

a un antígeno, el anticuerpo de prueba se hace reaccionar con una célula que expresa glipican 3; las células se tiñen con un anticuerpo secundario marcado con FITC que reconoce el anticuerpo de prueba; la intensidad fluorescente se mide con FACSCalibur (BD); y se analiza utilizando software CELL QUEST (BD). De acuerdo con este método, el anticuerpo de prueba unido al glipican 3 sobre la superficie de las células que expresan glipican 3 se tiñe mediante un anticuerpo secundario marcado con FITC que reconoce específicamente el anticuerpo de prueba, y la intensidad fluorescente si se mide con FACSCalibur, entonces el valor medio geométrico (geo valor medio de prueba) obtenido mediante el análisis de la intensidad fluorescente se compara con el geo valor medio de control obtenido de un anticuerpo de control que utiliza el software CELL QUEST. Las fórmulas computacionales que producen el geo valor medio (medio geométrico) se describen en la guía de usuario del software CELL QUEST (BD Biosciences).

Con el fin de evitar incrementar la inmunogenicidad in vivo para el humano que recibe un anticuerpo, la secuencia de aminoácido modificada, pero no limitada a, una secuencia humana (secuencia vista en un anticuerpo de ocurrencia natural de origen humano). Además, las mutaciones se pueden introducir adecuadamente en sitios diferentes de las modificaciones introducidas para cambiar el punto isoeléctrico, con el fin de modificar cada una de la pluralidad de los FR (FR1, FR2, FR3, FR4) en una secuencia

humana. Un método que convierte cada uno de los FR en una secuencia humana de esta manera se reporta mediante Ono K., Ohtomo T., Yoshida K., Yoshimura Y., Kawai S., Koishihara Y., Ozaki S., Kosaka M., y Tsuchiya M., The humanized anti-HM1.24 antibody effectively kills multiple myeloma cells by human effector cell-mediated cytotoxicity. *Mol. Immunol.* (1999) 36(6), 387-395. Además, con el fin de cambiar el punto isoeléctrico del anticuerpo, cada una de las secuencias FR se puede convertir a otra secuencia FR humana con el fin de cambiar la carga de un FR particular (por ejemplo, el FR3 se puede intercambiar con otro FR humano con el fin de disminuir el punto isoeléctrico del anticuerpo). Tal método de humanización se reporta en Dall'Acqua W. F., Damschroder M. M., Zhang J., Woods R. M., Widjaja L., Yu J., y Wu H., Antibody humanization by framework shuffling, *Methods* (2005) 36(1), 43-60.

En aquellos casos donde las cinéticas del plasma moduladas deseadas no se logran mediante una modificación modesta de la carga de superficie, un anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo anti-glipican 3) que exhibe las cinéticas de plasma moduladas deseadas se puede obtener adecuadamente mediante la ejecución repetitiva de la modificación de carga de superficie y la evaluación de las cinéticas del plasma.

Las cinéticas del plasma de EP5C7.g4 quimérico, un anticuerpo anti-E quimérico, P-selectina (IgG4), se han comparado con aquellos del HuEP5C7.g4, un anticuerpo humanizado (IgG4), y

los dos se muestran por tener las mismas cinéticas de plasma en el mono resus (He, X. Y., Xu Z., Melrose J., Mullowney A., Vasquez M., Queen C., Vexler V., Klingbeil C., Co M. S., y Berg E. L., Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin, *J. Immunol.* (1998), 160(2), 1029-35). Además, las cinéticas del plasma del ch5d8, un anticuerpo anti-CD154 quimérico, se ha comparado con aquellos del anticuerpo humanizado Hu5c8 en el mono cinomolgus y los dos se muestran por tener las mismas cinéticas de plasma (Gobburu J. V., Tenhoor C., Rogge M. C., Frazier D. E. Jr., Thomas D., Benjamin C., Hess D. M., y Jusko W. J., Pharmacokinetics/dynamics of 5c8, a monoclonal antibody to CD154 (CD40 ligand) suppression of an immune response in monkeys, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1988) 286(2), 925-30). Las cinéticas del plasma del anticuerpo quimérico cCC49 muestran ser las mismas que aquellas del anticuerpo humanizado HuCC49 en ratones (Kashmiri S. V., Shu L., Padlan E. A., Milenic D. E., Schlom J., y Hand P. H., Generation, characterization, and in vivo studies of humanized anticarcinoma antibody CC49, *Hybridoma* (1995) 14(5), 461-73). Las cinéticas del plasma y la distribución del anticuerpo de ratón y el anticuerpo humanizado muestran ser las mismas en evaluaciones en ratones (Graves S. S., Goshorn S. C., Stone D. M., Axworthy D. B., Reno J. M., Bottino E., Searle S., Henry A., Pedersen J., Rees A. R., y Libby R. T., Molecular modeling and preclinical evaluation of the humanized NR-LU-13 antibody, *Clin. Cancer Res.* (1999) 5(4), 899-908; Couto J. R., Blank E. W., Peterson J. A., y Ceriani R. L., Anti-BA46

monoclonal antibody Mc3: Humanization using a novel positional consensus and in vivo and in vitro characterization, *Cancer Res.* (1995) 55(8) 1717-22). Se cree que las cinéticas del plasma y la distribución de los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos humanizados son las mismas debido al hecho de que el murino Fc y el Fc humano son ambos de reacción cruzada con el FcRn de murino. Como se muestra mediante estos ejemplos, las cinéticas del plasma son las mismas entre los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos humanizados que tienen el mismo CDR. Esto significa que la humanización mediante los métodos conocidos suministrados en Ghetie V., Popov S., Borvak J., Radu C., Matesoi D., Medesan C., Ober R. J., y Ward E. S., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis, *Nat. Biotechnol.* (1997) 15(7), 637-40 y así sucesivamente, puede suministrar las mismas cinéticas del plasma como el anticuerpo quimérico, y así un anticuerpo humanizado que tiene las cinéticas del plasma moduladas no puede producir por lo tanto mediante métodos conocidos.

En contraste, cuando un anticuerpo quimérico (por ejemplo, el anticuerpo anti-glipican 3) se humaniza de acuerdo con el método de la presente invención, el pI del anticuerpo se cambia mediante la modificación de un residuo de aminoácido que se pueda exponer sobre la superficie del anticuerpo quimérico para construir un anticuerpo humanizado (por ejemplo, el anticuerpo anti-glipican 3 humanizado) que exhibe cinéticas de plasma moduladas (es decir, un incremento o

disminución de su vida media de plasma) en comparación con el anticuerpo quimérico original. Para el propósito de modular las cinéticas del plasma, la modificación del aminoácido se puede exponer sobre la superficie del anticuerpo humanizado (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3 humanizado) se puede llevar a cabo al mismo tiempo que la humanización del anticuerpo, o el pI del anticuerpo humanizado se puede modificar mediante la modificación el aminoácido expuesto a superficie que inicia desde el anticuerpo humanizado (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3 humanizado).

Se ha establecido que el trastuzumab, bevacizumab, y pertuzumab, que son tres anticuerpos humanizados que se han humanizado utilizando la misma secuencia FR de anticuerpo humano, tienen aproximadamente las mismas cinéticas de plasma (Adams C. W., Allison D. E., Flagella K., Presta L., Clarke J., Dybdal N., McKeever K., y Sliwkowski M. K., Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab, *Cancer Immunol Immunother.* (2006) 55(6), 717-27). Así, las cinéticas del plasma son aproximadamente las mismas cuando los anticuerpos son la humanización utilizando la misma secuencia FR. De acuerdo con el método de la presente invención, las cinéticas del plasma del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) se pueden modular en la etapa de humanización donde el pI del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) se modifica al agregar una modificación a un residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la

superficie del anticuerpo.

El método de la presente invención también se puede aplicar a los anticuerpos humanos. Un anticuerpo humano (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) que tiene cinéticas de plasma moduladas con relación a las cinéticas de plasma del anticuerpo humano inicialmente preparado (es decir, un incremento o disminución en la vida media del plasma anterior) se puede construir mediante la modificación del pI del anticuerpo humano (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) al agregar una modificación a un residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie de un anticuerpo humano construido desde una biblioteca de anticuerpo, un ratón que produce anticuerpo humano, y así sucesivamente.

La vida media del plasma de un anticuerpo se incrementa al disminuir el valor pI del anticuerpo. En contraste, se conoce que la vida media del plasma disminuye y las características de translocación del tejido del anticuerpo se mejoran al elevar el valor pI del anticuerpo (Vaisitti T., Deaglio S., y Malavasi F., Cationization of monoclonal antibodies: another step towards the "magic bullet", *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* (2005) 19(3-4), 105-12; Pardridge W. M., Euciak J., Yang J., y Wu D., Enhanced endocytosis in cultured human breast carcinoma cells and in vivo biodistribution in rats of a humanized monoclonal antibody after cationization of the protein, *J Pharmacol Exp Ther.* (1998) 286(1), 548-54). Sin embargo, debido al hecho de que tal anticuerpo exhibe una

inmunogenicidad creciente y una internalización mejorada en la célula, las mejoras adicionales se requieren para la aplicación como un anticuerpo que exhibe un efecto anti-cáncer por vía de un mecanismo tal como la actividad citotóxica, porque la internalización en la célula es un impedimento a la manifestación de su actividad citotóxica, tal como la actividad ADCC, la actividad CDC, y así sucesivamente. Así, con relación al anticuerpo que exhibe un efecto anti-cáncer por vía de un mecanismo tal como la actividad citotóxica, donde la internalización hacia la célula es un impedimento a la manifestación de su actividad citotóxica, tal como la actividad ADCC, la actividad CDC, y así sucesivamente, no se ha determinado si un incremento en el valor pI de un anticuerpo o una reducción en el valor pI de un anticuerpo origina mejoramiento del efecto de inhibición tumoral. En la presente invención, se construyen el anticuerpo anti-glipican 3 humanizado modificado con un valor pI reducido y el anticuerpo anti-glipican 3 humanizado modificado con un valor pI incrementado, y entonces la pregunta de cuál modificación tiene la mayor actividad inhibitoria de tumor se examina al someter ambos anticuerpos a pruebas comparativas de efecto antitumoral. Como resultado, se muestra de manera sorprendente que el anticuerpo anti-glipican 3 humanizado con el valor pI reducido exhibe el mejor efecto contra el cáncer de hígado.

El término "anticuerpo anti-glipican 3" como se utiliza aquí comprende el anticuerpo anti-glipican 3 obtenido al someter

el anticuerpo anti-glipican 3 que ya se ha sometido a modificación de carga de residuo de aminoácido como se describió anteriormente, a la modificación adicional de su secuencia de aminoácido, por ejemplo, al someter los residuos de aminoácido que constituyen este anticuerpo anti-glipican 3 a sustitución, supresión, adición, y/o inserción. Además, el término "anticuerpo anti-glipican 3" como se utiliza aquí también comprende el anticuerpo anti-glipican 3 obtenido partiendo del anticuerpo anti-glipican 3 que ya se ha sometido a sustitución, supresión, adición, y/o inserción del residuo de aminoácido, o a la modificación de su secuencia de aminoácido mediante, por ejemplo, quimerización, humanización, y así sucesivamente, y sometiendo adicionalmente los residuos de aminoácido que constituyen este anticuerpo anti-glipican 3 a la modificación de carga.

Un ejemplo preferido de una modificación cuya meta es mejorar las características del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de la presente invención es una modificación cuya meta es elevar la estabilidad del anticuerpo (referida adelante como modificación de estabilidad). En su solución acuosa, el anticuerpo se equilibra entre dos estados, su estado natural y su estado desnaturalizado inactivo. La estabilidad del estado natural, como se muestra mediante la segunda ley de la termodinámica ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$), depende del cambio de energía libre Gibbs ΔG del sistema y el balance entre los componentes de ΔG , es decir, el cambio de la entalpía ΔH (atribuible al cambio en, por ejemplo, las

interacciones hidrófobas y el enlace de hidrógeno en la cadena de polipéptido) y el cambio de entropía ΔS (atribuible a cambios en la solvatación y los grados de libertad en la estructura tridimensional). Un valor positivo para ΔG indica que el estado natural de la proteína es más estable que el estado desnaturalizado de la proteína, y la estabilidad del estado natural de la proteína se eleva en la medida en que ΔG asume valores positivos mayores. Las fuerzas que contribuyen a esta estabilidad se deben afectar con el fin de desnaturalizar la proteína. Por ejemplo, exponer la solución de proteína a temperaturas altas da como resultado un incremento en los grados de libertad en la estructura tridimensional y el debilitamiento de los factores que contribuyen a la estabilización de la proteína, que origina la desnaturalización térmica de la proteína. En este caso el término $-T\Delta S$ gobierna la desnaturalización. El ΔH del no doblado debido a la desnaturalización térmica de la proteína se puede medir directamente mediante calorimetría de exploración diferencial (DSC), como se describe específicamente en los ejemplos suministrados aquí. La curva DSC el proceso de desnaturalización térmica de la proteína toma la forma de un pico endotérmico que encuadra una temperatura, conocida como el punto medio de desnaturalización (T_m), que es característico de la proteína de prueba. El cambio de entalpía de desnaturalización se obtiene mediante la integración de este pico. El valor T_m es generalmente un indicador de estabilidad térmica. El cambio en la capacidad de calor (ΔC_p) también se puede medir

utilizando la desnaturalización térmica de la proteína mediante DSC. El cambio en la capacidad del calor que ocurre durante la desnaturalización se origina principalmente por la hidratación que ocurre cuando los residuos de aminoácido que no están expuestos sobre la superficie de la molécula cuando la proteína está en su estado natural se exponen a moléculas disolventes durante el curso de la desnaturalización de la proteína.

Como se describió anteriormente, la "modificación" del residuo de aminoácido en el método de la presente invención comprende específicamente, entre otros, la sustitución de un residuo de aminoácido original con otro residuo de aminoácido, la supresión de un residuo de aminoácido original, y la adición de un nuevo residuo de aminoácido. Se prefiere la sustitución de un residuo de aminoácido original con otro residuo de aminoácido. Así, la modificación mediante la sustitución del aminoácido se utiliza preferiblemente en la presente invención cuando se solicita una modificación de la estabilidad del anticuerpo. El valor T_m del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) se incrementa como resultado de la ejecución de la modificación de estabilidad sobre los residuos de aminoácido que constituyen el anticuerpo. Así, el valor T_m se utiliza adecuadamente como un indicador de que la modificación de estabilidad del anticuerpo ha ocurrido (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3).

Con el fin de llevar a cabo la "modificación de estabilidad" anteriormente mencionada con el anticuerpo anti-glipican 3 de la presente invención, se lleva a cabo preferiblemente la modificación, por ejemplo, a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado de los residuos de aminoácido en las posiciones 37, 40, 48, y 51 en la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-glipican 3 humanizado mostrado en la SEQ ID NO:1. Además, la modificación se lleva a cabo preferiblemente sobre al menos un residuo de aminoácido seleccionado de los residuos de aminoácido en las posiciones 2, 25, 42, 48, 50, 83, y 84 en la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-glipican 3 humanizado mostrado en la SEQ ID NO:7. Los residuos de aminoácido diferentes de los residuos de aminoácido anteriormente mencionados sobre los cuales se ha llevado a cabo la modificación de estabilidad, no necesitan modificarse en tanto que el valor T_m deseado se obtenga; sin embargo, puede ser apropiado llevar a cabo una modificación adecuada sobre estos con el fin de suministrar un valor T_m que sea aproximadamente el mismo o mayor que el valor T_m del anticuerpo anti-glipican 3 humanizado sometido a la modificación.

La modificación de estabilidad se puede llevar a cabo al modificar aleatoriamente los residuos de aminoácido que constituyen el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) sometido a la modificación. Además, la modificación de estabilidad también se puede llevar a cabo al reemplazar una porción de la secuencia de aminoácido que

constituye el anticuerpo humanizado (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) sometido a la modificación, con una secuencia de aminoácido encontrada en el anticuerpo que ya tiene un valor T_m alto y que corresponde -desde el punto de vista de la correlación de la estructura tridimensional del anticuerpo - con dicha porción de la secuencia de aminoácido que constituye el anticuerpo humanizado (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3 humanizado) sometido a la modificación. No existen limitaciones sobre la posición del residuo o los residuos de aminoácido que sufren sustitución; sin embargo, el residuo o residuos de aminoácido se modifican preferiblemente en la FR. La modificación del residuo de aminoácido se puede llevar a cabo aún como apropiada en la región CDR en tanto que no existe una reducción asociada en la actividad de unión para el antígeno. Además, el número de residuos de aminoácido sometidos a la modificación no está particularmente limitado, y la modificación se puede implementar aún al reemplazar un segmento particular de la FR con un segmento deseado. Con relación a tales segmentos, todos los segmentos dentro de la FR (FR1, FR2, FR3, FR4) se pueden modificar, o se puede combinar una o más de la modificación de los segmentos.

La FR2 de cadena pesada o la cadena ligera es un ejemplo preferido en aquellos casos donde se modifica un segmento de la FR. Un ejemplo específico preferido a este respecto es una modificación del residuo de aminoácido en el cual la cadena pesada FR2 del anticuerpo anti-glipican 3 humanizado en la

subclase VH1b (mostrado en la SEQ ID NO:1) se modifica a la subclase VH4, es decir, V37I (valina en la posición 37 se reemplaza por isoleucina) así como también las modificaciones A40P, M48I, y L51I. Otros ejemplos específicos preferidos son la modificación de la región de cadena ligera FR2 del anticuerpo anti-glipican 3 humanizado en la subclase VK2 (mostrada en la SEQ ID NO:7) a la subclase VK3, es decir, las modificaciones L42Q, S48A, y Q50R. También se prefiere la modificación V2I, que corresponde a la modificación de la secuencia de la línea germinal para FR1.

La ejecución de la sustitución, supresión, adición, y/o inserción con respecto a los residuos de aminoácido que constituyen el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo anti-glipican 3) y la modificación de la secuencia de aminoácido mediante, por ejemplo, la quimerización y humanización, se pueden llevar a cabo según sea apropiado mediante cualquier método conocido por aquellos expertos en la técnica. La ejecución de la sustitución, supresión, adición, y/o inserción con respecto a los residuos de aminoácido que reconstituyen la región constante y la región variable del anticuerpo se pueden llevar a cabo similarmente según sea apropiado durante la construcción del anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo anti-glipican 3) de la presente invención como un anticuerpo recombinante.

Cualquiera de los anticuerpos de origen animal, por ejemplo, anticuerpo de ratón, anticuerpo humano, anticuerpo de rata,

anticuerpo de conejo, anticuerpo de cabra, anticuerpo de camello se pueden utilizar preferiblemente como el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de la presente invención. También se prefiere para uso un anticuerpo modificado (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) como se obtuvo mediante la sustitución en la secuencia de aminoácido del anticuerpo quimérico y el anticuerpo humanizado. También se prefiere para uso las modificaciones del anticuerpo en las cuales cualquiera de las varias moléculas está unida.

El "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo construido al combinar las secuencias que se originan desde diferentes animales. Ejemplos adecuados a este respecto son los anticuerpos construidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo de ratón y las regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo humano. Los métodos para construir los anticuerpos quiméricos se conocen. Por ejemplo, el ADN recombinante se genera mediante la fusión en estructura del ADN que codifica una región variable de anticuerpo de ratón y el ADN que codifica una región constante de anticuerpo humano, y se puede incorporar en un vector de expresión convencional. Una célula huésped transfectada o transformada con este vector se cultiva y el anticuerpo quimérico se puede preparar o aislar del medio de cultivo por medios apropiados.

Los anticuerpos humanizados también se conocen como anticuerpos humanos reformados. Estos son anticuerpos en los

cuales la región de determinación de complementariedad (CDR) de un anticuerpo aislado de un mamífero no humano, tal como ratón, está ligada a una región de estructura (FR) desde un anticuerpo humano. La secuencia de ADN que codifica el anticuerpo humanizado se puede sintetizar al traslapar la reacción de PCR utilizando una pluralidad de oligonucleótidos como cebadores. Los materiales y los procedimientos de partida para traslapar las reacciones de PCR se describen, por ejemplo, en la WO 98/13388 y en cualquier otra parte. El ADN que codifica la región variable de un anticuerpo humanizado de la presente invención se obtiene al traslapar la PCR desde una pluralidad de oligonucleótidos contruidos con el fin de tener secuencias de nucleótido que se traslapan una con la otra, que a su vez están ligadas con el ADN que codifica la región constante del anticuerpo humano con el fin de formar una secuencia de codón en estructura. El ADN ligado como se describió se inserta entonces de manera operable en un vector de expresión seguido mediante la transfección en un huésped.

Los métodos para identificar los CDR se conocen (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., *Nature* (1989) 342, 877). También se conocen los procedimientos de recombinación genética generales (se refieren a EP 125023 A y WO 96/02576). Una vez que se ha determinado la CDR proveniente de un anticuerpo de un animal no humano, por ejemplo, un anticuerpo de murino, estos

métodos conocidos se pueden utilizar para construir el ADN que codifica un anticuerpo recombinante en el cual la CDR y FR de un anticuerpo humano están ligados. Las FR de anticuerpo humano ligadas con las CDR se seleccionan de tal manera que la CDR forma un sitio de unión de antígeno de alta calidad. Según sea necesario, un residuo o residuos de aminoácido en las regiones FR variables de los anticuerpos se pueden modificar según sea apropiado con el fin de posibilitarle a la CDR del anticuerpo humano reformado formar un sitio de unión de antígeno adecuado (Sato et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-6). Los residuos de aminoácido en las FR sometidos a modificación pueden incluir residuos que están directamente unidos al antígeno mediante enlaces no covalentes (Amit et al., *Science* (1986) 233, 747-53), los residuos que influyen o actúan sobre la estructura CDR (Chothia et al., *J. Mol. Biol.* (1987) 196, 901-17), y los residuos relacionados con las interacciones VH-VL (región variable de cadena pesada - región variable de cadena ligera) (EP 239400 B).

El anticuerpo humanizado codificado por el ADN se produce mediante la célula huésped que se ha transformado o transfectado mediante el vector de expresión generalmente utilizado en el cual el ADN se inserta y se aísla del medio de cultivo producido entre el cultivo de la célula huésped.

Cuando el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo quimérico, el anticuerpo humanizado o el

anticuerpo humano, se prefiere utilizar una región constante del origen del anticuerpo humano como la región constante del anticuerpo. Por ejemplo, cuando el anticuerpo anti-glipican 3 de la presente invención es un anticuerpo anti-glipican 3 quimérico, un anticuerpo anti-glipican 3 humanizado o un anticuerpo anti-glipican 3 humano, se prefiere utilizar una región constante del origen del anticuerpo humano como la región constante del anticuerpo anti-glipican 3. Por ejemplo, Cy1, Cy2, Cy3, y Cy4 son cada uno adecuados para uso como la región constante de cadena pesada, mientras el Cκ y Cλ son cada uno adecuados para uso como la región constante de cadena ligera. Además, la región constante de anticuerpo humano se puede modificar según sea apropiado con el fin de mejorar el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) o mejorar la estabilidad de su producción. El anticuerpo quimérico (por ejemplo, el anticuerpo anti-glipican 3 quimérico) de la presente invención comprende adecuadamente una región variable de un anticuerpo de un mamífero no humano y una región constante de un anticuerpo humano. De otra parte, el anticuerpo humanizado comprende preferiblemente una CDR desde un anticuerpo de un mamífero no humano y una región constante y la FR de un anticuerpo humano. Por ejemplo, un anticuerpo anti-glipican 3 humanizado preferiblemente comprende una CDR de un anticuerpo anti-glipican 3 de un mamífero no humano y una región constante y FR de un anticuerpo humano. El anticuerpo humano comprende adecuadamente una CDR de un anticuerpo de origen humano y una región constante y FR de un anticuerpo humano. Por ejemplo,

el anticuerpo anti-glipican 3 humano comprende adecuadamente una CDR de un anticuerpo anti-glipican 3 de origen humano y una región constante y FR de un anticuerpo humano. La región constante del anticuerpo humano está compuesta de una secuencia de aminoácido que se caracteriza del isotipo particular, es decir, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA, IgD, e IgE. La región constante del anticuerpo que pertenece a cualquiera de estos isotipos se utiliza adecuadamente como la región constante del anticuerpo humanizado (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de la presente invención. Se prefiere el uso de la región constante del IgG humano, pero no se limita. Tampoco existen limitaciones particulares sobre el anticuerpo humano FR utilizado como la FR del anticuerpo humanizado (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3 humanizado) o el anticuerpo humano (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3 humano), y se utiliza adecuadamente la FR del anticuerpo que pertenezca a cualquier isotipo.

Con el objeto de disminuir la inmunogenicidad, todos o una porción de los residuos de aminoácido que constituyen la FR también se pueden reemplazar mediante las secuencias de línea germinal utilizando el método descrito en Ono K. et al., *loc. cit.*, o un método similar. Con base en la predicción racional de que las secuencias de línea germinal tendrán una inmunogenicidad baja, la secuencia del aminoácido que constituye la FR del anticuerpo humanizado se puede comparar, mediante alineamiento, con las secuencias del aminoácido de línea germinal (Abhinandan K. R. y Martin C. R., *J. Mol.*

Biol. (2007) 369, 852-862). Los residuos de aminoácido del anticuerpo humanizado FR que difieren en esta comparación se pueden reemplazar, dentro de un rango que no afecte las características de unión del antígeno, con los residuos de aminoácido de una secuencia de línea germinal. Los siguientes son ejemplos específicos para los residuos de aminoácido que constituyen la región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:1: modificación que reemplaza el L en la posición 70 con I, modificación que reemplaza la T en la posición 87 con R, y la modificación que reemplaza la T en la posición 97 con A. Además, una modificación que reemplace el S en la posición 25 con A es un ejemplo para los residuos de aminoácidos que constituyen la región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO:7.

Con relación a la región variable y a la región constante del anticuerpo quimérico modificado, el anticuerpo humanizado, y el anticuerpo humano de la presente invención, se puede llevar a cabo según sea apropiado la supresión, sustitución, inserción, y/o adición en uno o más de los aminoácidos que constituyen la región variable y/o la región constante del anticuerpo que se somete a modificación, en tanto que la especificidad de unión para el antígeno se exhibe. En particular, la región variable y la región constante del anticuerpo anti-glipican 3 quimérico modificado, el anticuerpo anti-glipican 3 humanizado, y el anticuerpo humano anti-glipican 3 de la presente invención, se puede llevar a cabo según sea apropiado la supresión, sustitución,

inserción, y/o adición en uno o más de los aminoácidos que constituyen la región variable y/o la región constante del anticuerpo anti-glipican 3 que se somete a modificación, en tanto que la especificidad de unión de la molécula del antígeno anti-glipican 3 se exhibe.

En razón a que los anticuerpos anti-glipican 3 quiméricos que utilizan las secuencias derivadas de humano, los anticuerpos anti-glipican 3 humanizados, y los anticuerpos anti-glipican 3 humanos tienen una inmunogenicidad reducida en el cuerpo humano, se cree que son útiles para la aplicación como anticuerpos terapéuticos que se administran a humanos, por ejemplo, con un objetivo terapéutico.

Las secuencias conocidas se pueden utilizar en el método de la presente invención para las secuencias que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo para la introducción de la mutación. Además, se pueden obtener secuencias de gen de anticuerpo novedosas mediante métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, los genes se pueden obtener adecuadamente de las bibliotecas de anticuerpo. Más aún, los genes también se pueden obtener al clonar utilizando procedimientos conocidos, por ejemplo, RT-PCR que utiliza un mRNA de plantilla de un hibridoma que produce anticuerpo monoclonal.

Numerosas bibliotecas de anticuerpos ya se conocen dentro de la esfera de las bibliotecas de anticuerpo. Más aún, en la

medida en que también se conocen los métodos para construir las bibliotecas de anticuerpo, aquellos expertos en la técnica serán capaces de obtener o construir bibliotecas de anticuerpo relevantes. Ejemplos de bibliotecas de anticuerpo adecuadas son las librerías de fago de anticuerpo descritas en la literatura, por ejemplo, Clackson et al., *Nature* (1991) 352, 624-8; Marks et al., *J. Mol. Biol.* (1991) 222, 581-97; Waterhouses et al., *Nucleic Acids Res.* (1993) 21, 2265-6; Griffiths et al., *EMBO J.* (1994) 13, 3245-60; Vaughan et al., *Nature Biotechnology* (1996) 14, 309-14; y la Solicitud de Patente Japonesa expuesta a inspección pública No. 2008-504970. Un método para construir una biblioteca en células eucarióticas (WO 95/15393) y también se utilizan de manera adecuada métodos conocidos tales como despliegue de ribosoma y así sucesivamente. La tecnología para obtener los anticuerpos humanos mediante técnicas de "panning" que utilizan las bibliotecas de anticuerpo humano como el material de partida también se conocen por aquellos expertos en la técnica. Así, un anticuerpo de cadena única (scFv), que comprende las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo humano fusionadas en estructura, se expresan sobre una superficie de fago que utiliza técnicas de despliegue de fago. Los genes que codifican el scFv que se une a antígeno se aíslan de su fago al seleccionar el fago que se une al antígeno. La identificación de la secuencia de tales genes posibilita la determinación de la secuencia de ADN que codifica las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo anti-glipecan 3 humano que se une al antígeno

glipican 3. El anticuerpo anti-glipican 3 se prepara adecuadamente al insertar el gen del anticuerpo que tiene esta secuencia en un vector de expresión adecuado y permite la expresión en una célula huésped adecuado como se describe adelante. Tales métodos son bien conocidos en la técnica e incluyen aquellos descritos en la WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, y WO 95/15388.

Las tecnologías conocidas se pueden utilizar para obtener un gen que codifica el anticuerpo del hibridoma que produce el anticuerpo, particularmente para obtener un gen que codifica el anticuerpo anti-glipican 3 de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal anti-glipican 3. En resumen, un animal se inmuniza con glipican 3 (el antígeno sensibilizante deseado) que utiliza una técnica de inmunización estándar y los inmunecitos obtenidos del animal se someten a la fusión de la célula con las células padre conocidas mediante una técnica de fusión de célula estándar, que se describe en detalle adelante.

Utilizando las técnicas de selección estándar, las células que producen anticuerpo monoclonal (hibridomas) se seleccionan, y el cADN para la región variable (región V) del anticuerpo anti-glipican 3 se puede sintetizar con transcriptasa inversa utilizando el mRNA aislado del hibridoma seleccionado como una plantilla. Un gen de un anticuerpo anti-glipican 3 se prepara adecuadamente mediante

la fusión en estructura de este cADN con el ADN que codifica la región constante del anticuerpo deseado (región C).

Ejemplos específicos se suministran en lo siguiente, pero la presente invención no se limita a estos ejemplos. El antígeno de sensibilización utilizado para generar el anticuerpo de la presente invención puede ser el antígeno inmunogénico completo o puede ser un antígeno incompleto, que incluye, por ejemplo, un haptén no inmunogénico. Por ejemplo, la proteína de glipican 3 de longitud completa o un polipéptido o péptido parcial de éste se puede utilizar de manera adecuada. El polipéptido de núcleo GPC3 soluble mostrado en la SEQ ID NO:13 es un ejemplo preferido. De lo contrario, también se conoce el uso de sustancias que comprenden polisacárido, ácido nucleico, lípido, y así sucesivamente como un antígeno. El antígeno al cual el anticuerpo anti-glipican 3 de la presente invención se une no está particularmente limitado a las modalidades anteriormente descritas. La producción de antígeno se lleva a cabo de manera adecuada mediante métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, un método que utiliza baculovirus (por ejemplo, WO 98/46777 y así sucesivamente) se puede utilizar adecuadamente. Cuando el antígeno tiene una inmunogenicidad baja, el animal puede adecuadamente ser inmunizado con un antígeno unido a una molécula inmunogénica muy grande, tal como albúmina. Cuando el antígeno de sensibilización es una molécula que abarca la membrana celular, tal como glipican 3, un fragmento de polipéptido del

dominio extracelular de la molécula se utiliza adecuadamente según sea necesario como el antígeno de sensibilización. O, una célula que expresa tal molécula sobre la superficie de la célula se utiliza adecuadamente como el antígeno de sensibilización. Además, cuando el antígeno de sensibilización es una molécula insoluble, la solubilización se puede efectuar al unir una molécula con otra molécula soluble en agua y la molécula solubilizada puede entonces utilizarse adecuadamente como el antígeno de sensibilización.

Las células que producen anticuerpo (por ejemplo, células que producen el anticuerpo anti-glipican 3) se obtienen adecuadamente al inmunizar un animal que utiliza un antígeno de sensibilización adecuado como se describió anteriormente. O, las células que producen anticuerpo (por ejemplo, células que producen anticuerpo anti-glipican 3) se pueden obtener mediante inmunización in vitro de los linfocitos que son capaces de producir anticuerpo. Varios vertebrados y mamíferos se pueden utilizar como el animal que se va a inmunizar. En particular, roedores, lagomorfos, y primates se utilizan generalmente como el animal que se va a inmunizar. Los roedores pueden incluir ratón, rata, y hámster; los lagomorfos pueden incluir conejo; y los primates pueden incluir monos tales como el mono cinomólogo, el mono rhesus, el babuino hamadryas, y el chimpancé. Además, también se conocen animales transgénicos que mantienen un repertorio de genes de anticuerpo humano en su genoma, y el anticuerpo humano se puede obtener de manera adecuada utilizando tales

animales (WO 96/34096; Mendez et al., *Nat. Genet.* (1997) 15, 146-56). Si en lugar de utilizar tales animales transgénicos, un anticuerpo humano deseado que exhiba la actividad de unión a un antígeno deseado se puede obtener adecuadamente al, por ejemplo, sensibilizar linfocitos humanos in vitro con el antígeno deseado o con las células que expresan el antígeno deseado seguido por la fusión de célula con las células de mieloma humano, por ejemplo, U266 (Publicación de Patente Japonesa No. Hei 1-59878). Además, un anticuerpo de humano deseado (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) se puede obtener adecuadamente mediante la inmunización con un deseado de antígeno de un animal transgénico que mantiene el repertorio completo de los genes de anticuerpo humano en su genoma (WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 96/34096, y WO 96/33735).

La inmunización del animal se lleva a cabo, por ejemplo, mediante la dilución y suspensión adecuada del antígeno de sensibilización en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica, y así sucesivamente; según la emulsificación necesaria mediante la mezcla del adyuvante, y luego la inyección intraabdominal o subcutánea del antígeno de sensibilización en el animal. Esto se sigue preferiblemente por varias administraciones del antígeno de sensibilización mezclado con el adyuvante de Freund incompleto durante un intervalo de 4 a 21 días. La producción en el animal inmunizado del anticuerpo contra el antígeno de sensibilización se puede medir utilizando técnicas analíticas

conocidas, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) y citometría de flujo (FACS).

Un hibridoma se puede preparar al fusionar una célula que produce el anticuerpo anti-glipican 3 obtenido de un animal o linfocito inmunizado con el antígeno de sensibilización de interés, con células de mieloma que utilizan un agente de fusión convencionalmente utilizado para la fusión de la célula, por ejemplo, polietilenglicol (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986) 59-103). La producción de hibridoma se puede llevar a cabo adecuadamente de acuerdo con, por ejemplo, el método de Milstein et al. (G. Kohler y C. Milstein, *Methods Enzymol.* (1981) 73, 3-46). El cultivo y la proliferación de las células de hibridoma preparadas mediante este método producen anticuerpo monoclonal que se produce mediante el hibridoma y se une específicamente al glipican 3. La especificidad de unión exhibida por este anticuerpo monoclonal para el glipican 3 se puede medir adecuadamente mediante técnicas analíticas conocidas, tales como la inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), citometría de flujo (FAC), y así sucesivamente. Según sea necesario, un hibridoma que produce un anticuerpo anti-glipican 3 con la especificidad, afinidad, o actividad deseada se puede entonces subclonar adecuadamente mediante, por ejemplo, dilución limitada, y el anticuerpo monoclonal producido por este hibridoma se puede aislar.

El gen que codifica el anticuerpo seleccionado se puede entonces clonar del hibridoma anteriormente mencionado o la célula que produce anticuerpo (por ejemplo, el linfocito sensibilizado) utilizando una sonda capaz de unirse específicamente al gen (por ejemplo, la complementariedad de oligonucleótido a la secuencia que codifica la región constante del anticuerpo). La clonación también se puede llevar a cabo mediante RT-PCR utilizando mRNA aislado del hibridoma o la célula que produce anticuerpo (por ejemplo, linfocito sensibilizado) como una plantilla. Las inmunoglobulinas se dividen en 5 clases diferentes, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, con base en las diferencias en su estructura y función. Adicionalmente, las clases individuales se dividen en varias subclases (isotipos) (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4; IgA1 e IgA2; y así sucesivamente). El anticuerpo de la presente invención puede originarse del anticuerpo que pertenece a cualquiera de estas clases y subclases y no está particularmente limitado a cualquier clase o subclase; sin embargo, el anticuerpo que pertenece a la clase IgG es particularmente preferido.

Los genes que codifican las secuencias de aminoácido que constituyen la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) se puede modificar según sea apropiado mediante las técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, un anticuerpo recombinante que se ha sometido a la modificación artificial con el

objetivo de, por ejemplo, reducir la xeno-inmunogenicidad contra humanos (por ejemplo, anticuerpo quimérico tal como el anticuerpo anti-glipican 3, el anticuerpo humanizado tal como el anticuerpo anti-glipican 3 humanizado, y así sucesivamente), se pueden producir adecuadamente mediante la modificación de los residuos del ácido nucleico que codifican la secuencia del aminoácido que constituye el anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, un anticuerpo de rata, anticuerpo de conejo, anticuerpo de hámster, anticuerpo de oveja, anticuerpo de camello, y así sucesivamente. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo constituido de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo que se origina de un mamífero no humano tal como un ratón, y las regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo humano. Se puede obtener un anticuerpo quimérico como sigue: ADN que codifica la región variable de un anticuerpo originado de ratón se liga con el ADN que codifica la región constante del anticuerpo humano y se inserta hacia un vector de expresión, y el vector recombinante resultante se introduce en un huésped y se le permite la expresión. El anticuerpo humanizado también se conoce como un anticuerpo humano reformado y es un anticuerpo en el cual la región de determinación de complementariedad (CDR) de un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) aislado de un mamífero no humano tal como ratón está ligado con una región de estructura de anticuerpo humano con el fin de formar una secuencia de codón en estructura. La secuencia de ADN que codifica un anticuerpo humanizado se

puede sintetizar mediante una reacción de PCR traslapante que utiliza una pluralidad de oligonucleótidos como plantilla. Los materiales y procedimientos de partida para reacción de PCR traslapante se describe en, por ejemplo, WO 98/13388 y en cualquier otra parte.

El ADN que codifica la región variable del anticuerpo recombinante (por ejemplo, el anticuerpo anti-glipican 3 recombinante) de la presente invención se obtiene mediante PCR traslapante de una pluralidad de oligonucleótidos contruidos con el fin de tener las secuencias de nucleótido que se traslapan una con la otra, que está a su vez ligada con ADN que codifica la región constante de anticuerpo humano con el fin de formar una secuencia de codón en estructura. El ADN ligado de esta manera se inserta entonces de una manera operable en un vector de expresión, e introducido en el huésped. El anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) codificado mediante el ADN se expresa al cultivar el huésped. El anticuerpo expresado (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) se aísla al purificarse del medio de cultivo huésped (EP 239400, WO 96/02576, y así sucesivamente). Las FR del anticuerpo humanizado (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) ligado con CDR se selecciona de tal manera que la región de determinación de complementariedad forma un sitio de unión de antígeno de alta calidad para el antígeno. Según sea necesario, la secuencia de aminoácido se puede modificar mediante la sustitución adecuada de los residuos de aminoácido que constituyen la región variable del anticuerpo

FR, con el fin de posibilitarle la región de determinación de complementariedad del anticuerpo reformado para formar un sitio de unión de antígeno adecuado para el antígeno (K. Sato et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856).

Además de las modificaciones relacionadas con la humanización como se discutió anteriormente, se pueden introducir modificaciones adicionales, por ejemplo, para mejorar las características bioquímicas del anticuerpo, por ejemplo, la actividad de unión con el antígeno reconocido por el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo anti-glipican 3). Las modificaciones en el contexto de la presente invención se pueden llevar a cabo adecuadamente mediante métodos tales como mutagenia específica de sitio (referencia, por ejemplo, a Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82, 488), mutación PCR, mutación de cassette, y así sucesivamente. La secuencia de aminoácido del anticuerpo modificado con características bioquímicas mejoradas generalmente tienen al menos 70%, más preferiblemente por lo menos 80%, y aún más preferiblemente por lo menos 90% (por ejemplo, por lo menos 95%, 97%, 98%, 99%, y así sucesivamente) de identidad y/o similitud con la secuencia de aminoácido que constituye el anticuerpo sometido a la modificación (que es, el anticuerpo sobre el cual se basa el anticuerpo modificado). Como se utiliza aquí, la identidad de secuencia y/o la similitud se refiere a la proporción de los residuos de aminoácido que son idénticos (residuos idénticos) o similares (residuos de aminoácidos clasificados en el mismo grupo basados en las

características generales de la cadena lateral de aminoácido) después de alinear las secuencias e insertar espacios según sea necesario de tal manera que la identidad de secuencia asume un máximo. Los residuos de aminoácido de ocurrencia natural se pueden clasificar generalmente en los siguientes grupos con base en las propiedades de la cadena lateral: (1) hidrófobos: alanina, isoleucina, valina, metionina, y leucina; (2) hidrófila neutra: asparagina, glutamina, cisteína, treonina, y serina; (3) ácida: ácido aspártico y ácido glutámico; (4) básica: arginina, histidina, y lisina; (5) residuos que afectan la orientación de la cadena: glicina y prolina; y (6) aromática: tripsina, triptofano, y fenilalanina.

Una modalidad adecuada específica de una modificación para mejorar la función de anticuerpo incluye una mejora en la citotoxicidad exhibida por el anticuerpo, tal como el anticuerpo anti-glipican 3 humanizado. Los ejemplos preferidos de citotoxicidad son citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). En la presente invención, la actividad CDC denota citotoxicidad debido al sistema de complemento, mientras el ADCC se refiere a una actividad de daño de la célula objetivo cuando el anticuerpo específico se une a un antígeno de superficie celular sobre la célula objetivo y la célula que lleva el receptor Fcγ (por ejemplo, un inmunecito) se une a la porción Fc del anticuerpo a través del receptor Fcγ. Si un anticuerpo de prueba tiene una

actividad ADCC o tiene una actividad CDC se puede medir mediante métodos conocidos (por ejemplo, Current Protocols in Immunology, Chapter 7, Immunologic studies in humans. Editor, John, E. Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc., (1993)).

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

(1) Preparación de las células efectoras

El vaso es aislado de, por ejemplo, ratón CBA/N, y las células de vaso se separan sobre un medio RPMI1640 (Invitrogen). Después de lavar con el mismo medio que contiene suero bovino fetal al 10% (FBS, HyClone) la concentración de las células se ajusta a 5×10^6 células/mL para preparar las células efectoras.

(2) Preparación de solución de complemento

La solución de complemento se puede preparar mediante una disolución 10X con un medio que contiene FBS al 10% (Invitrogen) de Complemento de Conejo Nene (CEDARLANE).

(3) Preparación de células objetivo

Las células que expresan una proteína de antígeno a la cual se une el anticuerpo de prueba se cultivan con 0.2 mCi

^{51}Cr cromato de sodio (GE Healthcare Bioscience) durante 1 hora a 37°C en medio DMEM que contiene 10% de FBS con el fin de radiomarcas las células objetivo. Lo siguiente, entre otros, se puede utilizar como células que expresan una proteína de antígeno a la cual el anticuerpo de prueba se une: células transformadas con un gen que codifica una proteína de antígeno a la cual se une el anticuerpo de prueba, células de cáncer de ovario, células de cáncer de próstata, células de cáncer de mama, células de cáncer uterino, células de cáncer de hígado, células de cáncer de pulmón, células de cáncer pancreático, células de cáncer de riñón, células de cáncer de vejiga, y células de cáncer de colon. Después de radio marcar, se lavan las células tres veces con medio RPMI1640 que contiene 10% de FBS y la concentración de célula se ajusta a 2×10^5 células/mL para preparar las células objetivo.

La actividad ADCC y la actividad CDC se pueden medir mediante los siguientes métodos. Con el fin de medir la actividad ADCC, 50 μL de las células objetivo y 50 μL del anticuerpo de prueba se agregan a una placa con fondo en U de 96 pozos (Becton Dickinson) y se hacen reaccionar durante 15 minutos sobre hielo. A la mezcla de reacción se agrega 100 μL de células efectoras y se incuban durante 4 horas en una incubadora con dióxido de carbono. La concentración de anticuerpo de prueba final está preferiblemente dentro del rango de 0 a 10 $\mu\text{g/mL}$. Después de la incubación, 100 μL del sobrenadante se recuperan y la radio actividad del

sobrenadante se mide utilizando un contador gama (COBRA II AUTO-GAMMA, MODELO D5005, Packard Instrument Company). La citotoxicidad se puede calcular utilizando la radioactividad de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

en donde A es la radio actividad (cpm) para la muestra utilizando el anticuerpo de prueba particular; B es la radio actividad (cpm) de la muestra a la cual se ha agregado 1% de NP-40 (Nacali Tesque); y C es la radio actividad (cpm) para la muestra que contiene solamente las células objetivo.

Para medir la actividad CDC, se agregan 50 µL de las células objetivo y 50 µL del anticuerpo de prueba a una placa con fondo en U de 96 pozos (Beckton Dickinson) y se hacen reaccionar durante 15 minutos sobre hielo. A la mezcla de reacción se agrega 100 µL de solución de complemento y se incuba durante 4 horas en una incubadora con dióxido de carbono. La concentración del anticuerpo de prueba final está preferiblemente dentro del rango de 0 a 3 µg/mL. Después de incubación, se recupera 100 µL del sobrenadante y la radio actividad del sobrenadante se mide con un contador gama. La citotoxicidad se puede calcular de la misma manera como para la medición de la actividad ADCC.

Cuando la citotoxicidad debido a un conjugado de anticuerpo se va a medir, 50 µL de las células objetivo y 50

μ L del conjugado de anticuerpo de prueba se agregan cada uno a una placa de fondo plano de 96 pozos (Becton Dickinson) y se hacen reaccionar durante 15 minutos sobre hielo. La placa se incuba luego durante 1-4 horas en una incubadora con dióxido de carbono. Una concentración de anticuerpo de prueba final está preferiblemente dentro del rango de 0 a 3 μ g/mL. Después de la incubación, se recuperan 100 μ L del sobrenadante y la radio actividad del sobrenadante se mide con un contador gama. La citotoxicidad se puede calcular de la misma manera como para la medición de la actividad ADCC.

Las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) son, como se describió anteriormente, generalmente compuestas de 3 CDR y 4 FR. Los residuos de aminoácido sometidos a "modificación" en una modalidad preferida de la presente invención se puede seleccionar adecuadamente, por ejemplo, de los residuos de aminoácido que constituyen las CDR y FR. La modificación de los residuos de aminoácido que constituyen las CDR pueden en algunos casos originar una declinación en la capacidad de unión de antígeno del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) involucrado en la modificación. De acuerdo con esto, los residuos de aminoácido del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) sometidos a "modificación" en la presente invención se seleccionan preferiblemente de los residuos de aminoácido que constituyen las FR, pero no se limitan a éstas. Cuando se confirma que la modificación de los residuos de aminoácido

localizados en las CDR no origina una declinación en la capacidad de unión del antígeno del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) involucrado en la modificación, entonces tales residuos de aminoácido se pueden seleccionar para modificación.

Aquellos expertos en la técnica se pueden encontrar fácilmente en una base de datos pública, tal como la base de datos Kabat, secuencias de aminoácido que constituyen la región variable del anticuerpo FR que de hecho ocurre en un organismo tal como un ratón o humano.

Una modalidad preferida de la presente invención suministra un anticuerpo humanizado (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) que tiene las cinéticas de plasma moduladas mediante el método de la presente invención. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) es un anticuerpo humanizado que comprende una región de determinación de complementariedad (CDR) derivada de un animal no humano, una región de estructura (FR) de origen humano, y una región constante humana, en donde por lo menos un residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie del anticuerpo en la CDR o FR tiene una carga diferente de aquella del residuo de aminoácido en la posición correspondiente de la CDR o FR del anticuerpo original y en donde el anticuerpo humanizado tiene cinéticas de plasma moduladas en comparación con el anticuerpo quimérico que tiene la misma región constante.

Otra modalidad preferida de la presente invención suministra un anticuerpo humano (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3 humano) que tiene las cinéticas de plasma moduladas mediante el método de la presente invención. El anticuerpo humano, por ejemplo, es un anticuerpo humano que comprende una región de determinación de complementariedad (CDR) de origen humano, una región de estructura (FR) de origen humano, y una región constante humana, en donde al menos un residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie del anticuerpo en la CDR o FR tiene una carga diferente de aquella del residuo de aminoácido en la posición correspondiente del CDR o FR del anticuerpo original y en donde el anticuerpo humano tiene las cinéticas de plasma moduladas en comparación con un anticuerpo quimérico que tiene la misma región constante.

La región constante humana anteriormente mencionada denota preferiblemente una región que comprende una región Fc humana tipo silvestre, pero un Fc modificado también se puede utilizar adecuadamente. Tal "modificación Fc" puede incluir un Fc modificado preparado mediante la modificación del residuo de aminoácido que constituye el Fc así como también un Fc modificado preparado mediante una modificación de una modificación ya ejecutada en el grupo funcional Fc. Un ejemplo preferido de tal modificación de una modificación es la modificación de la naturaleza de la modificación de la cadena de azúcar unida a la porción Fc. Un ejemplo específico

preferido es el "anticuerpo que tiene un contenido reducido de fucosa unido a la región Fc" que está específicamente descrito aquí como un ejemplo de referencia.

El término "anticuerpo que tiene contenido reducido de fucosa unido a la región Fc" denota un anticuerpo para el cual la cantidad de fucosa unida se ha reducido significativamente en comparación con el anticuerpo de control, y preferiblemente la fucosa es no detectable. La fucosa está generalmente unida al N-glicósido ligado a las cadenas de azúcar que están unidas en dos sitios de unión de cadena de azúcar presentes en la región Fc de las dos moléculas de cadena pesada que forman una molécula de anticuerpo única. El término "anticuerpo que tiene un contenido reducido de fucosa unido a la región Fc" denota un anticuerpo que, en comparación con el anticuerpo ordinario como el control, tiene un contenido de fucosa no mayor de 50%, preferiblemente no mayor del 25%, más preferiblemente no mayor del 10%, y particularmente preferiblemente no mayor del 0% del total del contenido de la cadena de azúcar del anticuerpo de control. El contenido de fucosa se puede medir utilizando el procedimiento analítico suministrado en los ejemplos de referencia de adelante. El método para producir tal anticuerpo que no tiene fucosa puede incluir el método descrito en los ejemplos de referencia de la presente invención, así como también un método para producir anticuerpos con las células animales deficientes en fucosa transferasa (Biotechnol. Bioeng. (2004) 87(5), 614-22) y un

método para producir anticuerpos con células animales en el cual se modifica el complejo de modificación de cadena de azúcar ramificado (Biotechnol. Bioeng. (2006) 93(5), 351-61). Además, ejemplos adecuados de producción de métodos que utilizan células no animales como las células huéspedes pueden incluir un método para producir anticuerpos con células vegetales (*Nature Biotechnology* (2006) 24, 1591-7) y con células de levadura (*Nature Biotechnology* (2006) 24, 210-5).

Una modalidad preferida del método de preparación de la presente invención es un método para preparar un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) que tiene las cinéticas de plasma moduladas, que comprenden (a) modificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende al menos un residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3), de tal manera que la carga del o los residuos de aminoácido se cambia; (b) cultivar una célula huésped de tal manera que el ácido nucleico modificado en la etapa (a) se expresa; y (c) recuperar el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) del cultivo de la célula huésped.

En el método de la presente invención, el término "modificar un ácido nucleico" se refiere a una modificación de la secuencia de ácido nucleico con el fin de suministrar un codón que corresponde al residuo de aminoácido que se introduce mediante la "modificación" de la presente

invención. Más específicamente, este término se refiere a una modificación del ácido nucleico que contiene un codón que sufrirá modificación, en donde dicha modificación cambia el codón que corresponde al residuo de aminoácido premodificación al codón del residuo de aminoácido que se introduce mediante la modificación. En general este término significa la implementación del proceso genético o del tratamiento mutagénico con el fin de reemplazar al menos una base del ácido nucleico que comprende el codón para suministrar un codón que codifica el residuo de aminoácido objetivo. Esto es, un codón que codifica el residuo de aminoácido sometido a modificación se reemplaza por un codón que codifica el residuo de aminoácido que se introduce por la modificación. La modificación del ácido nucleico se puede llevar a cabo adecuadamente por aquellos expertos en la técnica utilizando tecnología conocida, por ejemplo, mutagenia específica de sitio, mutagenia PCR, y así sucesivamente.

El ácido nucleico preparado en la presente invención se coloca generalmente (insertado) en un vector adecuado e introducido en la célula huésped. No existen limitaciones particulares sobre el vector en tanto que éste tiene la capacidad de mantener establemente el ácido nucleico insertado. Por ejemplo, con referencia al uso de *E. coli* como el huésped, el vector pBluescript (Stratagene) se prefiere como un vector de clonación, aunque se pueden utilizar varios vectores comercialmente disponibles. Un vector de expresión

es particularmente útil en aquellos casos donde el vector se utiliza para producir el polipéptido de la presente invención. No existen limitaciones particulares sobre el vector de expresión en tanto que éste puede expresar el polipéptido in vitro, en *E. coli*, en un cultivo celular, o dentro de un organismo. Ejemplos preferidos incluyen el vector pBEST (Promega) para expresión in vitro, el vector pET (Invitrogen) para *E. coli*, el vector pME18S-FL3 (GenBank Accession No. AB009864) para cultivo celular, y el vector pME18S (Mol. Cell Biol. (1988) 8, 466-472) para un organismo. El ADN de acuerdo con la presente invención se puede insertar en el vector mediante métodos estándar, por ejemplo, mediante el método de ligasa que utiliza sitios de enzima de restricción (Current Protocols in Molecular Biology, editado por Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons, secciones 11.4-11.11).

No existen limitaciones particulares sobre la célula huésped referenciada anteriormente, y varias células huéspedes se pueden utilizar dependiendo del propósito. Ejemplos de células para la expresión del polipéptido incluyen células bacterianas (por ejemplo, *Streptococos*, *Estafilococos*, *E. coli*, *Streptomices*, *Bacillus subtilis*), células fúngicas (por ejemplo, levadura, *Aspergillus*), células de insecto (por ejemplo, *Drosophila* S2, *Spodoptera* Sf9), células animales (por ejemplo, CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293, células de melanoma Bowes), y células vegetales. El vector se puede introducir en la célula huésped

mediante métodos conocidos, por ejemplo, precipitación de fosfato de calcio, poración de electropulso (Current Protocols in Molecular Biology, editado por Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons, secciones 9.1-9.9), lipofección, y microinyección.

Una señal secretoria apropiada se puede incorporar adecuadamente en el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) con el fin de lograr la secreción del anticuerpo expresado en la célula huésped en un lumen de vesícula, el espacio periplasmático, o el ambiente extracelular. Tal señal puede ser adecuadamente la característica de una secuencia de señal nativa del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) o puede ser una secuencia de señal heteróloga.

El anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) producido como se describió anteriormente se puede recuperar al recolectar el medio de cultivo en aquellos casos donde el anticuerpo de la presente invención secreta hacia el medio de cultivo. En aquellos casos donde el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de la presente invención se produce dentro de la célula, la célula se lisa primero y luego el anticuerpo se recupera. Los métodos conocidos se pueden utilizar adecuadamente para purificar el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de la invención recuperado del cultivo de célula recombinante, por ejemplo, sulfato de amonio y precipitación de etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio de anión o catión,

cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxapatita, y cromatografía de lectina.

La presente invención también se relaciona con una composición (un fármaco) que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) (por ejemplo, anticuerpo IgG) que tiene las cinéticas del plasma moduladas por el método de la invención.

La composición farmacéutica en el contexto de la presente invención generalmente se refiere a un agente para el tratamiento o prevención de una enfermedad o para la detección o diagnóstico de una enfermedad.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular mediante un método conocido por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, la formulación se puede utilizar mediante una ruta no oral en la forma de un inyectable, es decir, una suspensión o solución aséptica con agua u otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la formulación se puede preparar al combinar el anticuerpo con un portador o medio farmacológicamente aceptable, en particular con agua estéril o solución salina fisiológica, aceite vegetal, agente emulsificante, agente de suspensión, tensoactivo, estabilizador, saborizante, diluyente, portador, conservante, ligador, y así sucesivamente, y mezclar en el

estado de dosis unitaria requerido por la práctica farmacéutica generalmente estabilizada. La cantidad del componente efectivo en las formulaciones se selecciona de tal manera que se obtiene una dosis adecuada en el rango indicado.

Una composición estéril para inyección se puede formular adecuadamente de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar utilizando un portador tal como agua destilada para inyección.

La solución acuosa para inyección puede ser, por ejemplo, una solución isotónica que contiene solución salina fisiológica, dextrosa, y otros adyuvantes (por ejemplo, D-sorbitol, D-manitol, cloruro de sodio). Los auxiliares de disolución adecuados (por ejemplo, un alcohol tal como etanol o polialcohol tal como propilenglicol o polietilenglicol) y tensoactivo no iónico (por ejemplo, Polisorbato 80TM, HCO-50) también se puede utilizar como apropiado.

Los líquidos aceitosos incluyen aceite de sésamo y aceite de soya. Bencil benzoato y/o bencil alcohol también se pueden utilizar adecuadamente como auxiliares de disolución. Un amortiguador (por ejemplo, solución amortiguada de fosfato, solución amortiguada de acetato de sodio), agente de calmante (por ejemplo, clorhidrato de procaína), estabilizador (por ejemplo, bencil alcohol y fenol), y un inhibidor de oxidación también se puede incorporar según sea apropiado. La solución

de inyección preparada como se describió anteriormente generalmente se llena en ampollas adecuadas.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar preferiblemente mediante administración no oral. Por ejemplo, se puede formular como una composición inyectable, una composición transnasal, una composición para administración de inhalación, o una composición transdérmica. Se puede administrar adecuadamente sistémica o localmente mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, o inyección subcutánea.

El método de administración se puede seleccionar según sea apropiado dependiendo de la edad y los síntomas del paciente. La dosis de la composición farmacéutica comprende el anticuerpo o polinucleótido que codifica el anticuerpo, por ejemplo, en el rango de 0.0001 mg a 1000 mg por 1 kg de peso corporal por dosis unitaria. O, la dosis se puede formular o establecer a una dosis de 0.001 a 100,000 mg por paciente; sin embargo, la presente invención no se limita necesariamente a estos valores numéricos. La dosis y el método de administración variarán dependiendo del peso corporal, edad, y síntomas del paciente, y una dosis apropiada y el método de administración se pueden seleccionar por aquellos expertos en la técnica con base en una consideración de estos factores.

La presente invención también suministra ácido nucleico que codifica el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3 humanizado) que tiene las cinéticas del plasma moduladas mediante el método de la presente invención. Un vector que lleva tal ácido nucleico también está comprendido por la presente invención.

La presente invención también suministra una célula huésped que comprende el ácido nucleico anteriormente mencionado. El tipo de célula huésped no está particularmente limitado, y puede ser, por ejemplo, una célula bacteriana tal como E. coli o cualquiera de varias células animales. La célula huésped se puede utilizar según sea apropiado en un sistema de producción para la producción o expresión del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de la presente invención. Así, la presente invención también suministra un sistema de producción que se puede utilizar para producir el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) que utiliza la célula huésped anteriormente mencionada. Un sistema de producción in vitro o in vivo se puede utilizar adecuadamente como el sistema de producción. Las células eucarióticas y las células procarióticas se emplean adecuadamente en las células huéspedes utilizadas en el sistema de producción in vitro.

Las células eucarióticas utilizadas como la célula huésped pueden incluir células animales, células vegetales, y

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

Con relación a las células vegetales, *Lemna minor* y células derivadas de *Nicotiana tabacum* se conocen como sistemas de producción de proteína, y el anticuerpo anti-glipican 3 de la presente invención se puede producir mediante técnicas de cultivo de callo que utilizan estas células. Con relación a las células fúngicas, los sistemas de expresión de proteína que utilizan las células de levadura, por ejemplo, *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*), y los sistemas de expresión de proteína que utilizan los hongos filamentosos,

por ejemplo, *Aspergillus* (por ejemplo, *Aspergillus niger*), se conocen y se pueden utilizar como células huéspedes para producir el anticuerpo anti-glipican 3 de la presente invención.

Con relación al uso de las células procarióticas, cualquiera de los sistemas de producción que utiliza las células bacterianas se utiliza adecuadamente. Los sistemas de producción que utilizan *E. coli* como se describió anteriormente o *B. subtilis* se conocen para las células bacterianas, y cualquiera de estas células bacterianas se pueden utilizar adecuadamente para producir el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de la presente invención.

Con el fin de producir el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) que utiliza una célula huésped de la presente invención, la célula huésped transformada con el vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica el anticuerpo de la presente invención se cultiva para expresar un polinucleótido que codifica para el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3). Las células huéspedes se pueden cultivar de acuerdo con métodos conocidos. Cuando una célula animal utiliza como el huésped, por ejemplo, DMEM, MEM, RPMI1640, o IMDM se utiliza adecuadamente como el medio de cultivo. Un auxiliar de suero, por ejemplo, FBS, suero de becerro fetal (FCS), y así sucesivamente, se pueden agregar. Las células también se

pueden cultivar en un medio libre de suero. Las células se pueden cultivar a un pH de aproximadamente 6-8, dependiendo de la célula huésped. El cultivo es generalmente corrido durante aproximadamente 15 a 200 horas a aproximadamente 30 a 40°C, con un reemplazo del medio, aireación, y agitación según sea necesario.

De otro lado, los sistemas de producción basados en un animal o planta están disponibles como sistemas in vivo para producir el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de la presente invención. El polinucleótido que codifica el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de la presente invención se introduce en un animal o planta y el anticuerpo se produce dentro del animal o planta y se recupera. El término "huésped" como se utiliza aquí comprende tales animales y plantas.

Cuando un animal se utiliza como el huésped, los sistemas de producción basados en mamíferos e insectos están disponibles. Cabra, cerdo, oveja, ratón, vaca, y así sucesivamente, son adecuadamente utilizados como el mamífero (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications (1993)). También se puede emplear un animal transgénico.

Por ejemplo, un polinucleótido que codifica el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de la presente invención se puede producir en la forma de un gen de fusión con un gen que codifica un polipéptido que se produce

específicamente en la leche, tal como la β -caseína de cabra. Un fragmento de polinucleótido que comprende el gen de fusión se inyecta entonces en un embrión de cabra y se trasplanta a una cabra hembra. El anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de interés se obtiene de la leche producida por la cabra transgénica nacida de la cabra que se recibe el embrión o de la leche producida por medio de la descendencia de la cabra transgénica. Se pueden administrar hormonas adecuadas según sea apropiado a la cabra transgénica con el fin de incrementar la cantidad de la leche que contiene anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) producido de la cabra transgénica (Ebert et al., *Bio/Technology* (1994) 12, 699-702).

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

La planta de tabaco es un ejemplo de una planta que se puede utilizar para producir el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de la presente invención. Cuando

se utiliza la planta de tabaco, el polinucleótido que codifica el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de interés se inserta en el vector de expresión de la planta, tal como un pMON 530, y el vector recombinante resultante se transfecta hacia una bacteria tal como *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria se utiliza entonces para infectar una planta de tabaco (por ejemplo, *Nicotiana tabacum*) (Ma et al., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24, 131-8), y el anticuerpo deseado (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) se obtiene de las hojas de la planta de tabaco infectada. *Lemna minor* se puede infectar de manera similar con tal bacteria y el anticuerpo deseado (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) se puede obtener de las células del *Lemna minor* infectadas clonadas (Cox K. M. et al., *Nat. Biotechnol.* (2006) 24(12), 1591-7).

El anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) de la presente invención obtenido de la manera descrita anteriormente se puede aislar del interior o exterior de las células huéspedes (por ejemplo, medio de cultivo o leche) y se puede purificar en un anticuerpo homogéneo sustancialmente puro. Las técnicas de separación y purificación generalmente utilizadas para la purificación de un polipéptido se pueden utilizar adecuadamente para la separación y la purificación en la presente invención, pero no se limitan. Por ejemplo, el anticuerpo se puede separar y purificar adecuadamente mediante una selección adecuada y una combinación de cromatografía de columna, filtración, ultrafiltración,

salteado, precipitación de disolvente, extracción de disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis de gel de SDS-poliacrilamida, electroforesis isoelectrica, diálisis, recristalización, y así sucesivamente.

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

Otra modalidad preferida de la presente invención es un método preparar el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) con cinéticas de plasma moduladas de la presente invención, que comprende la etapa de cultivar una célula huésped de la presente invención como se describió anteriormente y recuperar el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-glipican 3) del cultivo celular.

Toda la literatura citada en la especificación se incorpora aquí como referencia.

La presente invención se describe específicamente en lo siguiente, pero la presente invención está limitada a los ejemplos suministrados adelante.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

(1) Construcción de punto de mutación de los genes del anticuerpo humanizado H0L0

Varios genes de mutación de punto se construyen partiendo de un gen que codifica el anticuerpo anti-glipican 3 que comprende la CDR del anticuerpo GC33 humanizado descrito en la WO 2006/046751. Las oligoADN diseñadas con base en las secuencias de las cadenas codificantes y contrasentido que contienen los sitios de modificación se sintetizaron. Se construye una pluralidad de genes de mutación de punto utilizando el Kit comercial de Mutagenia Dirigida de Sitio QuikChange (Stratagene). La construcción de los genes de mutación de punto se lleva a cabo mediante PCR bajo las siguientes condiciones. Después de calentar durante 30 segundos a 95°C, la mezcla de reacción de un plásmido con una plantilla de 10 ng, una cadena delantera de 10 pmol y una cadena inversa sintética oligo-ADN y un amortiguador 10X, una mezcla dNTP, y ADN Polimerasa Pfu Turbo suministrada con el

kit se someten a 18 ciclos de 95°C 30 seg, 55°C 1 min y 68°C 4 min. Se agrega el DpnI suministrado con el equipo a la mezcla de reacción, y la digestión de restricción con la enzima de restricción se lleva a cabo durante 1 hora a 37°C. Las células competentes DH5α (Toyobo) se transforman con la solución de reacción resultante para obtener los transformantes. La introducción de la mutación de punto se confirma mediante la determinación de la secuencia de nucleótido del ADN del plásmido aislado de los transformantes. Cada gen de mutación de punto se clona en vectores de expresión capaces de expresar el gen de inserto en las células animales. Los genes modificados se preparan mediante las modificaciones como se describen adelante.

La expresión transitoria del anticuerpo H0L0 humanizado y sus anticuerpos modificados con mutación de punto se llevan a cabo utilizando polietilenoimina (Polysciences Inc.). Las células HEK293 se separan mediante tripsina EDTA (Invitrogen), y se siembran en un plato de cultivo de 10 cm² a 6×10^6 células/10 mL. Al siguiente día, el medio de cultivo SFMII y la polietilenoimina se mezclan con ADN de plásmido de expresión de cadena pesada y el ADN de plásmido de expresión de cadena ligera de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y la mezcla resultante se deja en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla completa se agrega gota a gota al plato de cultivo que contiene las células HEK293 sembradas como se describió anteriormente. El sobrenadante del cultivo se recupera

después de aproximadamente 72 horas y el anticuerpo H0L0 humanizado expresado y sus anticuerpos modificados con mutación de punto se purifican utilizando rProteinA Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

(1-1) Modificación del valor T_m del anticuerpo H0L0 humanizado

La temperatura del punto medio de desnaturalización térmica (T_m) se determina por la parte superior del pico de desnaturalización en el termograma (C_p versus T) obtenido después de calentar la solución de muestra prueba a una tasa de calentamiento programada constante. El valor T_m del anticuerpo H0L0 humanizado se mide utilizando una solución de muestra para la medición DSC preparada como se describe en lo que sigue. Primero se hace diálisis a la membrana de diálisis cargada con una solución de anticuerpo (que corresponde a 50 a 100 μ g) durante 24 horas contra una solución externa de diálisis de 20 mol/L de solución con amortiguador de acetato de sodio (pH 6.0) que contiene 150 mmol/L de cloruro de sodio. Posteriormente, la solución de muestra se ajusta a su concentración de anticuerpo de 50 a 100 μ g/mL con una solución de diálisis externa y se utiliza como la solución de muestra para la medición DSC.

Un instrumento DSC adecuado, por ejemplo, DSC-II (Calorimetry Sciences Corporation), se utiliza para este experimento. La solución de la muestra se prepara como se

describió anteriormente y la solución de referencia (solución de diálisis externa) se desgasifica completamente, y cada uno de estos especímenes de prueba se coloca en una celda con calorímetro y se equilibra térmicamente a 40°C. La exploración del DSC se corre entonces desde 40°C a 100°C a una velocidad de exploración de aproximadamente 1 K/minuto. Los resultados de esta medición se dan en la parte superior del pico de desnaturalización como una función de la temperatura. La temperatura de punto medio de la desnaturalización térmica del anticuerpo H0L0 humanizado se calcula mediante la asignación pico del dominio Fab de acuerdo con Rodolfo et al., *Immunology Letters* (1999), 47-52. Como un ejemplo específico, la gráfica obtenida de la calorimetría de exploración diferencial (DSC) sobre el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) se muestra en la Figura 1.

El anticuerpo H0L0 humanizado, que comprende la cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:1 y la cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO:7, tiene un valor T_m de 76.6°C calculada según el método descrito anteriormente. Los valores T_m de Synagis y Herceptin, suministrados como ejemplos de anticuerpos existentes, se miden a 85.4°C y 81.8°C, respectivamente. Se muestra así que el valor T_m del anticuerpo H0L0 humanizado es inferior que aquel de los anticuerpos existentes.

Los anticuerpos modificados se preparan por lo tanto del

anticuerpo H0L0 humanizado con el objetivo de elevar el valor T_m . Las modificaciones de V37I, A40P, M48I, y L51I se introducen en FR2 de cadena pesada del anticuerpo H0L0 mostrado en la SEQ ID NO:1 para preparar el anticuerpo H15 (SEQ ID NO:2), donde su subclase se cambia desde VH1b a VH4. El valor T_m se mejora a 79.1°C. También la cadena ligera del anticuerpo H0L0 mostrada en la SEQ ID NO:7 se modifica al introducir las modificaciones L42Q, S48A, y Q50R en la FR2 que cambia la subclase de VK2 a VK3, e introduciendo la modificación V21 para reemplazar el V2 de la FR1 con I (secuencia germinal), de esta manera se prepara L4 (SEQ ID NO:8). El valor T_m de cada anticuerpo se mide como se describió anteriormente. El valor T_m de H15L0 y H0L4 fue de 79.2°C y 77.2°C, respectivamente, que muestra la mejora desde el valor T_m 76.6°C de H0L0. El valor T_m del anticuerpo H15L4 que comprende la combinación de estas dos modificaciones se mejora a 80.5°C.

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

La vida media del plasma de un anticuerpo se extiende al disminuir el valor pI exhibido por el anticuerpo. En contraste, las características de translocación del tejido de un anticuerpo se mejoran al incrementar el pI del anticuerpo. Se desconoce si el incremento o la disminución en el valor del pI de un anticuerpo efectivo en el tratamiento de cáncer mejoraría el efecto de supresión del tumor. Por lo tanto, el

anticuerpo H0L0 humanizado modificado con un pI disminuido y el anticuerpo H0L0 humanizado modificado con el pI incrementado se preparan y la actividad antitumoral de ellos se compara para investigar si cualquier modificación tuvo una actividad supresora del tumor superior.

El valor pI de cada anticuerpo se calcula con base en el análisis mediante electroforesis isoeléctrica. La electroforesis se lleva a cabo como se describe en lo sucesivo. Utilizando un Cassette PhastSystem (Amersham Bioscience), el gel Phast-Gel Dry IEF (Amersham Bioscience) se hincha durante aproximadamente 60 minutos con una solución de hinchamiento con la composición dada adelante.

(a) Composición de la solución de hinchamiento para un pI alto:

1.5 mL de 10% de glicerol

100 μ L de Pharmalyte 8-10.5 para IEF (Amersham Bioscience)

(b) Composición de la solución de hinchamiento para un pI bajo:

1.5 mL de agua purificada

20 μ L de Pharmalyte 8-10.5 para IEF (Amersham Bioscience)

80 μ L de Pharmalyte 5-8 para IEF (Amersham Bioscience)

Aproximadamente 0.5 μ g de anticuerpo se carga en el gel de hinchamiento y se corre la electroforesis isoeléctrica utilizando el PhastSystem (Amersham Bioscience) controlado mediante el programa descrito adelante. La muestra se agrega

al gel en la Etapa 2 de este programa. Un Kit de Calibración para el pI (Amersham Bioscience) se utiliza para los marcadores pI.

Etapa 1: 2000 V, 2.5 mA, 3.5 W, 15°C, 75 Vh

Etapa 2: 200 V, 2.5 mA, 3.5 W, 15°C, 15 Vh

Etapa 3: 2000 V, 2.5 mA, 3.5 W, 15°C, 410 Vh

Después de la electroforesis, el gel se fija con 20% de TCA y se lleva a cabo teñido de plata utilizando un Kit de Teñido de Plata, Protein (Amersham Bioscience) de acuerdo con las instrucciones suministradas con el kit. Después del teñido, el punto isoeléctrico de cada anticuerpo (muestra de prueba) se calcula con base en los puntos isoeléctricos ya conocidos de los marcadores pI. El electroforetograma de la electroforesis isoeléctrica de pI alta se muestra en la Figura 2 y el electroforetograma de la electroforesis isoeléctrica del pI bajo se muestra en la Figura 3.

(a) Modificaciones que elevan el pI

Se prepara Hspu2.2 (Hu2.2) (SEQ ID NO:6), en el cual se implementan adicionalmente las modificaciones Q43K, D52N, y Q107R en H15. También se prepara Lspu2.2 (Lu2.2) (SEQ ID NO:12) en el cual se implementan las modificaciones E17Q, Q27R, Q105R y S25A en L4, donde la modificación S25A reemplaza S25 en CDR2 con A (abundante en una línea germinal). El valor Tm del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2

(Hu2.2Lu2.2) compuesta de Hspu2.2 (Hu2.2) y Lspu2.2 (Lu2.2) se mide a 76.8°C y su valor pI se mide a 9.6. En razón a que el pI del anticuerpo H0L0 es 8.9, el pI del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) se incrementa en 0.7.

(b) Modificaciones que disminuyen el pI

Se prepara Hspd1.8 (Hd1.8) (SEQ ID NO:5), en el cual se implementan adicionalmente las modificaciones K19T, Q43E, K63S, K65Q, y G66D en H15. Se prepara Lspd1.6 (Ld1.6) (SEQ ID NO:11) al elaborar las siguientes modificaciones: la modificación Q27E en L4; la modificación KISRVE a 79-84 de FR3 en L4 a TISSLQ; y la modificación S25A para lograr la misma modificación como para Lspu2.2 (Lu2.2). El valor pI del anticuerpo Hspd1.8Lspu1.6 (Hd1.8Ld1.6) compuesta de Hspu1.8 (Hd1.8) y Lspd1.6 (Ld1.6), se mide a 7.4. En razón a que el pI del anticuerpo H0L0 es 8.9, el pI del anticuerpo Hspd1.8Lspu1.6 (Hd1.8Ld1.6) se redujo en 1.5.

(2) Evaluación mediante ELISA competitivo para la actividad de unión de los anticuerpos modificados por mutación de punto del anticuerpo H0L0

El anticuerpo H0L0 y sus anticuerpos modificados por mutación de punto purificados en (1) se evalúan mediante ELISA competitivo. Se agrega 100 µL del polipéptido de núcleo GPC3 soluble (SEQ ID NO:13) en 1µg/mL a cada pozo de una placa de 96 pozos. El polipéptido de núcleo GPC3 soluble se

inmoviliza sobre la placa al permitirle a la placa permanecer durante la noche a 4°C. El polipéptido de núcleo GPC3 soluble inmovilizado sobre la placa se lava 3 veces con un amortiguador de lavado utilizando Skan WASHER400 (Dispositivos Moleculares); y se bloquea con 200 µL de amortiguador de bloqueo a 4°C durante por lo menos 30 min. La placa de bloque sobre la cual el polipéptido de núcleo GPC3 se inmoviliza se lava entonces 3 veces con amortiguador de lavado utilizando el Skan WASHER400. Posteriormente, cada pozo de la placa recibe 200 µL de una mezcla que contiene 100 µL de anticuerpo H0L0 biotinilado (concentración final = 0.3 µg/mL) y 100 µL del anticuerpo H0L0 o su anticuerpo modificado por mutación de punto (en varias concentraciones). El anticuerpo H0L0 se biotinila utilizando un Kit de Marcación Biotin (Roche) de acuerdo con las instrucciones suministradas con el kit. La placa se deja en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se lava 5 veces con amortiguador de lavado utilizando el Skan WASHER400 (Dispositivos Moleculares). Se agregan 100 µL de alcalina fosfatasa anti-estreptavidina de cabra (ZYMED), diluida 20,000X con un amortiguador de sustrato, a cada pozo, y la placa resultante se deja en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente, y luego se lava 5 veces con amortiguador de lavado utilizando el Skan WASHER400. El sustrato de fosfatasa (Sigma) se prepara a 1mg/ml en el amortiguador de sustrato, se agrega a 100 µL por pozo durante 1 hora. La absorbancia a 405 nm de la solución de reacción en cada pozo se mide utilizando Benchmark Plus (BIO-RAD), con la

absorbancia de control a 655 nm.

Como se muestra en la Figura 4, la actividad de unión de antígeno del anticuerpo H15L4 se muestra por ser casi la misma que aquella del anticuerpo H0L0 y que se había sometido a la modificación. Además, como se muestra en la Figura 5, la actividad de unión de antígeno del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) se muestra que era aproximadamente la misma que aquella del anticuerpo H0L0 sometida a la modificación. Más aún, como se muestra en la Figura 6, la actividad de unión de antígeno del anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) se muestra por ser aproximadamente la misma que aquella del anticuerpo H0L0 sometida a la modificación.

Ejemplo de Referencia 2

Irrupción del gen transportador de fucosa en las células CHO

(1) Construcción del vector objetivo

(1-1) Construcción del vector KO1

El sitio BamHI y la secuencia TGCGC se agregan a lado 5' del codón de partida del gen de resistencia de higromicina (Hygr) mediante PCR utilizando pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen) con los cebadores Hyg5-BH y Hyg3-NT para obtener la misma secuencia que en el lado 5' del codón de partida del gen transportador de fucosa. También se agrega el sitio NotI sobre el lado 3' incluyendo la región hasta la señal de

adición de SV40 polyA. Luego el gen Hygr se divide.

Cebador delantero

Hyg5-BH 5'-GGATCCTGCGCATGAAAAAGCCTGAACTCACC-3' (SEQ ID NO: 14)

Cebador inverso

Hyg3-NT 5'-GCGGCCGCCTATTCCTTTGCCCTCGGACG-3' (SEQ ID NO: 15)

El vector objetivo transportador de fucosas ver. 1 (denominado como el vector KO1) se construye al insertar el lado 5' del transportador de fucosa (desde el SmaI al No. 2,780 de la SEQ ID NO: 16 al BamHI en el No. 4,232), el lado 3' (desde el No. 4,284 al SacI en el No. 10,934), y el fragmento Hygr en el vector pMC1DT-A (Yagi T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87, 9918-22). Un elemento característico de este vector es que, cuando ha ocurrido la recombinación homóloga, el Hygr se expresa bajo el promotor del transportador de fucosa, en razón a que un promotor no se une al gen Hygr. Sin embargo, cuando solamente se introduce una copia del vector en la célula mediante recombinación homóloga, el Hygr no se expresa siempre a un grado suficiente para exhibir la resistencia a la higromicina B. El vector KO1 se divide en el sitio NotI y se transfecta hacia la célula. Se cree que los pares de base 41 en el exón 1, que incluyen el codón de partida, se suprimirán del transportador de fucosa mediante la introducción del vector KO1, que da como resultado una pérdida de función.

(1-2) Construcción de pBSK-pgk-1-Hygr

El pBSK-pgk-1 se construye al dividir el promotor de gen pgk-1 del vector pKJ2 (Papo H., *Biochemical Genetics* (1990) 28, 299-308) con EcoRI-PstI y clonarlo en los sitios EcoRI-PstI del pBluescript (Stratagene). Con relación al Hygr, un sitio EcoT22I y una secuencia Kozak se agregan al lado 5' de Hygr y se agrega un sitio BamHI sobre el lado 3' incluyendo la región hasta la señal de adición de SV40 polyA mediante PCR utilizando pcDNA3.1/Hygro con los cebadores Hyg5-AV y Hyg3-BH. Luego se divide el gen Hygr.

Cebador delantero

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

Cebador inverso

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

El pBSK-pgk-1-Hygr se construye al insertar el fragmento Hygr (EcoT22I-BamHI) en los sitios PstI-BamHI del pBSK-pgk-1.

(1-3) Construcción del vector KO2

El vector objetivo transportador de fucosas ver. 2 (denominado posteriormente como el vector KO2) se construye al insertar el lado 5' del transportador de fucosa (desde el SmaI al No. 2,780 de la SEQ ID NO: 16 al BamHI en el No.

4,232), el lado 3' (desde el No. 4,284 al sito SacI en el No. 10,934), y el fragmento pgk-1-Hygr en el vector pMC1DT-A. A diferencia del caso para el vector KO1, el vector KO2 tiene el promotor de gen pgk-1 unido al Hygr, adquirirá así resistencia a la higromicina B aún cuando solamente una copia del vector se introduce en la célula mediante recombinación homóloga. El vector KO2 se cliva en NotI y se transfecta hacia la célula. Al introducir el vector KO2, 46 pares de en el exón 1 incluyendo el codón de partida se suprimirán del transportador de fucosa, dando como resultado una pérdida de función.

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

El vector pPUR (BD Biosciences) se cliva con PstI y BamHI y el fragmento dividido (Puror) se inserta en los sitios PstI-BamHI del pBSK-pgk-1 para construir pBSK-pgk-1-Puror.

(1-5) Construcción del vector KO3

El vector objetivo transportador de fucosas ver. 3 (denominado posteriormente como el vector KO3) se construye al insertar el lado 5' del transportador de fucosa (desde el sitio SmaI en el No. 2,780 de la SEQ ID NO: 16 al BamHI en el No. 4,232), el lado 3' (desde el No. 4,284 al sito SacI en el No. 10,934), y el fragmento pgk-1-Puror en el vector pMC1DT-A. Una secuencia para unir al cebador de selección mostrado adelante se une preliminarmente al extremo 3' del pgk-1-

Puror. El vector KO3 se cliva mediante NotI y se transfecta hacia la célula. Al introducir el vector KO3, 46 pares base en el exón 1 incluyendo el codón de partida se suprimirán del transportador de fucosa, dando como resultado una pérdida de función.

Cebador inverso

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

El gen transportador de fucosa se desactiva utilizando los tres vectores objetivo descritos anteriormente.

(2) Introducción del vector en las células CHO

El suplemento HT (Invitrogen) y penicilina-estreptomicina se agregan al CHO-S-SFMII HT-(Invitrogen), cada uno en 1/100 del volumen del CHO-S-SFMII HT- para preparar un medio de cultivo (posteriormente denominado como SFMII(+)). Las células CHO DXB11 se subcultivan en SFMII(+). Se suspenden 8×10^6 células CHO en 0.8 mL de amortiguador de fosfato de Dulbecco (Invitrogen) (denominado posteriormente como PBS). Se agregan 30 µg del vector objetivo a la suspensión de célula, y se transfirieren a una cubeta Gene Pulser (4 mm) (BioRad). Después de mantenerse durante 10 minutos en el hielo, el vector se transfecta hacia las células mediante electroporación con el GENE PULSER II (BioRad) en 1.5 kV y 25 µFD. Después de la transfección del vector, las células se suspenden en 200 mL de medio SFMII(+) y se siembran en

veintiséis placas de fondo plano de 96 pozos (Iñaki) a 100 µl/pozo. Las placas se cultivan durante 24 horas a 37°C en una incubadora CO₂, y se agrega el reactivo.

(3) "Desactivación de gen": etapa 1

El vector KO1 o el vector KO2 se transfecta hacia las células CHO, y seleccionadas con higromicina B (Invitrogen) 24 horas después de la transfección del vector. La higromicina B se disuelve en el SFMII(+) a 0.3 mg/mL, y se agrega 100 µL por pozo.

(4) Selección para los recombinantes homólogos mediante PCR

(4-1) Preparación de la muestra PCR

Los recombinantes homólogos se seleccionan mediante PCR. Las células CHO se cultivan sobre placas de fondo plano de 96 pozos, el sobrenadante del cultivo se remueve y el amortiguador de lisis de las células se agrega en 50 µL/pozo, y se incuba a 55°C durante 2 horas. Luego la proteinasa K se desactiva al calentarse a 95°C durante 15 minutos para preparar una plantilla de PCR. El amortiguador de lisis de célula se compuso de lo siguiente por pozo: 5 µL 10x LA Amortiguador II (suministrado con Takara LA Taq), 2.5 µL 10% NP-40 (Roche), 4 µL proteinasas K (20 mg/mL, Takara), y 38.5 µL de agua destilada (Nacalai Tesque).

(4-2) Condiciones PCR

La mezcla de reacción PCR estaba comprendida de 1 μ L de la muestra PCR como se describió anteriormente, 5 μ L de Amortiguador 10x LA II, 5 μ L de $MgCl_2$ (25 mM), 5 μ L de dNTP (2.5 mM), 2 μ L de cebador (10 μ M cada uno), 0.5 μ L de LA Taq (5 IU/ μ L), y 29.5 μ L de agua destilada (total de 50 μ L). Los cebadores TP-F4 y THygro-R1 se utilizan como los cebadores de PCR para seleccionar las células transfectadas del vector KO1, y los cebadores TP-F4 y THygro-R1 se utilizan como los cebadores de PCR para seleccionar las células transfectadas con el vector KO2.

La selección de PCR para las células transfectadas con vector KO1 se lleva a cabo al precalentar durante 1 minuto a 95°C; 40 ciclos de 95°C/30 segundos, 60°C/30 segundos, y 60°C/2 minutos; y 7 minutos a 72°C. La selección de PCR para las células transfectadas con vector KO2 se lleva a cabo al precalentar durante 1 minuto 95°C; 40 ciclos de 95°C/30 segundos y 7°C/3 minutos; y 7 minutos a 70°C.

Los cebadores se dan adelante. En las muestras de célula donde había ocurrido una recombinación homóloga, aproximadamente 1.6 kb de ADN se amplifica para el vector KO1 y aproximadamente 2.0 kb de ADN se amplifica para el vector KO2. El cebador TP-F4 se designa en la región genómica del transportador de fucosa sobre el lado 5' por fuera del vector, y los cebadores THygro-FI y THygro-R1 se designan en el Hygr dentro del vector.

Cebador delantero (K01, K02)

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

Cebador inverso (K01)

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

Cebador inverso (K02)

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

(5) Resultados de la selección PCR

Se analizan 918 células transfectadas con vector K01, y 1 célula se cree que era un recombinante homólogo (eficiencia de recombinación homóloga = aproximadamente 0.1%). Se analizan 537 células transfectadas con el vector K02, y 17 células se cree que eran recombinantes homólogos (eficiencia de recombinación homóloga = aproximadamente 3.2%).

(6) Análisis de "Transferencia Southern"

Se lleva a cabo la confirmación adicional mediante "Transferencia Southern". Se prepara 10 µg de ADN genómico de las células del cultivo mediante un método estándar y se someten a "Transferencia Southern". Utilizando los dos cebadores dados adelante, se prepara una sonda de 387 bp al abarcar con PCR la región desde el No. 2,113 al No. 2,500 en la secuencia de nucleótido mostrada en la SEQ ID NO:16, y

utilizada para "Transferencia Southern". El ADN genómico se cliva con BgIII.

Cebador delantero

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

Cebador inverso

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

El clivaje mediante BgIII suministra una banda de aproximadamente 3.0 desde el cromosoma transportador de fucosa, una banda de aproximadamente 4.6 kb desde el cromosoma donde ocurre la recombinación homóloga con el vector KO1, y una banda de aproximadamente 5.0 kb desde el cromosoma donde ocurre la recombinación homóloga con el vector KO2. La célula obtenida mediante recombinación homóloga con el vector KO1 y las 7 células obtenidas por recombinación homóloga con el vector KO2 se utilizan en los experimentos. La única célula obtenida con el vector KO1 se designa 5C1; sin embargo, se muestra mediante análisis posterior que comprende múltiples poblaciones de células. Así la clonación al limitar la dilución se lleva a cabo antes de utilizarla en los experimentos posteriores. Una de las células obtenidas con el vector KO2 se designa 6E2.

(7) "Desactivación de gen": etapa 2

Con el fin de establecer líneas celulares que tienen un

gen transportador de fucosa completamente efectivo, uno de los tres vectores se introduce en las células en el cual se ha logrado la recombinación homóloga mediante el vector KO1 o el vector KO2. Las combinaciones del vector/célula son como sigue: método 1: vector KO2 y células 5C1 (KO1); método 2: vector KO2 y células 6E2 (KO2); método 3: vector KO3 y células 6E2 (KO2). El vector se transfecta hacia la célula respectiva, y la selección con higromicina B y puromicina (Nacalai Tesque) inicia 24 horas después de la transfección del vector. La concentración de higromicina B final fue de 1 mg/mL en el método 1 y 7 mg/mL en el método 2. En el método 3, se agrega la higromicina B a una concentración final de 0.15 mg/mL y la puromicina se agrega a una concentración final de 8 µg/mL.

(8) Selección de PCR de los recombinantes homólogos

Las muestras se preparan como se describió anteriormente. En la selección para el método 1, ambas células en las cuales había ocurrido la recombinación homóloga con el vector KO1 y las células en las cuales había ocurrido la recombinación homóloga con el vector KO2 se detectan por medio de PCR. Los cebadores de PCR mostrados adelante se diseñados por el método 2. El TPS-F1 corresponde a la región desde el No. 3,924 al No. 3,950 en la secuencia de nucleótido mostrada en la SEQ ID NO: 16, aunque el SHygro-R1 corresponde a la región desde el No. 4,248 al 4,274. Estos cebadores de PCR amplificarán 350 bp de la región del gen transportador de

fucosa que de otra manera se suprimiría mediante el vector KO2. Por lo tanto, en la selección del PCR del método 2, las células no producen un producto de amplificación de 350 bp se consideran que son como células a las que les falta completamente el gen transportador de fucosa. Las condiciones de PCR son como sigue:

Precalentar durante 1 minuto a 95°C; 35 ciclos de amplificación de 95°C/30 segundos y 70°C/1 minuto; y recalentar a 70°C durante 7 minutos.

Cebador delantero

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

Cebador inverso

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

En el caso del método 3, el TP-F4 se utiliza como el cebador delantero y el RSGR-A se utiliza como el cebador inverso. Las condiciones del PCR son como sigue: precalentar durante 1 minuto 95°C; 35 ciclos de amplificación a 95°C/30 segundos, 60°C/30 segundos, y 72°C/2 minutos; recalentar durante 7 minutos a 72°C. Aproximadamente un ADN de 1.6 kb se amplificará de las muestras de célula en las cuales ha ocurrido la recombinación homóloga mediante el vector KO3. Mediante este PCR, se detectan las células en las cuales ha ocurrido la recombinación homóloga mediante el vector KO3, y también se confirma que las células retienen la recombinación homóloga mediante el vector KO2

(9) Resultados de la selección de PCR

18 células de 616 células analizadas mediante el método 1 se consideran como recombinantes homólogas (eficiencia de recombinación homóloga = 2.9%). 2 células de 524 células analizadas mediante el método 2 se consideran como recombinantes homólogos (eficiencia de recombinación homóloga = aproximadamente 0.4%). 7 células de 382 células analizadas mediante el método 3 se consideran como recombinantes homólogos (eficiencia de recombinación homóloga = aproximadamente 1.8%).

(10) Análisis de "Transferencia Southern"

El análisis de "Transferencia Southern" se lleva a cabo mediante el método descrito anteriormente, y se identifica 1 célula por tener el gen transportador de fucosa que estaba completamente perdido. Los resultados analíticos del PCR y el "Transferencia Southern" son consistentes en la etapa 1 de "desactivación", pero no en la etapa 2 de "desactivación".

(11) Análisis de expresión de fucosa

26 células encontradas como recombinantes homólogos Se analizan para la expresión de fucosa mediante PCR. 1×10^6 células se tiñen en 100 μ L de PBS que contiene 5 μ g/mL de aglutinina de *Lens culinaris*, conjugado FITC (Vector

Laboratory), 2.5% de FBS, y 0.02% de azida de sodio (denominada hasta aquí como solución FACS) durante 1 hora con enfriada de hielo. Las células se lavan entonces 3 veces con solución FACS y se analizan mediante un FACSCalibur (Becton Dickinson). Los resultados muestran que la expresión de la fucosa se redujo solamente en las células FTP-KO, que se encuentran por exhibir una pérdida completa del gen transportador de fucosa en el análisis "Southern blot".

Ejemplo de Referencia 3

Establecimiento de las células que producen anticuerpo derivadas de la línea FTP-KO y purificación del anticuerpo producido mediante estas células

Esta línea deficiente el transportador de fucosa obtenido en el ejemplo 1 (células FTP-KO, nombre el clon: 3F2) se subcultivan en SFMII (+) que contiene higromicina B a una concentración final de 1mg/mL. 8×10^6 3F2 se suspendan en 0.8 mL de amortiguador de fosfato de Dulbecco. 25 µg de vector de expresión del anticuerpo anti-glipican 3 humanizado se agregan la suspensión de células y se transfirieren a una cubeta Gene pulser. Después de mantener durante 10 minutos en hielo, el vector se transfecta hacia las células mediante electroporación con GENE PULSER II a 1.5 kV y 25 µFD.

Después de la trasfección del vector, las células se suspenden en 40 mL de un medio de SFMII (+) y se fundan sobre una placa con fondo plano de 96 pozos (Iwaki) a 100 µL/pozo.

Después que se incubaba la placa por 24 horas a 37°C en una incubadora de CO₂, se agrega geneticina (Invitrogen) a una concentración final de 0.5 mg/mL. La producción del anticuerpo de las células resistentes al anticuerpo se mide para obtener las líneas celulares productoras de anticuerpo anti-glipican 3.

El sobrenadante del cultivo de las líneas que expresan el anticuerpo se recolecta y se aplica a una columna hitrap rProteina (farmacia) utilizando una bomba p-1 (Pharmacia). La columna se lava con un amortiguador de unión (20mM fosfato de sodio (pH 7.0)), y el anticuerpo unido se diluye posteriormente con un amortiguador de dilución (0.1 M glicina-HCl (pH 2.7)). El eluido se neutraliza inmediatamente con amortiguador de neutralización (1 M Tris-HCl (pH 9.0)). Las fracciones de anticuerpo diluidas se seleccionan utilizando un ensayo de proteína DC (BioRad) y agrupadas, y se concentran a aproximadamente 2 mL con un centriprep-YM10 (MILLIPORE). La solución concentrada se somete a filtración de gel sobre el superdex 200 26/60 (farmacia) equilibrada con 20 mM amortiguador de ácido acético (pH 6.0) que contiene 150 mM NaCl. El pico de la fracción del monómero en el eluido se recolecta y se concentra con centriprep-YM10. La solución concentrada se filtra utilizando un MILLEX-GW 0.22 µm de unidad de filtro (MILLIPORE) y se almacena a 4°C. la concentración del anticuerpo purificado se determina mediante el cálculo del coeficiente de la absorción molar con base en la absorbancia a 280 nm.

Ejemplo de referencia 4**Análisis de las cadenas de azúcar unidas al anticuerpo anti-glipican 3 humanizado producido mediante las células FTP-KO**

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

El anticuerpo de la presente invención producido mediante las células FTP-KO y el anticuerpo producido mediante las células CHO (control) se trato con N-glicosidasa (Roche Diagnostics) para liberar las cadenas de azúcar unidas al anticuerpo (Weitzhandler M. et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences* (1994) 83(12), 1670-5). After deproteination with ethanol (Schenk B. et al., *The Journal of Clinical Investigation* (2001), 108(11), 1687-95), las cadenas de azúcar liberadas se concentran hasta secado y se marcan en forma fluorescente con 2-aminopiridina (Bigge J. C. et al., *Analytical Biochemistry* (1995) 230(2), 229-238). Las cadenas marcadas con el 2-AB resultante se separan del reactivo mediante una extracción de fase solida utilizando un cartucho de celulosa, concentrado mediante centrifugación para obtener cadenas de azúcar marcadas con 2-AB purificadas. Las cadenas marcadas con 2-AB purificadas se tratan con β -galactosidasa (Seikagaku Kogyo Co., Ltd.) para preparar las cadenas de azúcar marcadas con agalactosil 2-AB que se analizan como se describe adelante.

(2) Análisis de las cadenas de azúcar marcadas con

agalactosil 2-AB mediante HPLC fase normal

Las cadenas de azúcar marcadas con agalactosil 2-AB se preparan mediante el método anteriormente descrito, las cadenas de azúcar liberadas del anticuerpo de la presente invención producidas mediante las células FTP-KO y el anticuerpo producidas mediante las células CHO (control), son analizadas mediante HPLC de fase normal por una columna de TSKgel amida 80 amida (TOSOH Corp.) y se comparaba los cromatogramas. Las siguientes evaluaciones se hacen con respecto a los anticuerpos producidos mediante células CHO: G (0) estuvo presente como el componente principal de las cadenas de azúcar, aunque la fucosa a la que le faltaba G (0)- FUC cuenta con aproximadamente 4% del total, como se evalúa mediante el cálculo de la proporción de área de pico. En el caso del anticuerpo producido mediante FTP-KO el G (0) fue el componente principal. Para todas las líneas celulares que producen el anticuerpo, al menos el 90% de la cadena de azúcar total el anticuerpo producido fue de cadenas de azúcar libres de fucosa, como se evalúa mediante el cálculo de la proporción de área pico.

Tabla 1.

Proporciones relativas de cada cadena de azúcar estimada desde HPLC de fase normal de las cadenas de azúcar marcadas de agalactosil 2-AB

Cadena de azúcar	CHO	FTP-KO-a	FTP-KO-b	FTP-KO-c
G(0)-Fuc	4.0%	92.4%	92.5%	93.2%
G(0)	96.0%	7.6%	7.5%	6.8%

Ejemplo 5

De líneas celulares que expresan establemente el anticuerpo H0L0 humanizado y anticuerpos modificados con mutación de punto

Los genes que codifican el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2), el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) los anticuerpos (modificados con la fuente H0L0 producidos mediante el método descrito en el ejemplo 1) o el anticuerpo suministrado a las modificaciones se clonan en un vector de expresión. En la clonación, los genes que codifican la cadena pesada y la cadena ligera se insertan en diferentes vectores de expresión con el fin de expresar cada gen que codifica la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo. Dos vectores de expresión se suministran para expresar una combinación deseada de los genes que codifican la cadena pesada y la cadena ligera como se describió anteriormente, digeridas con PvuI y transfectadas mediante electroporación en la línea FTP-KO producida en el ejemplo de referencia 2.

Los transformantes que producen establemente el anticuerpo H0L0 o el anticuerpo modificado se preparan mediante electroporación utilizando el gene pulse II (BioRad). Las

células 0.75 ml de células CHO (1×10^7 célula/mL) suspendidas se mezclan con 10 µg cada una del ADN del plásmido de expresión que proporciona la combinación deseada de cadena pesada y la cadena ligera, y la mezcla se dejó en reposo sobre hielo durante aproximadamente 10 minutos. La mezcla se transfiere a una cubeta gene pulse II y se aplica un pulso eléctrico de 1.5 kV a una capacitancia de 25 µFD. La mezcla pulsada se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente y suspendida en un medio CHO-S-SFMII/1% HT/1% PS. 100 µL de la transuspensión diluida (5 veces, 10 veces, y 50 veces, hecho en el mismo medio) se agregan a 96 placas de cultivo de 96 pozos. Las placas se incuban durante 24 horas en una incubadora de CO₂ mantenidas a 5% de CO₂. Luego, la geneticina se agrega (Gibco) a cada pozo a una concentración final de 500 µg/mL de zeocina (Invitrogen) y se agrega a cada pozo a una concentración final de 600 µg/mL. Las placas se incuban durante 2 semanas. Las colonias de las células transformadas que exhiben resistencia geneticina y zeocina se seleccionan además por subcultivo del mismo medio que contiene 500 µg/mL de geneticina (Gibco) y 600 µg /mL de zeocina (Invitrogen). El sobrenadante del cultivo de las células formadas de esta manera se evalúa la concentración de anticuerpo utilizando BiacoreQ (Biacore) establecer las líneas de célula transformante que expresan el anticuerpo deseado a un nivel alto. La concentración de anticuerpo en el sobrenadante del cultivo se mide de acuerdo con las instrucciones subministradas por el BiacoreQ (Biacore). La línea de células establecida se cultivo en un medio CHO-S-

SFMII (Invitrogen) que contiene 500 µg/mL de geneticina (Invitrogen) y 600 µg/mL de zeocina (Invitrogen). Después de cultivar durante un periodo apropiado de tiempo, el sobrenadante de cultivo se recolecta, y se purifica utilizando una columna de rProteínaA-Sefarosa (GE Helathcare). El anticuerpo purificado se concentra con Amicon Ultra-4 (MILLIPORE) y se somete a un intercambio de amortiguador sobre la columna de estabilización PD-10 (Amersham Biosciences) con 20 mM de amortiguador de ácido acético (pH6.0) que contiene 200mM de NaCl. El anticuerpo purificado es cuantificado mediante la absorción a 280nm en espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop) o espectrofotómetro DU-600 (BECKMAN). La concentración del anticuerpo se calcula con el método RACE.

Ejemplo 6

Eficacia terapéutica en un modelo in vivo del anticuerpo H0L0 humanizado y los anticuerpos modificados con mutación.

(1) Mantenimiento de la vida celular utilizada para el trasplante en el modelo in vivo

Se utilizan células HepG2 (ATCC). Las células HepG2 se mantienen mediante subcultivos en un medio esencial y mínimo de Eagle (Sigma) que contiene piruvato de sodio (invitrogen) a 1 mmol/L MEM y aminoácidos no esenciales (Invitrogen) a 1 mmol/L MEM (este medio se denomina como medio de subcultivo).

(2) Preparación del modelo de ratón trasplantado con célula HepG2

Utilizando una solución que contiene el medio de subcultivo y la matriz MATRIGEL (BD Bioscience) a 1:1, se prepara una suspensión de células HepG2 a 5×10^7 células/mL. 100 μ L de la suspensión de células (5×10^6 células/ratón) se trasplantan subcutáneamente en la región abdominal de los ratones SCID y de (macho, 5 semanas de edad, CLEA Japón, INC.). En el día antes del trasplante celular, el ratón recibe 100 μ L de anticuerpo de anti-asialo GM1 (el contenido de un frasco se disuelve en 5 mL de la solución anteriormente mencionada, wako pure chemical Industries, Ltd.) mediante administración intraabdominal. El volumen del tumor se calcula de acuerdo con siguiente fórmula

$$\text{Volumen de tumor} = \text{diámetro largo} \times \text{diámetro corto} \times \text{diámetro corto} / 2$$

Cuando el volumen del tumor promedio alcanza 130 a 330 mm^3 , el ratón se utiliza como un modelo aparte.

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

La administración del anticuerpo H0L0 de las muestras que contienen el anticuerpo Hu2.2Lu2.2, o el anticuerpo

Hd1.8Ld1.6 y en 0.5 mg/mL (5 mg/kg grupos) o 0.1 mg/mL (1 mg/kg grupo) se preparan con solución salina fisiológica en el día de la administración.

(4) La administración de la muestra de administración que contiene anticuerpo

La muestra de administración prepara de acuerdo con (3) se administra a una dosis de 10 mL/kg a través de la vena de la cola al modelo de ratón preparado en (2) y una vez por semana durante tres semanas que inician 27 días después del trasplante de la célula HepG2. Como control negativo, se administra solución salina fisiológica en una dosis de 10 mL/kg a través de la vena de la cola a una vez por semana durante tres semanas. Todos los grupos contenían 5 animales, y cada muestra de administración que contiene el anticuerpo de la prueba se administra a un grupo respectivo. En aproximadamente el mismo tiempo que la administración, se recolecta la sangre venosa de 3 animales en cada grupo se analizo para la concentración de sangre murina del anticuerpo. Específicamente, la sangre se recolecta de la vena de la pata dorsal en dos puntos de tiempo: 0.5 horas después de la administración inicial e inmediatamente antes de la segunda administración. 20 μ L de la sangre recolectada se trato con heparina y el plasma se aísla mediante centrifugación.

(5) Evaluación de la actividad antitumoral de los

anticuerpos de prueba

La actividad antitumoral de cada cuerpo depende de la prueba se evalúa mediante el modelo de ratón trasplantado con el cáncer de hígado humano. El volumen del tumor se mide una semana después del último día de la administración de la muestra. Los resultados se muestran en la figura 7. El anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) mostro una eficacia terapéutica mayor, aunque el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) mostro una eficacia terapéutica débil.

(6) Concentraciones sanguíneas de los anticuerpos de prueba

(7)

La concentración del anticuerpo de prueba en el plasma de murino se mide mediante un método basado en ELISA en el ejemplo 1. Las muestras estándar se preparan en la concentración de plasma de 12.8, 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, y 0.2 µg/mL. Las muestras estándar y las muestras de prueba del plasma de murino (adecuadamente diluidas a una concentración deseada) se agregan a inmunoplasmas (Nunc-ImmunoPlate, MaxiSorp (Nalge Nunc International)) sobre el cual se inmovilizo el núcleo de glipican 3 soluble (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha) y las placas se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. El IgG-BIOT antihumano de cabra (Southern Biotechnology Associates) y luego el conjugado de estreptavidina- fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics) se agregan y se efectúa una reacción cromogénica utilizando los sistemas de sustratos "BluePhos Microwell Phosphatase"

(Kirkegaard & Perry Laboratories) como un sustrato. Utilizando un lector de microplaca, el color de la solución de reacción en cada pozo se determina al medir la absorbancia de la solución a 600 nM. La concentración de absorción del anticuerpo de plasma de murino se calcula entonces utilizando un software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices) con referencia a la curva estándar preparada con los valores de absorbancia obtenidos para las muestras estándar.

Las concentraciones de plasma de murino después de 30 minutos y 7 días desde la administración se muestran en la figura 8. Una concentración de anticuerpo mayor se observó en el plasma murino después de 7 días desde la administración del anticuerpo de prueba que tiene unos valores de pI inferiores tanto para ambas dosis de administración probadas.

Ejemplo 7

Actividad ADCC de los anticuerpos de prueba medidos utilizando los monocitos de sangre periférica humana como la célula efectora

La actividad ADCC de los anticuerpos de prueba se prueba como se describe adelante utilizando el monocito de sangre periférica humana (denominado como PBMC) como la célula efectora.

(1) Preparación de la solución de PBMC humana

Utilizando una jeringa previamente cargada con 200 μ L a 1000 unidad/mL de solución heparina (inyecciones de heparina Novo 5000 unidades, Novo Nordisk), 50 mL de sangre periférica se recolectan de un voluntario saludable (macho adulto) de Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha. La sangre se diluye dos veces con PBS (-), se divide en 4 partes iguales y se introduce en un tubo de separación Leucosep linfocito (Greiner Bio-one) que se carga previamente con 15 mL de Ficoll-paque plus y se somete a centrifugación. El tubo de separación se carga con la sangre periférica se centrifuga durante 10 minutos a temperatura ambiente a 2150 rpm, y la capa de fracción de monocito se recolecta. Las células contenidas en la capa se lavan una vez con medio de Eagle modificado (Sigma) que contiene 10% de FBS (mencionado adelante, 10% FBS/D-MEM) y suspendido en 10% FBS/D-MEM a una densidad celular de 5×10^6 /mL. La suspensión de célula se somete al siguiente experimento como una solución PBMC humana.

(2) Preparación de las células objetivo

Las células HepG2 se separan de un disco y sembradas sobre una placa con fondo en una placa de 96 pozos a 1×10^4 células/pozo. La placa se incuba durante toda la noche a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5%. Al siguiente día se agregan, 5,5 MBq CR-51 en cada pozo y la placa se incuba durante 3 horas a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5%. Las células HepG2 contenidas en los pozos de la placa se utilizan como las

células objetivo en el ensayo de actividad ADCC como se describe adelante.

(3) Ensayo de liberación de cromo (actividad ADCC)

La actividad ADCC se evalúa de la tasa de liberación de cromo específica determinada mediante el método liberación de cromo. Las células objetivo preparadas como en (2) se lavan en un medio, 100 µL de cada anticuerpo (anticuerpo H0L0, anticuerpo Hu.2Lu2.2, o anticuerpo Hd1.8Ld1.6) se agregan a una concentración de 0, 0.004, 0.04, 0.4, 4, or 40 µg/mL. La placa reacciona durante 15 minutos a temperatura ambiente, y la solución del anticuerpo se remueve. 100 µL de un medio de subcultivo se agrega a cada pozo y la placa se incuba durante 1 hora a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5%. 100 µL de la solución PEMC humana se prepara como en (1) se agrega a cada pozo (5 x 10⁵ células/pozo), y la placa se incuba durante 4 horas a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂ y se centrifuga. La radiactividad en 100 µL del sobrenadante de cultivo en cada pozo de la placa se mide mediante un contador gama. La tasa de liberación de cromo específico se determina de acuerdo con la siguiente fórmula

Tasa de liberación específico (%) =

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

en donde A representa el valor medio de la radioactividad (cpm) de los 100 µL de sobrenadante de cultivo en cada pozo;

B representa el valor medio de la radioactividad (cpm) de 100 μ L del sobrenadante de cultivo en donde 100 μ L de la solución de NP-40 2% acuosa (Nonidet P-40, Nacalai Tesque) y 50 μ L de 10% de medio FBS/D-MEM se agregan a las células objetivo; y C representa el valor medio de la radioactividad (cpm) de 100 μ L del sobrenadante de cultivo en pozos donde 150 μ L de 10% de medio FBS/D-MEM se agregan a las células objetivo. Las pruebas se llevan a cabo en triplicado, y el valor medio y la desviación estándar de la tasa de liberación de cromo específica (%), que es el reflejo de la actividad ADCC del anticuerpo, se calculan los resultados de la prueba.

(4) Evaluación de la actividad ADCC de los anticuerpos de prueba

Los resultados de la evaluación de la actividad ADCC exhibidas por los PBMC humanos por vía del anticuerpo de prueba revelan que todos los anticuerpos de prueba exhibían la actividad ADCC. Los resultados son mostrados en la figura 9. Las pruebas de significancia revelan que ninguna no existía diferencia significativa se observó entre los anticuerpos de prueba a cualquiera de las concentraciones probadas en la tasa de liberación de cromo específica de los anticuerpos de prueba. Los análisis estadísticos se corren utilizando el pre clinical SAS package (SAS Institute Inc.). Estos resultados muestran que no había diferencia entre las actividades ADCC y los anticuerpos de prueba modificados con pI modificado.

Ejemplo 8**Preparación y caracterización del anticuerpo con pI modificado por mutación de punto**

(1) Selección de los sitios de modificación para disminuir el pI

Para mejorar la actividad de supresión del anticuerpo Hd1.8Ld1.6, los sitios de modificación se seleccionan para por la capacidad de disminuir en el valor pI de la región variable. Los residuos de aminoácido que involucran la disminución del valor pI en la región variable se encuentran, los cuales se resumen en la tabla 2 (cadena pesada) y la tabla 3 (cadena ligera). Ejemplos específicos de estas modificaciones para disminuir el valor pI son el anticuerpo pH7pL14 y el anticuerpo pH7pL16. Estos anticuerpos de modificación se preparan como sigue.

Los sitios de modificación se crean mediante Montaje de PCR. Los oligo ADN designados con base en las secuencias codificante y anticodificante que contienen el sitio de modificación se sintetizan. Un par de oligo ADN contrasentido que contienen el sitio de modificación y un oligo ADN codificante que corresponden al vector que lleva el gen a ser modificado, o un par de oligo ADN codificante que contienen el sitio de modificación y el oligo ADN contrasentido que corresponde al vector que lleva al gen a ser modificado se

utiliza en PCR con el PrimeStar (TAKARA) para obtener los fragmentos del lado 5' y del lado 3' que contienen el sitio de modificación. Los dos fragmentos se ligan utilizando un Montaje de PCR para preparar cada mutante.

El mutante así obtenido se inserto en un vector de expresión que permite la expresión del gen insertado en las células animales. La secuencia del nucleótido del vector de expresión se determina mediante un método conocido en la técnica. La introducción de la mutación de punto se confirmo mediante la secuencia de nucleótido del AND de plácido. El gen que contiene la mutación de puntos se clono en un vector de expresión que permite la expresión del gen insertado en las células animales. La expresión y la purificación del anticuerpo fue de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 1 o un método similar.

Partiendo del HD1.8, la 61ava glutamina (Q) (de acuerdo a la numeración kabat) presente en CDR1 de Hd1.8 se sustituye con ácido bultanico (E) para preparar pH7 (SEQ ID NO:27). Partiendo desde LD1.6, la 24ava arginina (R) (de acuerdo a la numeración Kabat) presente en CDR1 del LD1.6 se sustituye con glutamina (Q), la 37ava glutamina (Q) se sustituye con leucina (L), la 43ava alanina (A) se sustituye con serina (S), la 45ava arginnina (R) se sustituye con glutamina (Q), la 74avo teronina (T) se sustituye con lisina (K), la 77ava serina (S) se sustituye con arginina (R), la 78ava leucina (L) se sustituye con valina (V), y la 79ava glutamina (Q) se

sustituye con ácido glutámico (E), cada una presente en FR2 y FR3, para preparar pL14 (SEQ ID NO:28).

Partiendo del pL14, la 104ava leucina (L) (de acuerdo a la numeración Kabat) se sustituye con valina (V), la 107ava lisina (K) se sustituye con ácido glutámico (E), cada una presente en FR4 de pL14, para preparar pL16 (SEQ ID NO: 29).

(2) Medición del valor pI de los anticuerpos modificados de los anticuerpos con pI modificados con mutación de punto

Los valores pI del anticuerpo Hd1.8Ld1.6, el anticuerpo pH7pL14 y el anticuerpo pH7pL16 se miden mediante electroforesis con PhastGel IEF 4-6.5 (GE Healthcare) utilizando el método descrito en el ejemplo 1 o un método similar. El valor pI del anticuerpo Hd1.8Ld1.6, el anticuerpo pH7pL14 y el anticuerpo pH7pL16 fue de 7.47, 7.07 y 6.52, 1, respectivamente indicando que los valores del anticuerpo pH7pL14 y el anticuerpo pH7pL16 se utilizan inferiores que aquel Hd1.8Ld1.6 por 0.4 y 0.95, respectivamente.

(3) Los anticuerpos modificados con pI y mutación de punto

Los valores Tm de los Fabs obtenidos del anticuerpo Hd1.8Ld1.6, y el anticuerpo pH7pL14, y anticuerpo pH7pL16 se miden con un VP-DSC (Micro Cal) utilizando el método similar al ejemplo 1. En este experimento, el PBS se utiliza como una solución de diálisis, y la concentración del anticuerpo de la

solución de prueba para DSC se ajusto a 25-100 µg/ml. La exploración DSC se ajusta de 20°C a 115°C a una tasa de exploración de aproximadamente 4K/min, con una solución de referencia (solución de diálisis) y la solución de prueba de medición DSC. La temperatura de punto medio de desnaturalización térmica de Fabs del anticuerpo Hd1.8Ld1.6 anticuerpo pH7pL14, y anticuerpo pH7pL16 fue de 77.5, 78.0 y 74.7 °C respectivamente.

(4) Evaluación de la actividad de unión del antígeno de los anticuerpos machacados de Ep mediante ELISA competitivo.

La actividad de unión al antígeno glipican 3 es de cada anticuerpo modificado con pI utilizando el método descrito en el ejemplo 1 (figura 10). La actividad de un ion al glipican 3 del anticuerpo pH7pL14 y el anticuerpo pH7pL16 se mostro por ser comparativa con aquella del anticuerpo H0L0.

Ejemplo 9

Preparación del anticuerpo modificado con p y modificado con mutación de conducta utilizando la estirpe celular FTP-KO.

El vector de expresión que lleva el gen que codifica para cada punto de mutación para cada anticuerpo modificado con P y modificado con mutación de puntos preparado en el ejemplo 8 se introduce en las células de la estirpe celular FTP-KO como preparaba el ejemplo de referencia utilizando polietilenoimina (Polysciences Inc.), y se expresa el

anticuerpo. El anticuerpo modificado se purifica del sobrenadante del cultivo celular utilizando una R proteína Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences). La solución de anticuerpo purificada se prepara de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 5 y se mide la concentración del anticuerpo.

Ejemplo 10

Eficacia terapéutica en un modelo vivo de anticuerpo GC33 humanizado y los anticuerpos con P y modificados con mutación pI.

(1) Mantenimiento de las líneas utilizada para el trasplante en el modelo in vivo.

Las células Hep G2 (ATCC) se utilizan. Las células Hep G2 se mantienen mediante subcultivo en un medio Minimum Essential Medium Eagle (SIGMA) suplementado con 10 % de FBS, 1 mol/l MEM epiroato de sodio (Invitrogen), y 1 mmol/l MEM aminoácidos no esenciales (Invitrogen) (denominado como medio de subcultivo).

(2) Preparación del modelo de ratón transportado con célula HepG2.

Utilizando una solución que contiene medio de subcultivo y una matriz matrigel (BD Bioscience) a 1:1, se prepara una suspensión de células HepG2 a 5×10^7 células/ml. 100 μ L de

suspensión de célula (5×10^6 células/ratón) se trasplantan subcutáneamente la región abdominal de los ratones SCID (macho), 5 semanas de edad, CLEA Japón, Inc.). En el día antes al trasplante de la célula, los ratones reciben 100 de anti-asialo 100 de anticuerpo anti-asialo (G11) (el contenido de un frasco se disuelve en 5ml en la solución, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) mediante administración intraabdominal el volumen tumoral se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula

Volumen tumoral=diámetro largo x diámetro corto /2.

Cuando el volumen del tumor promedio alcanzo 400 mm^3 el ratón se utiliza como un modelo.

(3) Preparación de la muestra de administración que contiene el anticuerpo de prueba.

La administración que contienen el anticuerpo H0L0, el anticuerpo Hd1.8Ld1.6, el anticuerpo pH7pL14 o pH7pL16 anticuerpo en 0.1 mg/mL un (1 mg/kg grupo) se preparaba con solución salina fisiológica en el día de la administración.

(4) La administración de la muestra de administración que contiene anticuerpo.

La muestra de administración preparada de acuerdo (3) se administra a una dosis de 10 mL/kg a través de la vena de la

cola al modelo de ratón preparado en (2) a una vez por semana durante 5 semanas que inician 34 días después del trasplante de la célula HpeG2. Como un control negativo la solución salina fisiológica se suministra a una dosis de 10 mL/kg a través de la vena de la cola una vez por semana durante 5 semanas. Todos los grupos contenían 5 animales, de cada muestra de la administración que contenía el anticuerpo de prueba se le administro a un grupo respectivo. A aproximadamente el mismo tiempo de la administración se le conecto por sangre venosa de tres animales de cada grupo y se analizo para concentración de sangre de murino del anticuerpo. Específicamente, la sangre se recolecta de una vena dorsal del pie en dos puntos de tiempo: 0.5 horas después de la administración inicial e inmediatamente antes de la segunda administración. 20 μ L de sangre recolectada se trato con heparina y el plasma se aísla mediante configuración.

(5) evaluación de la actividad antitumoral de los anticuerpos de prueba.

La actividad antitumoral de cada anticuerpo de prueba se evalúa en el modelo de ratón trasplantado con cáncer de hígado de humano. El volumen tumoral se mide a una semana después del último día de la administración de la muestra. Como se muestra en la figura 11, la eficacia terapéutica más fuerte se encuentra en el anticuerpo pH7pL14 el anticuerpo pH7pL16 comparado con el anticuerpo H0L0 y el anticuerpo

Hd1.8Ld1.6.

Ejemplo 11

La prueba PK del anticuerpo GC33 humanizado y los anticuerpos de mutación de punto utilizando modelo in vivo.

- (1) La preparación de la muestra que contiene anticuerpo.

Las manchas de administración que contienen el anticuerpo H0L0, anticuerpo Hd1.8Ld1.6, anticuerpo pH7pL14, anticuerpo pH7pL16 o anticuerpo pH7M85pL16 a 0.5mg/mL (5 mg/kg grupo) se preparan con solución salina fisiológica en el día de la administración.

- (2) Administración de la muestra que contiene anticuerpo.

La muestra de administración preparada de acuerdo con (1) se administra una dosis de 10mL/kg a través de la vena de la cola al ratón C.B-17/Icr-scid. Todos los grupos contenían 3 animales, y cada muestra de administración que contenía anticuerpo de pruebas se administra a un grupo respectivo. Se recolecta sangre venosa de los animales y se analiza para la concentración de sangre de murino del anticuerpo. Específicamente, la sangre se recolecta de la vena dorsal del pie del 7 punto de tiempo: 0.5 horas, 2 horas, 8 horas, 24 horas, 72 horas, 168 horas después de la administración inicial. 20 µL de sangre recolectada se trata con el plasma y el plasma se aísla mediante centrifugación.

(3) Concentraciones de sangre de los anticuerpos de prueba

La concentración del anticuerpo de prueba en plasma de murino se mide en un método basado en ELISA que se describe en el ejemplo 6. Las muestras estándar se preparan a una concentración estándar de 12.8, 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, and 0.2 µg/mL. Las muestras estándar y las muestras de plasma de murino (adecuadamente diluidas a una concentración deseada) se agregan a inmunoplasacas (Nunc-ImmunoPlate, MaxiSorp (Nalge Nunc International)) la cual se inmovilizo el núcleo de glicoproteína 3 soluble (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), y las placas se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. El IgG-BIOT anti humano de cabra (Southern Biotechnology Associates) y luego el conjugado de estresptavidina-alcalina (Roche Diagnostics) se agrega, y se efectuo una una reacción cromogenica utilizando el sistema de substratos de BluePhos Microwell fosfatasa (Kirkegaard & Perry Laboratories) como un substrato. Utilizando un lector de microplaca, el color de la solución de reacción se determina en cada pozo al medir la absorbancia de la solución de reacción a 650 nm. La concentración del anticuerpo de plasma de murino se calcula entonces utilizando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices) con referencia a la curva estándar preparada con los valores de absorbancia obtenidos de las muestras estándar.

Las concentraciones de anticuerpos de plasma de murino

después de la administración se muestran en la figura 12. Una concentración de anticuerpo mayor se observó en el plasma de ratones que reciben el anticuerpo de prueba tienen un valor de pI inferior.

Ejemplo 12

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

La actividad ADCC de los anticuerpos de prueba se probó como se describe adelante utilizando el monocito de sangre periférica humana (denominado como PBMC) como célula efectora.

(1) Preparación de la solución PBMC humana

Utilizando una jeringa previamente cargada con 200 µL de 1000 unidad/mL de solución heparina (inyección de heparina Novo 5000 unidades, Novo nordisk), 50 mL de sangre periférica que se recolecta de un donador saludable (macho, adulto) de Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha. La sangre se diluye dos veces con PBS (-), se divide en 4 partes iguales y en un tubo de separación de linfocito leucosep (Greiner Bio-one) que se carga previamente con 15 mL Ficoll-Paque PLUS y se somete a centrifugación. El tubo de separación cargado con sangre periférica y se centrifuga durante 10 minutos a temperatura ambiente a 2150 rpm, y se recolecta la capa de fracción de monocito. Las células contenidas en la capa se lavan una vez

con medio de Eagle modificado con Dulbecco (Sigma) que contiene 10% de FBS (denominado adelante como 10% FBS/D-MEM) y suspendido en 10% FBS/D-MEM a una densidad celular de 5×10^6 /mL. La suspensión de las células se somete al siguiente experimento como una solución de PBM.

(2) Preparación de las células objetivo

Las células HepG2 se separan de un disco y se siembran sobre una placa con fondo en 96 pozos a 1×10^4 células/pozo. la placa se incuba durante toda la noche a 37°C en una incubadora al 5% de CO₂. Al siguiente día, se agregan 5.55 MBq Cr-51 a cada pozo de la placa y la placa se incuba durante 3 horas a 37°C en una incubadora al 5% de CO₂. Las células HepG2 contenidas en los pozos de las placas se utilizan como células objetivo en el ensayo de la actividad ADCC como se describe adelante.

(3) Ensayo de liberación de cromo (actividad ADCC)

La actividad ADCC se evalúa de la tasa de liberación de cromo específica determinada por el método de liberación de cromo. Las células objetivo preparadas como en (2) son lavadas con un medio, y 100 µL de cada anticuerpo (anticuerpo H0L0, anticuerpo Hd1.8Ld1.6, anticuerpo pH7pL14 o anticuerpo pH7pL16) se agrega a una concentración de 0, 0.004, 0.04, 0.4, 4, o 40 µg/mL. La placa reacciona durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se remueve la solución del

anticuerpo. 100 μ L de medio de subcultivo se agrega a cada pozo y la placa se incuba durante 1 hora a 37°C en una incubadora con 5% CO₂. 100 μ L de solución de PBMC humano preparado como en (1) se agrega a cada pozo (5×10^5 células/pozo) y la placa se incuba durante 4 horas a 37°C en una incubadora con 5% CO₂, y se centrifuga. La radioactividad en 100 μ L del sobrenadante de cultivo en cada pozo de la placa se mide mediante un contador gama. La tasa de liberación de cromo específico se determina de acuerdo con la siguiente fórmula

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

En donde A representa el valor medio de la radioactividad (cpm) de los 100 μ L de sobrenadante de cultivo en cada pozo; B representa el valor medio de la radioactividad (cpm) de 100 μ L del sobrenadante de cultivo en donde 100 μ L de la solución de NP-40 2% acuosa (Nonidet P-40, Nacalai Tesque) y 50 μ L de 10% de medio FBS/D-MEM se agregan a las células objetivo; y C representa el valor medio de la radioactividad (cpm) de 100 μ L del sobrenadante de cultivo en pozos donde 150 μ L de 10% de medio FBS/D-MEM se agregan a las células objetivo. Las pruebas se llevan a cabo en triplicado, y el valor medio y la desviación estándar de la tasa de liberación de cromo específica (%), que es el reflejo de la actividad ADCC del anticuerpo, se calculan los resultados de la prueba.

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

prueba

Los resultados de la evaluación de la actividad ADCC exhibidas por los PBMC humanos por vía del anticuerpo de prueba revelan que todos los anticuerpos de prueba exhibían la actividad ADCC. Los resultados son mostrados en la figura 9. Las pruebas de significancia revelan que ninguna no existía diferencia significativa se observo entre los anticuerpos de prueba a cualquiera de las concentraciones probadas en la tasa de liberación de cromo específica de los anticuerpos de prueba. Los análisis estadísticos se corren utilizando el pre clinical SAS package (SAS Institute Inc.). Estos resultados muestran que no había diferencia entre las actividades ADCC de los anticuerpos de prueba modificados con pI modificado.

Ejemplo 13

Preparación y evaluación de los anticuerpos modificados capaces de disminuir en el valor con pI de la región constante con pI

(1) Selección de los sitios de modificación para disminuir el pI de la región constante

IgG1ΔGK (SEQ ID NO: 32) es la región constante IgG1 que tiene la secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 31, a la que le falta el 446avo Gly y el 447avo Lys (de acuerdo a la numeración EU) y la región constante IgG1. La

supresión de estos dos residuos de aminoácidos permiten la disminución en la heterogeneidad causada por la región constante determinante de cadena pesada de un anticuerpo.

El anticuerpo se modifica para tener un valor pI disminuido en la región constante al sustituir algunos de los residuos de aminoácidos en el IgG1ΔGK con los residuos de aminoácidos correspondientes en la secuencia de la región constante IgG4 humana (de acuerdo con la numeración EU.)

Específicamente, la 268ava histidina (H) del IgG1ΔGK (de acuerdo con la numeración EU) se sustituye con glutamina (Q) de la secuencia IgG4, la lisina 274ava (K) se sustituye con glutamina (Q), la 355ava arginina (R) se sustituye con glutamina (Q), el 356 de ácido aspártico (D) se sustituye con ácido de glutamina (E), la 358ava leucina (L) se sustituye con metionina (M), y la 419ava glutamina (Q) se sustituye con glutamina ácida (E). Estas sustituciones solo contienen la secuencia de 9-12 aminoácidos derivados de una región constante que puede servir como epítipo de la célula T y así se espera que tenga un menor riesgo de inmunogenicidad. Estas 6 modificaciones fueron en el IgG1ΔGK para obtener M85 (SEQ ID NO:33).

La región constante M85 se combina con la región variable pH7 y H0 para preparar pH7M85 (SEQ ID NO: 34) Y HOM85 (SEQ ID NO:35), respectivamente. El anticuerpo HOM85L0 se prepara del HOM85 como la cadena pesada y L0 como la cadena ligera, y el

anticuerpo Ph7M85pL16 se prepara del pH7M85 como la cadena pesada y pL16 como la cadena ligera ligera. También, el anticuerpo H0L0 y el anticuerpo pH7pL16 que tiene la región constante de IgG1 se prepara como el Ejemplo 1 y el Ejemplo 8. Los anticuerpos H0M85L0, Ph7m85PL16, H0L0, y Ph7pL16 se expresan en la estirpe celular ETP-KO o las células HEK293, y se purifica como se describió en el Ejemplo 1 o 9.

(2) Medición del valor de pI de los anticuerpos de pI modificados de región constante.

El valor de pI del anticuerpo H0L0, el anticuerpo H0M85L0, el anticuerpo pH7PL16, y el anticuerpo pH7m85pL16 se mide mediante electroforesis con PhastGelIEF 4-6.5 (Ge Healthcare) bajo las mismas condiciones de electroforesis utilizando el método similar a aquel descrito en el Ejemplo 1. Los valores de pI de anticuerpo H0L0, del anticuerpo H0M85L0, el anticuerpo Ph7pL16 y el anticuerpo pH7M85PL16 fue de 8.85, 8.16, 6.52 y 5.78, respectivamente, indicando que la modificación de la región constante contribuye a disminuir adicionalmente el valor de pI sin afectar la inmunogenicidad del anticuerpo.

(3) La evaluación de la actividad de unión de la región de los anticuerpos modificados y de la región constante mediante ELISA competitivo.

La actividad de unión al antígeno de cada anticuerpo con

pI modificado con región constante se mide utilizando el método descrito en el Ejemplo 1 (Figura 14). La actividad de unión al glificante es del anticuerpo H0L0 el anticuerpo HOM85L0, y el anticuerpo pH7PL16 el anticuerpo pHM85pL16 se muestran por ser casi los mismos.

Ejemplo 14

Actividad ADCC de los anticuerpo pI modificados de región constante utilizando monolitos de sangre periférica como célula aceptadora.

La actividad ADCC del anticuerpo pH7pL16 y el anticuerpo pH7M85pL16 se prueba utilizando el método como se describió EN EL Ejemplo 12. Los resultados se muestran en la Figura 15. La prueba de significancia revela que no se observa diferencia significativa entre los anticuerpos de la prueba en cualquiera de las concentraciones probadas en la tasa de liberación de cromo específica de la prueba. Los análisis estadísticos se corren utilizando estas Preclinical Package (SAS Institute Inc.). Estos resultados muestran que no había diferencia entre las actividades ASC el anticuerpo pH7pL16 y el anticuerpo pH7M85Pl16.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un anticuerpo anti-glipican 3 es con cinéticas de plasma modulado, dicho método comprende las etapas de:
 - (a) cultivar una célula huésped que lleva un ácido nucleico que codifica al anticuerpo anti-glipican 3 bajo condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico, en donde el anticuerpo anti-glipican 3 tiene una secuencia aminoácido alterada para originar una modificación en la carga de al menos un residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie del anticuerpo;
 - (b) recuperar el anticuerpo anti-glipican 3 del cultivo de la célula huésped.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la modulación de las genéticas del plasma se incrementa o disminuye en un parámetro seleccionado desde la vida media del plasma, el tiempo de residencia medio del plasma, y la distancia del plasma.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante sustitución de aminoácido.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el residuo de aminoácido que se pueda exponer sobre la

superficie de anticuerpo anti-glipican 3 localizado en una región del anticuerpo de anti-glipican 3 diferente de la región de unión FcRn.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la región de unión FcRn comprende la región Fc.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la región de unión FcRn comprende los residuos de aminoácido de los números EU 250, 253, 310, 311, 314, 428, 435, 436 de acuerdo con la numeración Rabat.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-glipican 3 es un anticuerpo IgG.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el residuo de aminoácido cuya carga se modifica es un residuo de aminoácido presente en la región variable de cadena pesada o en la región variable de cadena ligera.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el anticuerpo anti-glipican 3 comprende una región de determinación de complementariedad (CDR) derivada de un animal o humano, una región o estructura (FR) derivada del humano, y una región constante derivada del humano, en donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante la sustitución de al menos

un residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie del anticuerpo de CDR o FR del anticuerpo con un residuo de aminoácido que tiene una carga diferente de aquella del residuo del aminoácido.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante:

(1) al menos una sustitución en la región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:1 seleccionada de:

(a) la sustitución de Q que es el 43avo residuo de aminoácido con K,

(b) La sustitución de D es el 52avo residuo aminoácido con N,
y

(c) La sustitución de Q que es el 107avo residuo de aminoácido con R;

y/o

(2) al menos una sustitución en la región variable de cadena ligera mostrado en la SEQ ID NO: 7 seleccionado de:

(d) la sustitución de E es el 17avo residuo de aminoácido con Q,

(e) la sustitución de Q que es el 27avo residuo de aminoácido con R,

(f) la sustitución de Q que es el 105avo residuo de aminoácido con R.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la modificación e la carga del residuo de aminoácido se

logra mediante:

(1) al menos una sustitución en la región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 1 seleccionada de:

(a) la sustitución de K en el 19avo residuo de aminoácido con T,

(b) La sustitución de Q es el 43avo residuo aminoácido con E,

(c) La sustitución de Q que es el 62avo residuo de aminoácido con E;

(d) La sustitución de K que es el 63avo residuo de aminoácido con S,

(e) la sustitución de K que es del 65avo residuo de aminoácido con Q, y

(f) la sustitución de G que es el 66avo residuo de aminoácido con D,

y/o

(2) al menos una sustitución en la región variable de cadena ligera mostrado en la SEQ ID NO: 7 seleccionado de:

(g) la sustitución de R que es el 24avo residuo de aminoácido con Q,

(h) la sustitución de Q que es el 27avo residuo de aminoácido con E,

(i) la sustitución de K que es el 79avo residuo de aminoácido con T,

(j) la sustitución de R que es el 82avo residuo de aminoácido con S, y

(k) la sustitución de K que es el 111avo residuo de aminoácido con E.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende además al menos una modificación en la región constante de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 31 seleccionada de:
- (a) la sustitución de H que es el 151avo residuo de aminoácido con Q,
 - (b) la sustitución de K que es el 157avo residuo de aminoácido con Q,
 - (c) la sustitución de R que es el 238avo residuo de aminoácido con Q,
 - (d) la sustitución de D que es el 239avo residuo de aminoácido con E,
 - (e) la sustitución de L que es el 241avo residuo de aminoácido con M,
 - (f) la sustitución de Q que es el 302avo residuo de aminoácido con E.
13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en donde el anticuerpo anti-glipican 3 tiene un contenido reducido de mucosa unido a la región Fc del anticuerpo.
14. El anti-glipican 3 preparado mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
15. Un método para preparar un anticuerpo con una cinética de plasma modulado, dicho método comprende las etapas de:

(a) cultivar la célula huésped que lleva un ácido nucleico que codifica un anticuerpo bajo las condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico, en donde el anticuerpo tiene una secuencia de aminoácido alterada para originar una modificación en la carga de al menos un residuo de aminoácido en la región constante en el anticuerpo diferente de la región de unión FcRn;

(b) Recuperar el anticuerpo del cultivo de la célula huésped.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la modulación de la cinética del plasma es incrementar o disminuir en un parámetro seleccionado de la vida media del plasma, el tiempo de residencia medio del plasma, y la distancia del plasma.
17. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante la sustitución del aminoácido.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG.
19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.
20. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se

logra mediante la sustitución de al menos un residuo de aminoácido del anticuerpo IgG1 con un residuo de aminoácido correspondiente de un anticuerpo IgG4.

21. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-20, en donde la región de unión FcRn comprende los residuos de aminoácido de los números EU 250, 253, 310, 311, 314, 428, 435, y 436 de acuerdo con la numeración Rabat.
22. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la modificación en la carga de residuo de aminoácido se logra mediante al menos una sustitución en la región constante de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 31 seleccionada de:
 - (a) la sustitución de H que es el 151avo residuo de aminoácido con Q,
 - (b) la sustitución de K que es el 157avo residuo de aminoácido con Q,
 - (c) la sustitución de R que es el 238avo residuo de aminoácido con Q,
 - (d) la sustitución de D que es el 239avo residuo de aminoácido con E,
 - (e) la sustitución de L que es el 241avo residuo de aminoácido con M, y
 - (f) la sustitución de Q que es el 302avo residuo de aminoácido con E.

23. el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-22, en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-glipican 3.
24. Un método para estabilizar un anticuerpo anti-glipican 3 que comprende una región de determinación de complementariedad (CDR) derivada de un animal o humano, una región de estructura (FR) derivada del humano, y una región constante derivada del humano, dicho método comprende las etapas de:
- (a) cultivar una célula huésped que lleva un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-glipican 3 bajo condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico, en donde el anticuerpo anti-glipican 3 de una secuencia de aminoácido alterada para incrementar en el valor T_m del anticuerpo mediante una modificación de al menos un residuo de aminoácido;
 - (b) recuperar el anticuerpo del cultivo de célula huésped.
25. El método de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el residuo de aminoácido está presente en la región FR1 y/o la región FR2 de cadena pesada o de la cadena ligera.
26. El método de acuerdo con la reivindicación 25, en donde un residuo de aminoácido en la región FR2 de cadena pesada se sustituye con el residuo de aminoácido de la

región FR2 de la subclase VH4.

27. El método de acuerdo con la reivindicación 25, en donde un residuo de aminoácido en la región FR2 en la cadena ligera se sustituye con un residuo de aminoácido de la región FR2 de la subclase VK3.

28. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24-27, en donde la sustitución del residuo de aminoácido se logra mediante:

(1) al menos una sustitución en la región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 1 seleccionada de:

(a) sustitución de V que es el 37avo residuo de aminoácido con I,

(b) sustitución de A que es el 40avo residuo de aminoácido con P,

(c) la sustitución de M que es el 48avo residuo de aminoácido con I,

(d) sustitución de L que es el 51avo residuo de aminoácido con I;

y/o

(2) al menos una sustitución en la región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 7 seleccionada de:

(e) la sustitución de L que es el 42avo residuo de aminoácido con Q,

(f) la sustitución de S que es el 48avo residuo de aminoácido con A, y

(g) la sustitución de Q que es el 50avo residuo de aminoácido

con R.

29. Un método para preparar un anticuerpo con citotoxicidad modulada, que comprende las etapas de:
- (a) cultivar una célula huésped que lleva un ácido nucleico que codifica el anticuerpo bajo las condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico, en donde el anticuerpo tiene una secuencia de aminoácido alterada para originar una modificación en la carga de al menos un residuo aminoácido que se puede exponer sobre la superficie de un anticuerpo citotóxico; y
 - (b) recuperar el anticuerpo del cultivo de célula huésped.
30. El método de acuerdo con la reivindicación 29, en donde la modificación en la carga de residuo de aminoácido se logra mediante la sustitución del aminoácido.
31. El método de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie del anticuerpo se localiza en una región en el anticuerpo diferente de la región de unión FcRn.
32. El método de acuerdo con la reivindicación 31, en donde la región unión FcRn comprende la región Fc.
33. El método de acuerdo con la reivindicación 31, en donde la región de unión FcRn comprende los residuos de

aminoácidos de los números EU 250, 253, 310, 311, 314, 428, 435, 436 de acuerdo con la numeración Kabat.

34. El método de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG.
35. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 29-34, en donde el residuo del aminoácido cuya carga se modifica es un residuo de aminoácido presente en una región constante del anticuerpo.
36. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 29-34, en donde el residuo del aminoácido cuya carga se modifica es un residuo de aminoácido presente en la región variable de cadena pesada o en la región variable de cadena ligera del anticuerpo.
37. El método de acuerdo con la reivindicación 36, en donde el anticuerpo es un anticuerpo que comprende una región de determinación de complementariedad (CDR) derivada de un animal o humano, una región de estructura (FR) derivada del humano, una región constante derivada de humano, y en donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante la sustitución de al menos un residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie del anticuerpo en CDR o FR

del anticuerpo con un residuo de aminoácido que tiene una carga diferente de aquella del residuo de aminoácido.

38. El método de acuerdo con la reivindicación 37, en donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante:

(1) al menos una sustitución en la región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 1 seleccionada de:

(a) la sustitución de K que es el 19avo residuo de aminoácido con T,

(b) la sustitución de Q que es el 43avo residuo de aminoácido con E,

(c) la sustitución de Q que es el 62avo residuo de aminoácido con E,

(d) la sustitución de K que es el 63avo residuo de aminoácido con S,

(e) la sustitución de K que es el 65avo residuo de aminoácido con Q,

(f) la sustitución de G que es el 66avo residuo de aminoácido con D;

y/o,

(2) al menos una sustitución en la región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 7 seleccionada de:

(g) la sustitución de R que es el 24avo residuo de aminoácido con Q,

(h) la sustitución de Q que es el 27avo residuo de aminoácido con E,

- (i) la sustitución de K que es el 79avo residuo de aminoácido con T,
- (j) la sustitución de R que es el 82avo residuo de aminoácido con S, y
- (k) la sustitución de K que es el 112avo residuo de aminoácido con E.

39. El método de acuerdo con la reivindicación 38, que comprende además al menos una sustitución en la región constante de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 31 seleccionada de:

- (a) la sustitución de H que es el 151avo residuo de aminoácido con Q,
- (b) la sustitución de K que es el 157avo residuo de aminoácido con Q,
- (c) la sustitución de R que es el 238avo residuo de aminoácido con Q,
- (d) la sustitución de D que es el 239avo residuo de aminoácido con E,
- (e) la sustitución de L que es el 241avo residuo de aminoácido con M,
- (f) la sustitución de Q que es el 302avo residuo de aminoácido con E;

40. El método de acuerdo con la reivindicación 36, en donde el anticuerpo comprende una región de determinación de complementariedad (CDR) derivada de un animal o humano, una región de estructura (FR) derivada del humano, y una

región constante derivada de humano, y en donde la modificación en la carga del residuo de aminoácido se logra mediante la sustitución de al menos un residuo de aminoácido que se puede exponer sobre la superficie del anticuerpo en la región constante del anticuerpo con un residuo de aminoácido que tiene una carga diferente de aquella del residuo de aminoácido.

41. E método de acuerdo con la reivindicación 40, en donde la sustitución es al menos una sustitución en la región constante de cadena mostrada en la SEQ ID NO: 61 seleccionada de:

- (a) la sustitución de H que es el 151avo residuo de aminoácido con Q,
- (b) la sustitución de K que es el 157avo residuo de aminoácido con Q,
- (c) la sustitución de R que es el 238avo residuo de aminoácido con Q,
- (d) la sustitución de D que es el 239avo residuo de aminoácido con E,
- (e) la sustitución de L que es el 241avo residuo de aminoácido con M, y
- (f) la sustitución de Q que es el 302avo residuo de aminoácido con E.

42. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 37-41, e donde el anticuerpo tiene un contenido reducido de mucosa unido a la región Fc del

anticuerpo.

43. Un anticuerpo preparado mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 29-42.

44. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 43, en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-glipican 3.

45. Un anticuerpo que comprende:

(1) una región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 1 en la cual la secuencia del aminoácido comprende al menos una sustitución seleccionada de:

(a) la sustitución de K que es el 19avo residuo de aminoácido con T,

(b) la sustitución de Q que es el 43avo residuo de aminoácido con E,

(c) la sustitución de Q que es el 62avo residuo de aminoácido con E,

(d) la sustitución de K que es el 63avo residuo de aminoácido con S,

(e) la sustitución de K que es el 65avo residuo de aminoácido con Q,

(f) la sustitución de G que es el 66avo residuo de aminoácido con D;

y/o,

(2) una región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID : 7 en la cual la secuencia del aminoácido comprende al menos una sustitución seleccionada de:

- (g) la sustitución de R que es el 24avo residuo de aminoácido con Q,
- (h) la sustitución de Q que es el 27avo residuo de aminoácido con E,
- (i) la sustitución de K que es el 79avo residuo de aminoácido con T,
- (j) la sustitución de R que es el 82avo residuo de aminoácido con S, y
- (k) la sustitución de K que es el 112avo residuo de aminoácido con E.

- 46. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 45, que comprende la cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 3 y la cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 9.
- 47. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 45, que comprende la cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 5 y la cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 11.
- 48. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 45 que comprende una región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 27 la región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 28.
- 49. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 45 que comprende una región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 27 y la región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 29.

50. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 45-49 que comprende una región constante del anticuerpo humano.
51. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 50, en donde la región constante comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 32 y la SEQ ID NO: 33.
52. Un anticuerpo que comprende:
- (1) una región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 1 en la cual la secuencia de aminoácido comprende al menos una sustitución seleccionada de:
 - (a) la sustitución de Q que es el 43avo residuo de aminoácido con K,
 - (b) la sustitución de D que es el 52avo residuo de aminoácido con N,
 - (c) la sustitución de Q que es el 107avo residuo de aminoácido con R,
 - Y
 - (2) una región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 7 en la cual la secuencia del aminoácido comprende al menos una sustitución seleccionada de
 - (d) la sustitución de E que es el 17avo residuo de aminoácido con Q,
 - (e) la sustitución de Q que es el 27avo residuo de aminoácido con N, y
 - (f) la sustitución de Q que es el 105avo residuo aminoácido

con R.

53. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 52, que comprende la región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 4 y la región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 10
54. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 52, que comprende la región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 6 en la región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 12.
55. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 52-54 que comprende una región constante del anticuerpo humano.
56. El anticuerpo que comprende al menos una sustitución en la secuencia del aminoácido de la región constante de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 31 seleccionada de
 - (a) la sustitución de H que es el 151avo residuo de aminoácido con Q,
 - (b) la sustitución de K que es el 157avo residuo de aminoácido con Q,
 - (c) la sustitución de R que es el 238avo residuo de aminoácido con Q,
 - (d) la sustitución de E que es el 239avo residuo de aminoácido con E,

- (e) la sustitución de L que es el 241avo residuo de aminoácido con N, y
 - (f) la sustitución de Q que es el 302avo residuo de aminoácido con E,
57. Un anticuerpo que comprende una región constante de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 33.
58. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 45-57, en donde el anticuerpo tiene un contenido reducido de mucosa unido a la región Fc del anticuerpo.
59. Una composición que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 45-58 y un portador farmacéuticamente aceptable.
60. Un agente de antineoplásico que comprende un componente efectivo del anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 45-58.
61. El agente antineoplásico de acuerdo con la reivindicación 60, en donde el cáncer es un cáncer de hígado.
62. un ácido nucleico que codifica un polipéptido del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 45-48.

63. Una célula de huésped que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 62.
64. La célula de huésped de acuerdo con la reivindicación 63, en donde la célula de huésped es una célula animal deficiente en transportador de fucosa, una célula animal con la fucosiltransferasa suprimida o una célula animal en la cual la modificación de la cadena de azúcar ramificada compleja se modifica.
65. Un método para preparar un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 63 o 64 recuperar un polipéptido del cultivo de célula.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha
 <120> ANTICUERPO ANTI-GLIPICAN 3 QUE TIENE CINÉTICAS MEJORADAS EN PLASMA
 <130> PG6-9023W0
 <150> JP 2007-256063
 <151> 2007-09-28
 <160> 35
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena pesada de anticuerpo humanizado
 <400> 1
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115
 <210> 2
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena pesada de anticuerpo humanizado
 <400> 2
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115
 <210> 3
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena pesada de anticuerpo humanizado
 <400> 3
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Ser Phe
 50 55 60
 Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 4
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena pesada de anticuerpo humanizado
 <400> 4
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ala Leu Asn Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115
 <210> 5
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena pesada de anticuerpo humanizado
 <400> 5
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Ser Phe
 50 55 60
 Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115
 <210> 6
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena pesada de anticuerpo humanizado
 <400> 6
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile Asn Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115
 <210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpo humanizado
 <400> 7
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

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

<210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpo humanizado
 <400> 8

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

<210> 9
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpo humanizado
 <400> 9

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

<210> 10
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpo humanizado
 <400> 10

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

<210> 11

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpo humanizado
 <400> 11
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpo humanizado
 <400> 12
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Arg Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 13
 <211> 545
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 13
 Gln Pro Pro Pro Pro Pro Asp Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser
 1 5 10 15
 Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro
 20 25 30
 Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys
 35 40 45
 Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn
 50 55 60
 Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile
 65 70 75 80
 Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg
 85 90 95
 His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser
 100 105 110
 Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val
 115 120 125
 Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn
 130 135 140
 Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn
 145 150 155 160
 Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly
 165 170 175
 Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met
 180 185 190
 Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala
 195 200 205
 Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe
 210 215 220
 Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr
 225 230 235 240
 Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val

Val	Met	Gln	Gly	245	Cys	Met	Ala	Gly	250	Val	Val	Glu	Ile	Asp	Lys	255	Tyr	Trp
Arg	Glu	Tyr	Ile	260	Leu	Ser	Leu	Glu	265	Glu	Leu	Val	Asn	Gly	270	Met	Tyr	Arg
Ile	Tyr	Asp	Met	275	Glu	Asn	Val	Leu	280	Leu	Gly	Leu	Phe	Ser	Thr	Ile	His	
Asp	Ser	Ile	Gln	290	Tyr	Val	Gln	Lys	295	Asn	Ala	Gly	Lys	Leu	Thr	Thr	Thr	
Ile	Gly	Lys	Leu	305	Cys	Ala	His	Ser	310	Gln	Gln	Arg	Gln	Tyr	Arg	Ser	Ala	
Tyr	Tyr	Pro	Glu	325	Asp	Leu	Phe	Ile	330	Asp	Lys	Lys	Val	Leu	Lys	Val	Ala	
His	Val	Glu	His	340	Glu	Glu	Thr	Leu	345	Ser	Ser	Arg	Arg	Arg	Glu	Leu	Ile	
Gln	Lys	Leu	Lys	355	Ser	Phe	Ile	Ser	360	Phe	Tyr	Ser	Ala	Leu	Pro	Gly	Tyr	
Ile	Cys	Ser	His	370	Ser	Pro	Val	Ala	375	Glu	Asn	Asp	Thr	Leu	Cys	Trp	Asn	
Gly	Gln	Glu	Leu	385	Val	Glu	Arg	Tyr	390	Ser	Gln	Lys	Ala	Ala	Arg	Asn	Gly	
Met	Lys	Asn	Gln	405	Phe	Asn	Leu	His	410	Glu	Leu	Lys	Met	Lys	Gly	Pro	Glu	
Pro	Val	Val	Ser	420	Gln	Ile	Ile	Asp	425	Lys	Leu	Lys	His	Ile	Asn	Gln	Leu	
Leu	Arg	Thr	Met	435	Ser	Met	Pro	Lys	440	Gly	Arg	Val	Leu	Asp	Lys	Asn	Leu	
Asp	Glu	Glu	Gly	450	Phe	Glu	Ala	Gly	455	Asp	Cys	Gly	Asp	Asp	Glu	Asp	Glu	
Cys	Ile	Gly	Gly	465	Ala	Gly	Asp	Gly	470	Met	Ile	Lys	Val	Lys	Asn	Gln	Leu	
Arg	Phe	Leu	Ala	485	Glu	Leu	Ala	Tyr	490	Asp	Leu	Asp	Val	Asp	Asp	Ala	Pro	
Gly	Asn	Ser	Gln	500	Gln	Ala	Thr	Pro	505	Lys	Asp	Asn	Glu	Ile	Ser	Thr	Phe	
His	Asn	Leu	Gly	515	Asn	Val	His	Ser	520	Pro	Leu	Lys	His	His	His	His	His	
His				530					535									

His
 545
 <210> 14
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 14

ggatcctggg catgaaaag cctgaactca cc

32

<210> 15
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 15

ggggcggcct attcctttgc cctgggaag

29

<210> 16
 <211> 10939
 <212> DNA
 <213> Cricetulus griseus
 <400> 16

gagctcaatt	aacctcact	aaagggagtc	gaactgatcc	tttacagaaa	aactgcaaac	60
cctcttggag	tagaaaagta	gtagtatctg	aaacaagtat	cagcaaaatg	caaaactctc	120
ccatcccca	gaaaaacatt	ataaaaaccc	ccatatctta	tgcccaactg	tagtcatata	180
ttatttatga	ttatttaaaa	cttgcttaag	gattcagaaa	gcaaaagtcag	ccttaageta	240
tagagaccag	gcagtcagtg	gtggtacaca	cctttaatcc	caggactcag	gattaagaag	300
tagaaggacc	tctgttagtt	caagtctacc	attacctaca	caagagtgaa	gagtaaccga	360
tctcatgccc	ttgatccccc	cagctgggat	catgtgcatt	caatccccagc	attcgggagt	420
tatataagac	aggagcaagg	tctcagagct	ggcattcatt	ctccagccac	attgaggata	480
ggaaaacatt	gaagtgtcag	gatgctgagg	agagggcagca	gtttgaggtt	tggtagaacc	540
aggatcacct	tttggctctga	ggtagagtaa	gaactgttgc	tggtctgttt	gctttttctg	600
tcttcagctt	gaagcttgaa	ctccaatatt	tgtctctggg	tctattatta	tcatgttaca	660
cctaaattta	aagctgattt	acccaagaca	gttgtaggtg	gaacttttct	tcctgcccac	720
cagttcccaa	ataactgaca	eggagactca	atatttaata	taaatgattg	gttaataget	780
cagtcttggt	aotggctaac	tcttaacatt	taatttaact	caittccatc	cctttaactg	840
ctgccaatgt	gttccatggt	tggtcaagtc	ctgcttcttc	tgtctctggc	tggtgatgcc	900
tctggtcttg	ccctttatcc	cagaattctc	ctagtctggc	tctcctggcc	agctataggg	960
cagtcagctg	tttattaaac	aatgagaata	atacatatct	atagtgtaca	aagattgctc	1020

ctcaacaccc	aattttttat	gtgcaacctg	agaatcttga	ctcattgccc	tcattgattg	1080
agaggcgcca	ccctttaccc	ctaagccccc	ttttatagcc	tggttcttiti	gtttttttgag	1140
acaggttcca	ctatgtagcc	caggctggcc	tcaaacctgac	catttctctg	cttaaacctc	1200
ccgaacactg	gaatttatgt	caaggccctac	ctgcccctggc	attttccacc	ttttatttcc	1260
tygtctgagtc	cattgaacttt	acactccatca	aggttgaaac	agttggagtt	taattacagt	1320
gcccattcgca	ctgaatccca	cataatccaa	caacttcaag	gaagcaaaaa	accagttttt	1380
ccatgaagatc	aattgtacgt	tgcctgattc	agaatagacc	cccccaaaaa	ggcaaatgct	1440
tgataacccaa	ttttcttctta	ttgttcaatc	ccctgtctgt	gtgtgttagc	tcctgagaaa	1500
gyacagtaag	gggacattca	tgatccagaga	aagagccccc	actccccccc	cagccccccc	1560
ccccccctgt	ccacagctgt	ttgttttggg	ttccccctgg	ctgaacccca	gaatccacaa	1620
cataatccac	taggtccactg	taacaaagttc	ctttcttggaa	aattgtccaa	atgatatttg	1680
taacatgggt	aattgaactc	ccctggagtc	ccactccctt	gtgaacccagc	aattgttttc	1740
gtgggtgctc	ctttcccccag	ctgcaggctc	gaatgttacc	ttaaaaagcc	ccccctggag	1800
gacagaatttt	tgtgggtact	atagtgttct	cacaaatact	ttcccttaata	cccttaacta	1860
gttaaccataa	ataacatgca	gccccctgtg	agggcacacag	ggctcccaatg	tacagcttct	1920
cagacaactgc	aggaacactc	ctctccctaat	gcagcaactgg	ctctctcagg	ctggacagca	1980
ggaccccata	ccactccaat	ccatagtgtg	agtagagctg	tttaacgaaa	ccagcagatc	2040
tatatagtaaa	tgtgtttcaa	ttttatgttt	tgacaaattg	taetgacccc	ccccccaccc	2100
cttccccctt	gtgtgtcttg	gaattgaaac	caggaccttg	tccatgcccag	gcaagtactc	2160
taacactgag	ctatagctag	aatctttta	ccagctctct	atgtgtgccc	acactcgttt	2220
ttttattttga	gacaaaaggt	tottattttg	agataaggct	taactatgtt	gccttgactt	2280
tttttttttt	ttttttttga	actttttgac	ttctacactc	agctgagact	acagcttttt	2340
tacatccagg	ccccctgtat	ggtaaacata	cagtattttg	aattagttta	acacatcact	2400
ttaatggcca	acacacacat	ttccgaatg	ttgtgtgctc	agtctggggc	aaacctgtcc	2460
gcccccaaat	tggtgtctagg	aagaaagccac	agacaaagtag	ccctccccagc	tcaggagttaa	2520
aagacctgga	gggggtggcc	caattcggctc	aagttccagg	gatggggagg	ggtacccctcc	2580
tcagatagtg	gtggtatttg	gcagttccctc	cccccaaccc	ctctgggaagc	acctgcttgg	2640
acccgcaaaag	ccaggcaactc	agcttccctc	agggactctc	cagcgagggt	aacaggacac	2700
aggcgctccca	agaggctctg	ggcggagagg	ggagagacagg	gtcggcctta	gataggccaa	2760
agggccttct	ggctgtgttc	ccgggttaac	cgccccacca	cgccctggagc	ccgacgtggc	2820
gagcgatggg	gacagcgagc	agaaagtctg	actggggagg	gcccgttagc	agatgcagcc	2880
gagggcgggg	ctgcccaggtc	cccccagggg	caacgggggg	gtgagcgcca	ggtccctgaa	2940
ccagccagggc	ctccagagcc	gagtcaggcg	gacccagcgt	acgttcttga	atgggaaggc	3000
atccggggaac	ccgaattgtct	gcattgaggg	gctcagagct	ctctgatgtg	gagtcacaga	3060
agggcttttat	ctacccgagg	tgatgtgact	tcgggctctc	ggaggtctctg	ttggagctctc	3120
tgggaccttg	gtctctctg	actaggtttg	gaagggggtg	aatagggtga	gggagaaagg	3180
agaggactgc	agcaatgtct	tcocgaacga	ccctgggttcg	ggagggtctg	aaggacaggc	3240
ggctctttctg	ggggctcttc	agaacgggag	gggtgtgtatt	ctattttctg	ggagatgggt	3300
gtcgatgcac	ttgacaaagt	ctagtgcact	tgaaaggctc	aggggaacag	acagtgcagc	3360
aggtatgttg	agggatgtgc	agaaaccttc	cagaggctct	gagaggctct	agcaactgca	3420
accccttccc	tgccctccgg	ggagtcacag	aagagggcag	gacccatggc	acagggtcat	3480
tcgtgcaggc	ggctcccgcc	ctggcggaagg	tgccgctctc	tgagggccgc	gggagggcca	3540
gacggcgccc	cggagagctg	gcccccttaag	gctacccccc	ggcgtgtcag	gaattgcgcc	3600
ctgagccccc	ccctcccgga	acggcgcccg	agacctggca	agctgagacg	gaactcggaa	3660
ctagcaactcg	gctcgccccc	tcgggtaggc	cttgccccc	ccatgcctct	gtcattgccc	3720
ctcggggccc	ctccctgaa	ctccgtgacc	gcccgtcagt	ccctccctcc	cccccttgac	3780
tcggcggggg	cttccggggg	ctcccgagc	cggccctcca	cgtagccccc	acctccctct	3840
cggcgctccg	cttcccccgc	ggtcccccgc	ctgtctcttc	ctcccccacc	ctgcccctct	3900
gtccctctcc	cttccctttc	ccccctgact	cttccctatt	agccaacagc	ccctgtggtc	3960
cagccgggca	tggtgttcaa	ggtccacacc	cttagctagg	ccccctctcc	cttccctggg	4020
tcttctctca	tgacccctg	cccccccgcc	gagcgagctc	gatgtggagc	agtgccctct	4080
gcaggtcagaa	cttccaccaa	gcacatgtac	aattgaaggc	tgtaccccca	gcccccaaca	4140
tcttggagcc	ctgtagacaa	gggagtgctt	ctgcccctgg	ggtgacctag	ctctcttacc	4200
acacatgaaca	gggccccctc	gaagcggtcc	agcactctgc	gcattggcgt	gactggagcc	4260
tcacatgcct	ctgaggagggc	agatgaagac	agcagggaaca	agccgtttct	gctgcggggc	4320
ctgacagatg	cgtctgtctg	ctctctctac	tggttcacct	ccatctccat	ggtattccct	4380
aaacagtaac	tgctggacag	ccccctccctg	cagctggata	ccccctattt	cttccactttc	4440
taacaaatgc	tggtgcactc	tctgtgtgtc	aaggccctca	gcactctggc	ccactgtctc	4500
ccctggacccg	ttgaacttcc	caacctgaac	ctggacctta	aggtggcccg	cagcgtgctg	4560
ccactctggg	tagtcttcac	tggaatgata	agtttcaata	acctctgctc	caagtaagta	4620
ggggtgggct	cttaccacgt	ggggcgctcg	ctcaccacccg	tgttcaatgt	gcttctgtcc	4680
tacctgtctc	tcacacagac	cacttccctc	tatgcccctg	tcacatgtgg	catactcatt	4740
gggtgctggg	gcccgggggg	tgtgggagca	ggatgggcat	cgaactgaag	cccccaaggt	4800
caacacgtga	ggtaccttta	cttactgtcc	cagggtccctt	gcactcagag	ttacaggaag	4860
agccctgtag	aaaaacaaata	acttccctta	ggtcattcaa	caagtttaggg	ccccagccag	4920
gggtgaaata	atgttagcag	caactacagc	aaagatggct	ctcgccacct	gcattgattaa	4980
aattgtcccag	gtactcagat	ctaagcattg	gacccacatt	aactccacta	atccctatta	5040
caaggtaaaa	tatatccgaa	ttttacagag	ggaaaaacaa	ggcacagaga	ggtcaagtag	5100
cttgacccagg	atcacacagc	taataatcac	tgacatagct	gggatttaaa	cataagcagt	5160
tacctccata	gctcacacta	tgacacccat	gcactgttc	cttctcaaga	gttccaggat	5220
ccctgtctgtc	cagttctctt	taaaagggac	aaacacatctg	acattgctac	cttgagggtaa	5280
catttgaaat	agtggttaga	catagttttt	aagttttatt	cttacttttt	atgtgtgtgt	5340
gtttgggggg	ccaccacagt	gtatgggtgg	agataagggg	acaaacttaag	aattgtctct	5400
ttctccaccc	acatgggtgc	tgaggtctga	actcagggtca	tcaggattgg	cacaaatccc	5460
tttaccacact	gagccatttc	actgttccaa	tatatgtgtg	cttttaagag	gctttaacta	5520
ttttccacaga	tgtgaatgtc	ctgtgtatca	ttatcccttt	ttaccccgaa	gcccctctggg	5580
aggtgacata	ccgtgtgtcg	tctgcataca	aattggggaaa	ctgcaactca	gagaaacag	5640

gctacttgc	agggccccc	aagtaagata	gggtgggatg	ccatcccca	ctggccccc	5700
ccatgggct	gtgattcaag	ccagtttact	ttgttccg	ccattggag	ttagcatgtt	5760
gcagtcacac	acaaataacta	caggccacaaa	gtgtttttaa	attaaagtca	gatgaacttt	5820
taaacatcca	gagctctcca	actgagggag	ttacaaactg	attctgcaac	catcttttga	5880
gtgcccggta	gtcatatgta	gotagaggct	cttgggtagg	acagcatgtg	ttaggacaaa	5940
tctggccctg	agatcattga	attgagtga	tggtgggtga	caaaagacaa	ggcatccgtt	6000
ccctgagagt	cttgggcaag	cagcatatgt	acattcattt	gtacctactc	aggttcttta	6060
tctgtccctg	ttgacctact	tagtctctct	tggtgtctca	gaggcccaag	ctgggtactc	6120
tggtatgtac	gacacaggca	atggccacat	ctggccctaga	aattgtccccc	tggttgagca	6180
gctccatga	ccatcggtaa	agggtctgga	ccaggggagga	gtcagataaa	aagctgacag	6240
caactggggga	ctccatggg	aactccacac	tgcccccaca	catccatctc	aagagaactg	6300
gtattccctg	tttccctctt	gtccataaag	gcaacctggg	atcccacttc	agtctccacg	6360
ccctggccagg	gttagaggga	atgagccctc	ttgtggggaa	tttagatgca	agaaggatca	6420
gtccatagag	aaactgagct	cagatcccca	aagtaaccag	tacctgatag	tgaggcagct	6480
gagaaacgca	gcagctgccc	tgagtggtgt	aactctggg	ccctccggac	tgcccccac	6540
tggtgggtct	ctcttccctt	ctccctgtga	gggaggggcc	atctctgata	agtgtgtgtg	6600
ggactctaga	gtaggggagg	ggaggagcaa	tctaaagcag	ccctactgag	aagtccctgc	6660
tggtatgttg	ctgcccagag	agtacagact	gggaacaccc	atttgaatga	gtaagggttt	6720
tctgaaggga	catggggagg	cacggaggaa	aactcattta	gttacaagac	aaagagtaga	6780
ttgtttacaa	tgaggagcaag	gacatggccc	caattttcat	agatgaagga	aattggaaat	6840
cagagagggt	aagtaacttc	tcccaaatag	ctcagcttca	aaatcacaga	acagtcagag	6900
tctagatctc	tctgatgcat	gtatggtctc	tgccattcca	tggtgtgat	ccctgtggca	6960
tcagtaagcc	tctaccttgt	gggaatgag	gatataaatg	aagagaggaa	gtgtctggcc	7020
catctgtgtg	tctgggaagg	tatcgaggct	ctttgagcag	agagtgaccc	acaagtgaat	7080
agagtccat	gagactcaaa	gcacatccca	cccttaagca	gctctaccca	aattgtccca	7140
ctgagggagg	caaaagccag	ttagagctct	gtgcttgccc	aaggtccact	tgccctggcc	7200
tctccctata	gcacccctgt	tatcttatag	ccctccattc	agtgtattca	attataatta	7260
gagagctaac	agggccacac	tgctcttaca	cattccctct	ctagattgta	gtggggagag	7320
ggggagatgt	agggtgctgg	gggagtggga	gggaagatgc	agattttcat	tctgggtctc	7380
actccctcag	ccattttttg	gtgtgggagt	tagaatttgg	atatgttgt	gatgaggtaa	7440
gggcccacga	acagtctgaa	ctgtggtatc	agaactctgt	ccctctccct	ctctccctcat	7500
ccctctccac	ctgttccact	ctctctctga	tacaggttgt	ttctgggtgt	gtatagacaa	7560
agaggagagt	gagggaaccc	tgctccctcat	aggcaccact	ttcgggtgtc	tgccacagct	7620
ctggtctctc	ctcaatgcca	tctataccaa	gaagtgctct	ccagcagttg	acaacagcat	7680
ctgggcctca	acottctata	acaatgtcca	tgctgtgtgt	ctctctctgc	ccctgatgtg	7740
tctctctggt	gagctccgtg	ccctccctga	ctttgctcat	ctgtacagtg	cccactctct	7800
gctcatgatg	acgttgggtg	gctctctctg	ctttgcccatt	ggctatgtga	caggactgca	7860
gtccaaatcc	accagtcctc	tgacccacaa	tgtatcaggg	acagcccaag	ccctgtccga	7920
gacagtctct	gcctgtctct	actatgaaga	gactaagagc	ttcctgttgt	ggcaagacaa	7980
ccctgatgtg	ctgggtggtc	ctctacgcta	tacctgggtc	agggtctggg	agatgcagaa	8040
gcacccagag	gcacccagct	ccaaagaggg	tgagaagagt	gotattgggg	tgtgagcttc	8100
ttcaggagac	tggaactgaa	cccaagtggg	gctacacag	caactgaagc	ttcccatgga	8160
gotagccagt	gtggccctga	gcaatactgt	ttacatctct	cttgggaat	gatctaaag	8220
gagccagggt	ctttccctgt	aatgtcagaa	agctgcacaa	tctctgtctc	gcccactctt	8280
gttttgggaa	aaacctacaa	ggaaatggcc	ccctacactg	ctctccctag	agcctgtcta	8340
ccctccatct	atctctgggg	ttgggaacag	ctgagccctt	aagggtctgg	attgatgaag	8400
tgatgtcttc	tacacaaagg	agatgggttg	tgatccact	aattgagggg	atttgggtga	8460
ccccacacct	ctgggactag	ggccagctag	agtagtagct	taggtgtct	taacatcagg	8520
aacacctccg	ctgccccttg	aagggaagtg	ggagcttgcc	caaggggagg	aatggccatt	8580
ctgcccctct	cagtgttggt	gagtatggca	gacctgttca	tgccagctgc	acccctgggt	8640
ggctgataag	aaaaacttca	ccctctgcat	tcatatttgc	agctctagaa	cggggggag	8700
ccacacatct	tttaacggtt	aagtagggtt	atgagctct	ccgcagctcc	taaccccagc	8760
tttaactgac	tggttccctt	tgccccagct	acctagctgt	actcccttct	tgtaactctc	8820
tcttctccct	catgcccctc	cccaacacct	ccatctgcag	gcagggaagt	gattccactt	8880
gtacactctg	ttcccatgac	agagcccttt	gaatacctga	acccctcatg	acagtaagag	8940
acacttatgt	tctctggggc	tgagccctga	ggagcccaat	gcttctcat	tacccctctc	9000
ggctctctgt	acaaaaaaaa	aaaaagaaaa	aaaaaagcaa	taaaccaagt	tactaagaa	9060
agaagtgtgt	ttataacgtt	ctggggcagc	aaagccacga	tgaaaggac	catgacacct	9120
ctctgtccat	atccctatgc	tgacagaagta	caggcaagct	cccttaagcc	tcatatagga	9180
acactagcct	cactcatgag	gattttactc	catgacctgt	caacctcaaa	gccttcaaca	9240
tgaggactcc	aacgttaatt	tggggacaga	agcctccaga	ccatacccca	gcacccaccc	9300
ctccatacct	cagggtagct	gtcattctcc	tagtctctct	tcttgggctt	ttagaccccc	9360
caatttccct	gggtatgttc	tgatgttttt	gtccctgtca	taaaaagatg	gagagactgt	9420
gtccagcctt	tgattctcat	ttccataaat	ccaggttct	aatgaagtti	gtggggccctg	9480
atgcccctgag	ttgtatgtga	tttaataata	aaaaagccag	atacagcatg	tgtgtggact	9540
gagttagggc	cacagggato	taaaagccaa	gtgtgagggg	acccagctac	agcaggcagc	9600
atccctgagc	tgaaatctct	tcaggacaa	aattctccat	atacctact	actctgggga	9660
gtaggtggcc	agagttccag	cttcccttag	tacaaatcac	cactggctgt	gctcttactg	9720
aaggcagaca	tgccactgag	tgctgtccat	ctgtccctca	tctccacagc	cattccctaat	9780
gtgtgggggt	ggagccatca	ccaaaaccca	ttttcagata	aggacacagg	ctcagayagg	9840
cttgtgttga	gaaaagttag	agcagaattc	agagagctgg	gtctccctga	gcaccttggga	9900
ctgcagcag	ccacagctgt	tgtaacacag	caacatactca	aaagaatgac	agcccccctca	9960
gcttagagtg	ccctggcttt	ctttcagata	aggaagaggg	tcaaaagctgt	tagcttgcac	10020
acacatagac	ccacatactg	acacacagct	tgaggggagg	aggattactg	tggtctccag	10080
ccctgagagt	gggacaccca	aattgtattag	gtccctgaat	cagggtctgac	cttgtgatto	10140
agctactctc	acacagaatg	tggggaatgc	ggatgcccac	ggcaagggag	gcttttotaag	10200
gtgtgtgtga	agataggcat	ttctgcttcc	atgtacacct	gtgagcagag	taggaaggcc	10260

ctgtggagaa tatatcccaac aaaccagtag cacttccctgg cagtgggtga ataactgocac 10330
 cctataccccc tatgcaagga cagtagaacc aacccaaacca caacatctag agaaattaca 10330
 ggtcatctta agcctctaaa ttgtggagaa actcgacatg cgcacgatto ctaacctgt 10440
 agcctaggggt ggggggtgga taatttaagg aaactgggggt ttcttataga atcggagggt 10500
 ccattgaagtc aacctgacaa gaggtcagca atagccagca gcagtggcta ctactaagcc 10560
 tocagacaga gcacctgtg aatgtacott attctacat ctgggtgtct atagggtgtga 10620
 ctgggtcaga tgtcaaccag gccattgcaa tgggccccta gccccatggg gtgttgggat 10680
 agcagccaaag cagctcccat gctgagatac tgcctgcagt agaactgatg atagaaaaac 10740
 aaggccaaaa atgttttctt tccagacttg atctttcttt gttaaaaaat gctgttttcc 10800
 cttaaacttg cccaaaccca ttgttttga gttgaggaaa ataaggcata gaaagattaa 10860
 aggaagtctt tgagtttaa gagaagaata ctggcttcac ctgaaataga cagggtgtgc 10920
 ctgactctga tttgagctc
 <210> 17
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 17
 atgcattgca ccatgaaaaa gctgaactc acc 33
 <210> 18
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 18
 gcatccagg ctttacaatt tatgcttc 28
 <210> 19
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 19
 gctgtctgga gtaactgtca tctgc 25
 <210> 20
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 20
 ggaatgcaga ttctccagg gactgc 27
 <210> 21
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 21
 tgcatacgt cggagacgt gtgaaac 27
 <210> 22
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 22
 gcaactgtcc gagggcaag gaataga 27
 <210> 23
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 23
 tgtgtgtgga attgaaccca ggac 24
 <210> 24
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 24
 ctacttgtct gtgtttctt cc 22
 <210> 25

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 25
 ctgagctagt cctattagg caacaga 27
 <210> 26
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 26
 tcagaggcag tggagctcc agtcaga 27
 <210> 27
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Anticuerpo modificado
 <400> 27
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Glu Ser Phe
 50 55 60
 Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115
 <210> 28
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Anticuerpo modificado
 <400> 28
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ala Ser Glu Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 29
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Anticuerpo modificado
 <400> 29
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ala Ser Glu Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
 100 105 110
 <210> 30
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 30
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 31
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 31
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 32

<211> 328

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo modificado

<400> 32

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

<210> 33

<211> 328

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo modificado

<400> 33

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

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

<210> 34
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Anticuerpo modificado
 <400> 34

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

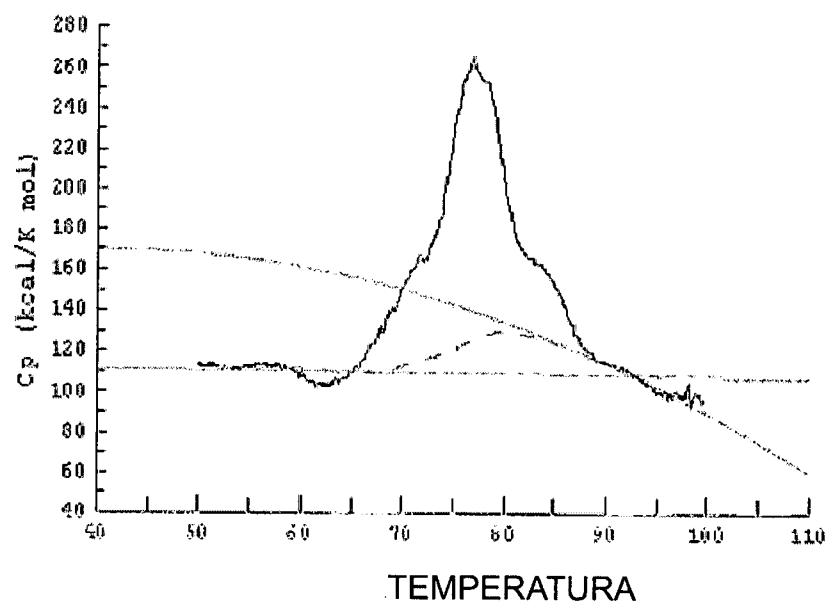
225	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	230	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	235	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	240	Glu
	Val	Thr	Cys	Val	245	Val	Val	Asp	Val	Ser	250	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	255	Gln
	Phe	Asn	Trp	Tyr	260	Val	Asp	Gly	Val	265	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	270	Lys
	Pro	Arg	Glu	Gln	275	Gln	Tyr	Asn	Ser	280	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val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

<210> 35
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Anticuerpo modificado
 <400> 35

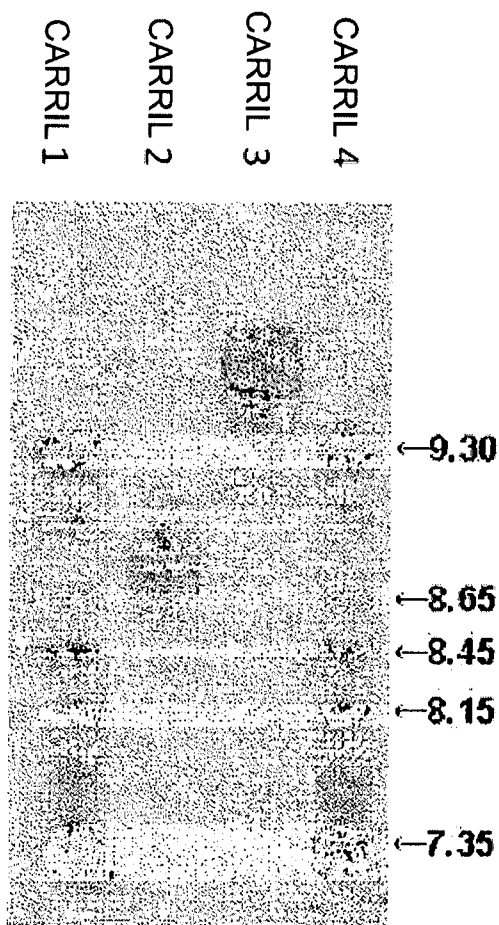
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
			20					25					30		
Glu	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35				40					45			
Gly	Ala	Leu	Asp	Pro	Lys	Thr	Gly	Asp	Thr	Ala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

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

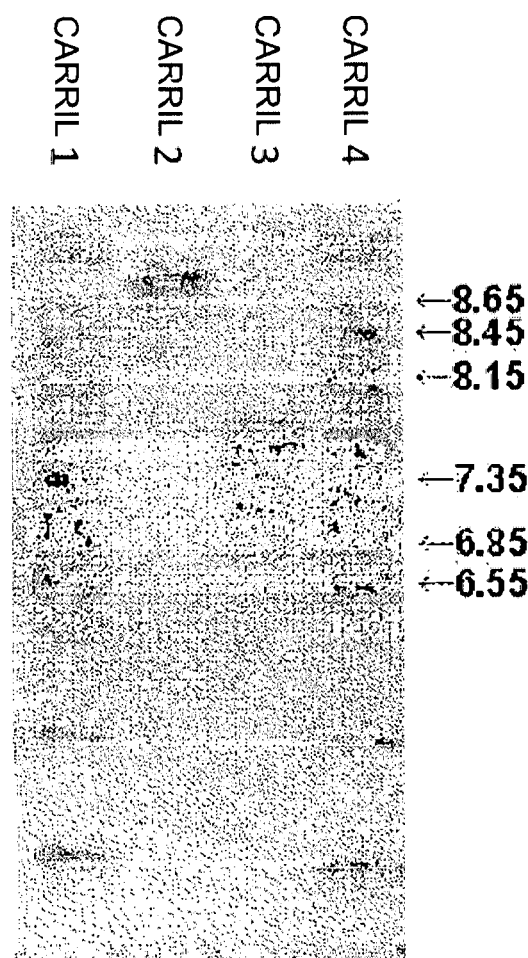
【FIG. 1】



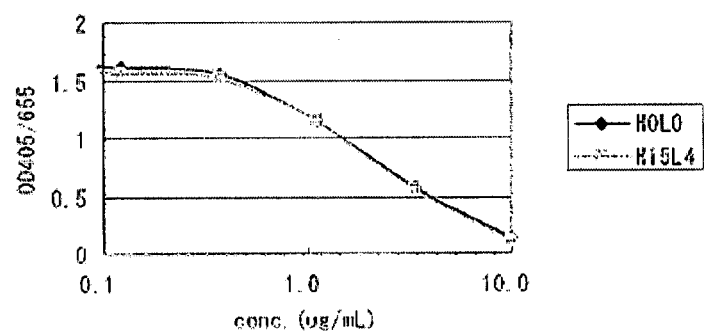
【FIG. 2】



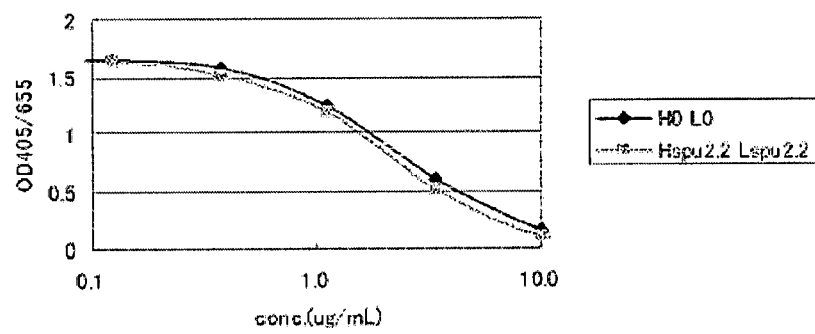
【FIG. 3】



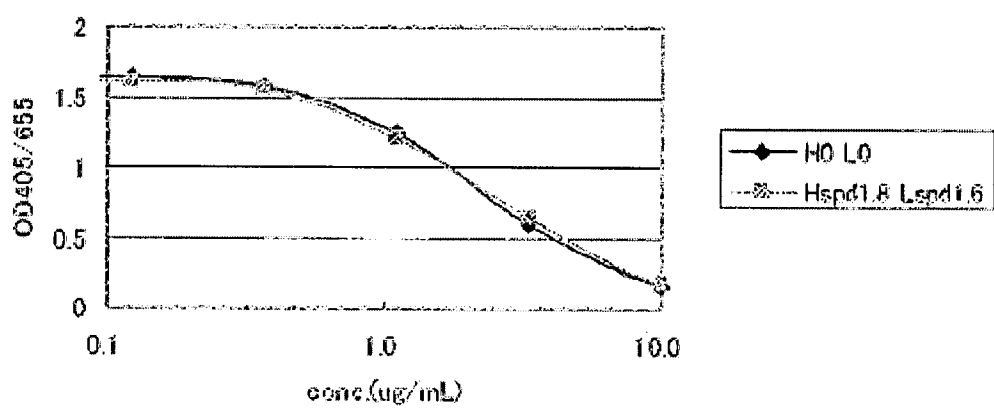
【FIG. 4】



【FIG. 5】

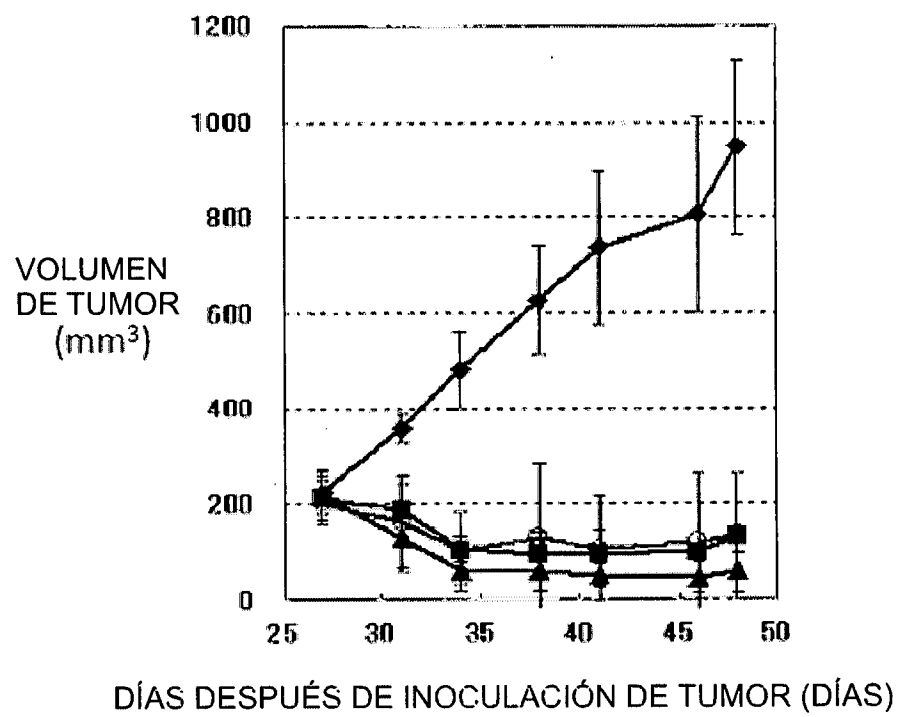


【FIG. 6】

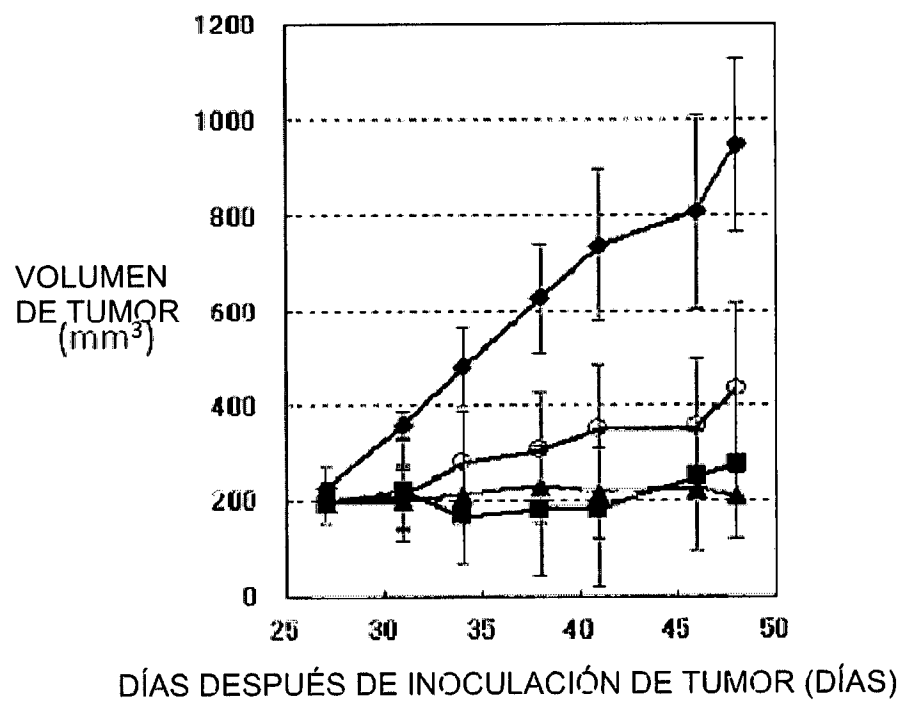


【FIG. 7】

A

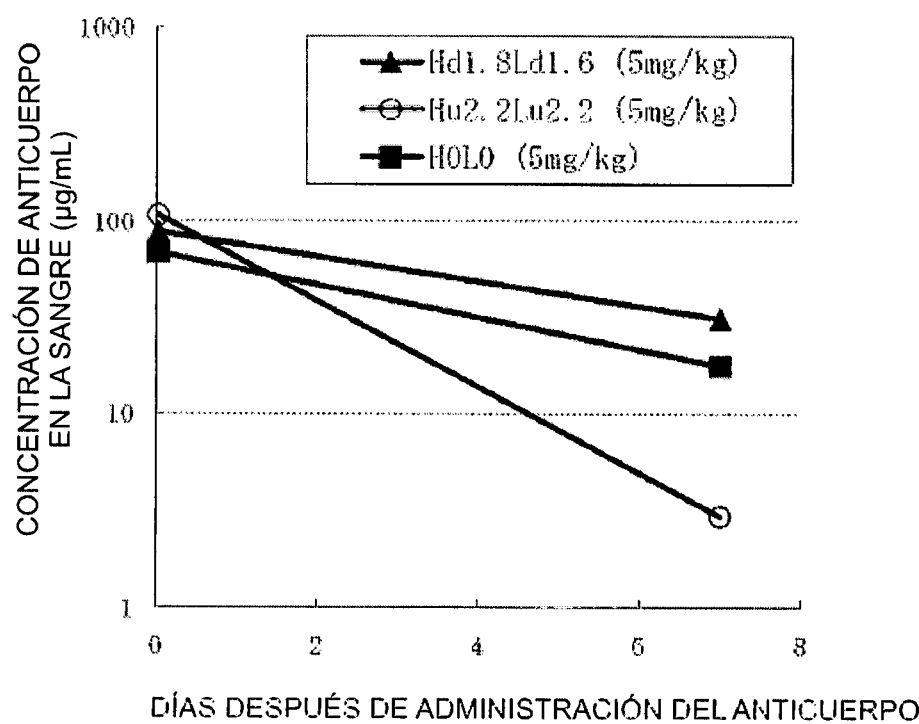


B

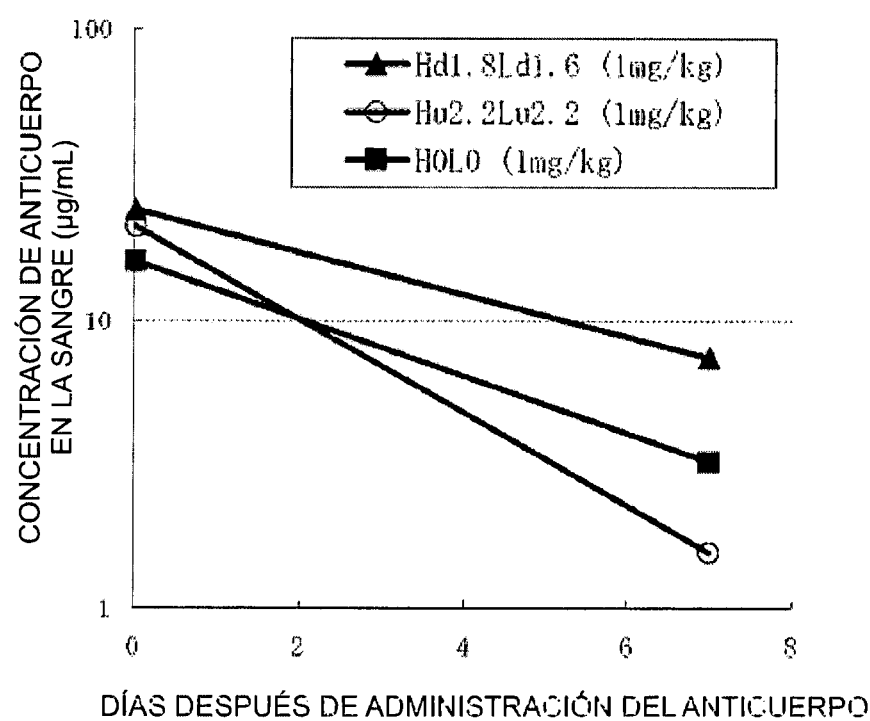


【FIG. 8】

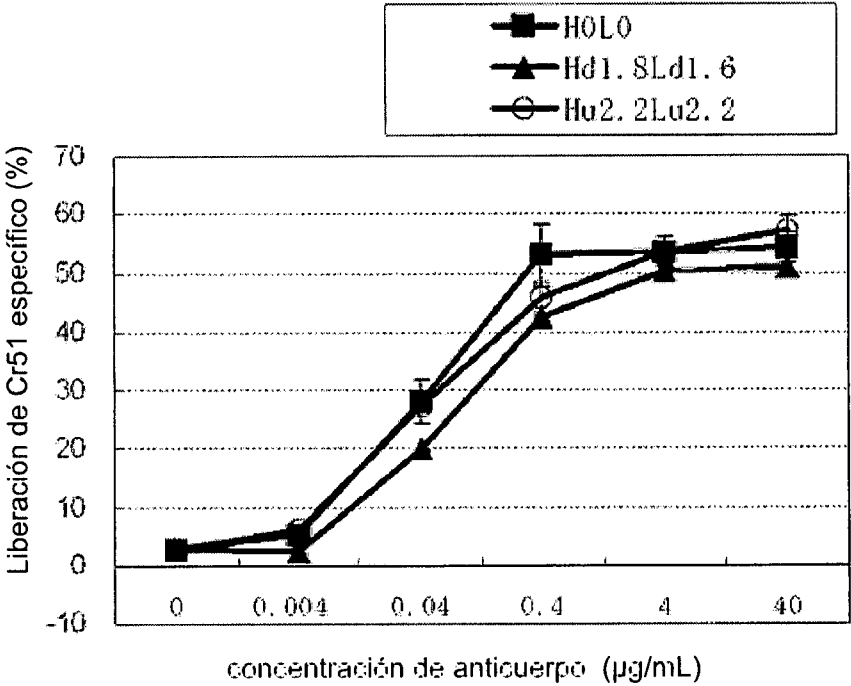
A



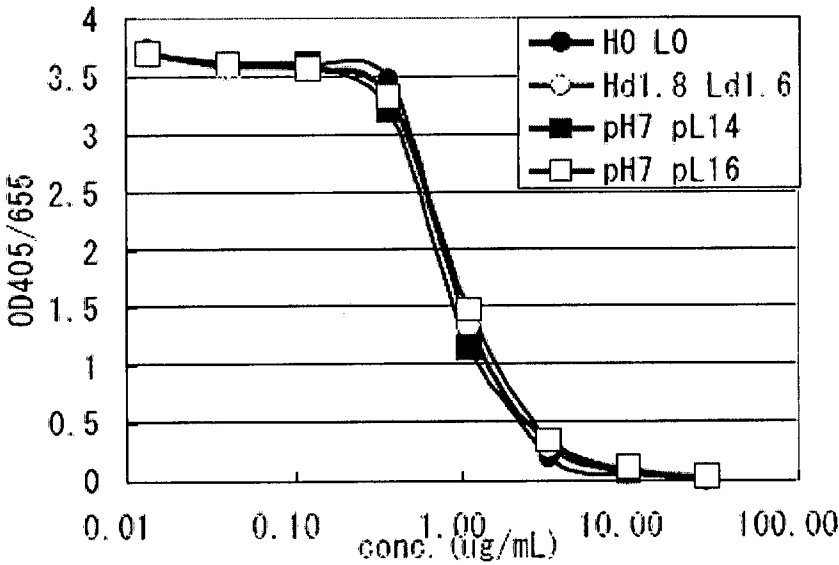
B



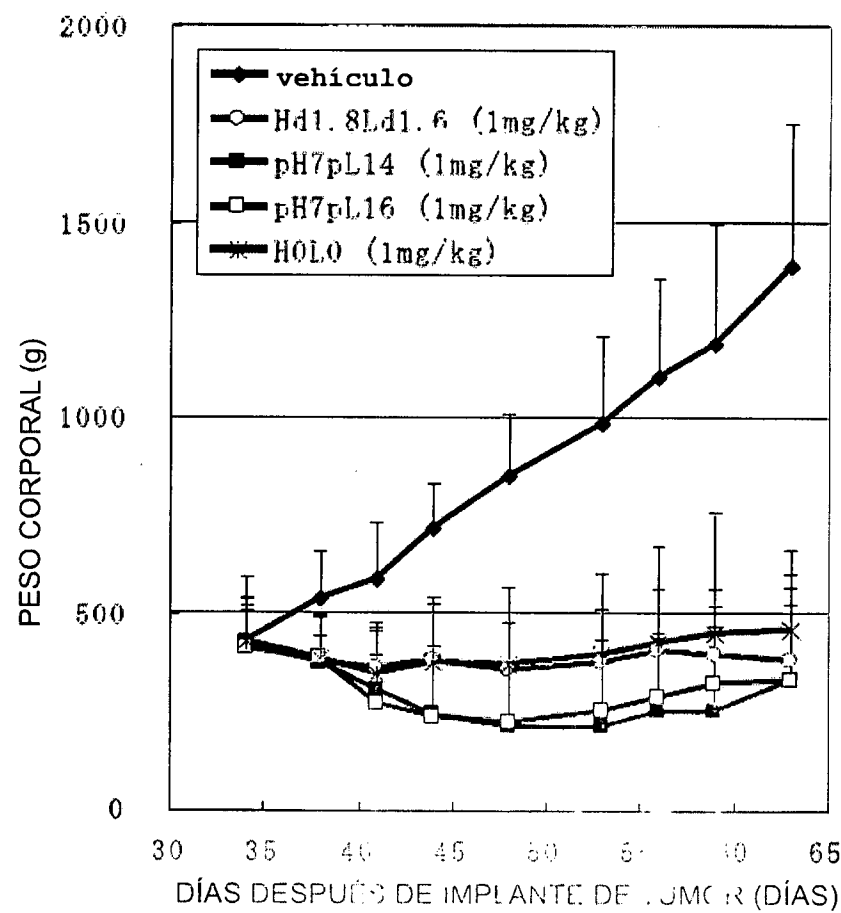
【FIG. 9】



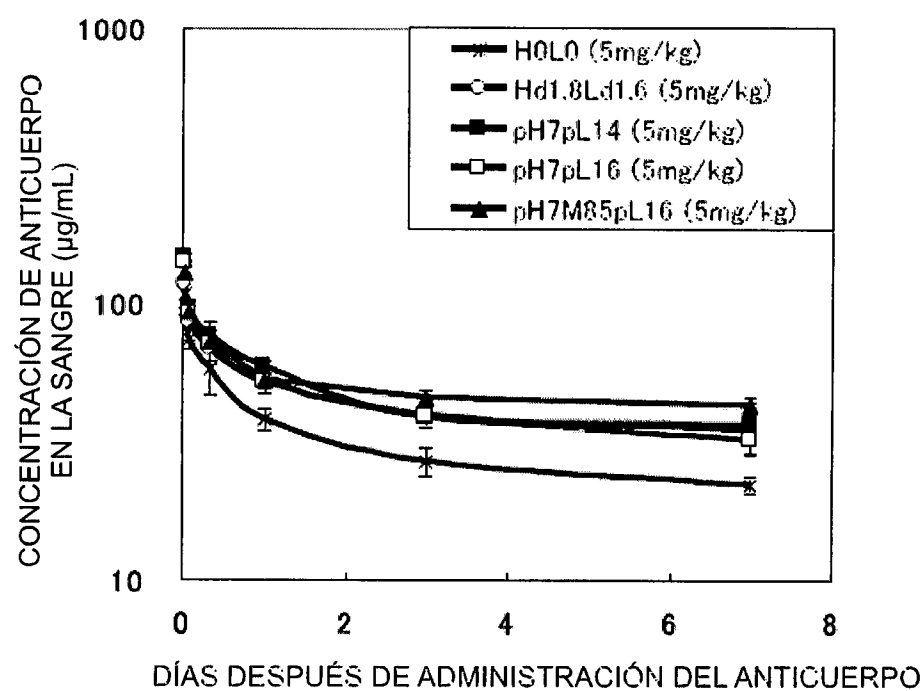
【FIG. 10】



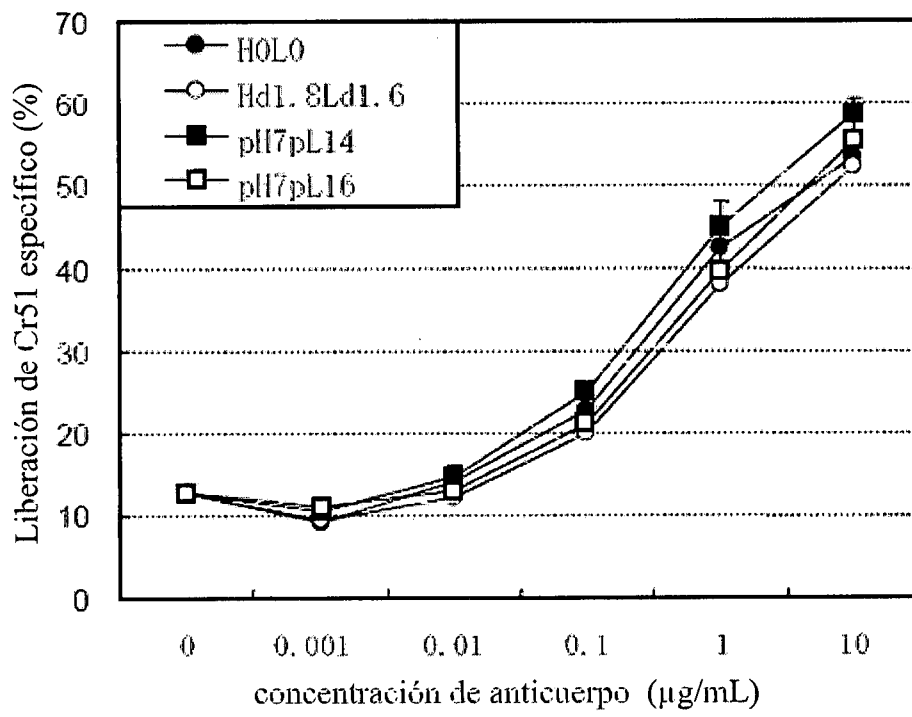
【FIG. 11】



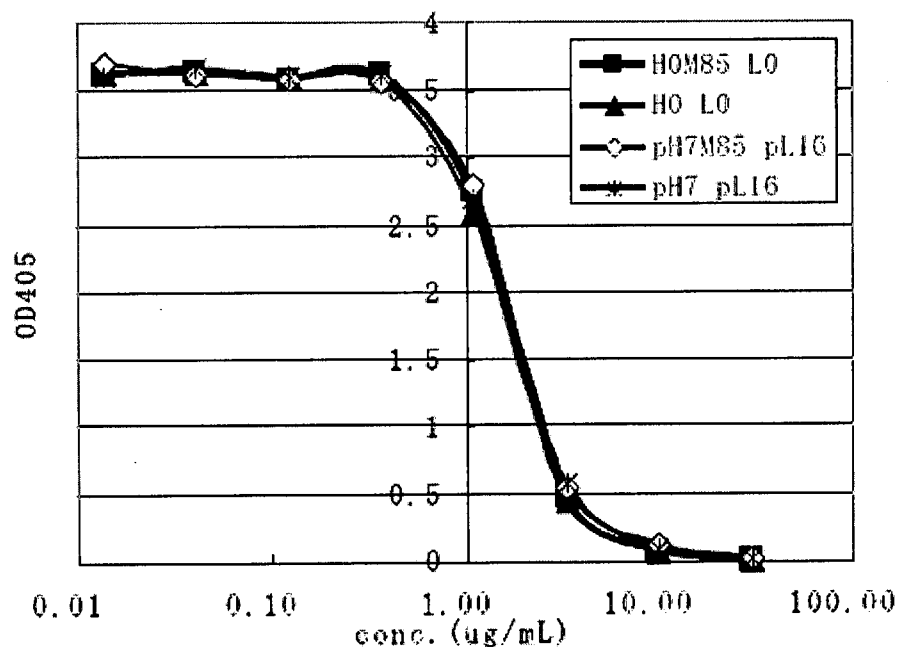
【FIG. 12】



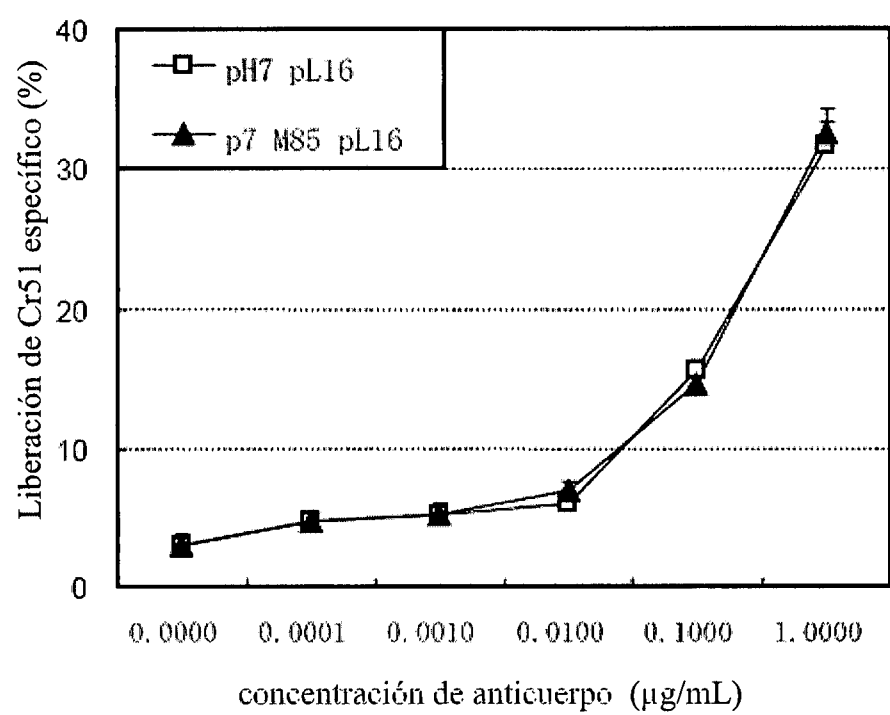
【FIG. 13】



【FIG. 14】



【FIG. 15】



(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2009年4月2日 (02.04.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/041062 A1

(51) 国際特許分類:

C12P 21/08 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)

(30) 優先権データ:

特願2007-256065 2007年9月28日 (28.09.2007) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2008/002690

(22) 国際出願日:

2008年9月26日 (26.09.2008)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

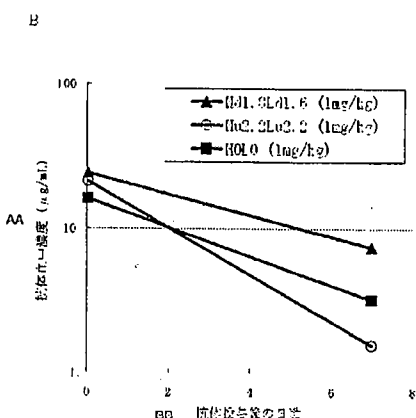
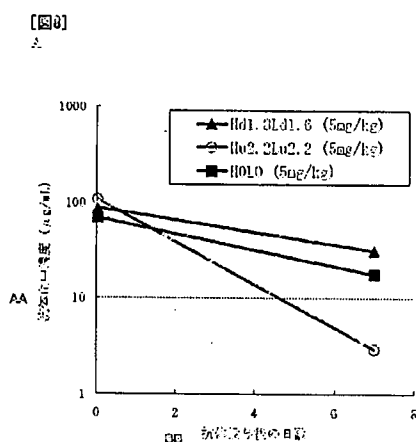
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 井川智之 (IGAWA, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 倉持太一 (KURAMOCHI, Taichi) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 白岩

[続表有]

(54) Title: ANTI-GLYPICAN-3 ANTIBODY HAVING IMPROVED KINETICS IN PLASMA

(54) 発明の名称: 血漿中動態が改善されたグリピカン3抗体



AA ANTIBODY LEVEL IN BLOOD (pg/mL)
BD DAYS AFTER ADMINISTRATION OF ANTIBODY

(57) Abstract: [PROBLEMS] To provide: a method for controlling the half-life of an anti-glypican-3 antibody in the plasma; a pharmaceutical composition comprising an anti-glypican-3 antibody having a controlled half-life in the plasma as an active ingredient; a method for producing the anti-glypican-3 antibody; and a method for producing a pharmaceutical composition comprising the anti-glypican-3 antibody as an active ingredient. [MEANS FOR SOLVING PROBLEMS] Disclosed are: a method for controlling the half-life of an anti-glypican-3 antibody in the plasma by modifying an amino acid residue exposed on the surface of the anti-glypican-3 antibody; an anti-glypican-3 antibody whose half-life in the plasma is controlled by the modification of an amino acid residue; a pharmaceutical composition comprising the antibody as an active ingredient; and a method for producing the pharmaceutical composition.

(57) 要約: 【課題】 グリピカン3抗体の血漿中半減期を制御する方法、血漿中半減期が制御されたグリピカン3抗体を有効成分として含有する医薬組成物、並びに、当該グリピカン3抗体および当該グリピカン3抗体を有効成分として含む医薬組成物の製造方法を提供すること。【解決手段】 グリピカン3抗体の表面に露出するアミノ酸残基の改変により、グリピカン3抗体の血漿中半減期を制御する方法、アミノ酸残基の改変により血漿中半減期が制御されたグリピカン3抗体、当該抗体を有効成分として含む医薬組成物、並びに、それらの医薬組成物の製造方法が開示される。

WO 2009/041062 A1



宮文 (SHIRAIWA, Hirotake) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 角田浩行 (TSUNODA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 橋達彦 (TACHIBANA, Tatsuhiko) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 石黒敬弘 (ISHIGURO, Takahiro) [JP/JP]; 〒2473530 神奈川県鎌倉市梶原200 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 大野聖二, 外(OHNO, Seiji et al.); 〒1006036 東京都千代田区霞が関3丁目2番5号 霞が関ビル 36階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BF, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LI, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,

NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, EG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GE, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

— 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則4.17(ii))

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUEMISSION OF TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OHNO, Seiji
OHNO & PARTNERS, Kasumigaseki Building 36F,
2-5, Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo
1006036
JAPON

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 29 October 2003 (29.10.2003)	
Applicant's or agent's file reference PCG-9023WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP2003/002690	International filing date (day/month/year) 26 September 2003 (26.09.2003)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 23 September 2007 (23.09.2007)
Applicant CHUGAI SEITAFU HAKUSHI H AISHA et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "IP", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Office(s), for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
23 September 2007 (23.09.2007)	2007-255085	JP	23 October 2003 (23.10.2003)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Masashi Honda

e-mail PT08.PCT@WIPO.INT

Telephone No. +41 22 338 74 03

Facsimile No. +41 22 338 82 70

From the INTERNATIONAL BUREAU

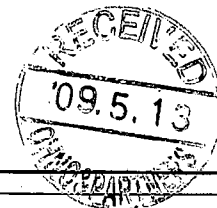
PCT

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF
THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH
DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT
UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

OHNO, Seiji
OHNO & PARTNERS, Kasumigaseki Building 36F, 2-5,
Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo
1006036
JAPAN



Date of mailing (day/month/year) 30 April 2009 (30.04.2009)		
Applicant's or agent's file reference PCG-9023WO		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP2008/002690	International filing date (day/month/year) 26 September 2008 (26.09.2008)	Priority date (day/month/year) 28 September 2007 (28.09.2007)
Applicant CHUGAI SEITAKU KASEI KOGYEN KAISHA et al		

1. **ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does apply**, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).

2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
02 April 2009 (02.04.2009)

None

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

LU, TZ, UG

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph, be 20 MONTHS** from the priority date.

In practice, time limits other than the 20-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For regular updates on the applicable time limits (20 or 21 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Masashi Honda
Facsimile No. +41 22 338 82 70	e-mail: pt03.pct@wipo.int

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

SECOND AND SUPPLEMENTARY NOTICE
INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES
WHICH APPLY THE 30 MONTH TIME
LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

OHNO, Seiji
OHNO & PARTNERS, Hasumigasaki Building 30F, 2-2-1
Hasumigasaki 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo
100-036
JAPAN



Date of mailing (day/month/year) 23 January 2010 (23.01.2010)		
Applicant's or agent's file reference PCG-9023WO		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP2008/002690	International filing date (day/month/year) 26 September 2003 (26.09.2003)	
		Priority date (day/month/year) 23 September 2007 (23.09.2007)
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al		

- ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does not apply**, please see Form PCT/IB/308 (First Notice) issued previously.
- Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
02 April 2009 (02.04.2009)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EF, HU, IG, JP, KR, MD, ME, MY, MZ, NA, NG, PG, RU, SY, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

- The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

AE, AG, AL, AM, AO, AP, AT, BA, BE, BG, BH, BR, BW, CA, CH, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GE, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KM, KN, KZ, LA, LC, LI, LR, LS, LT, LY, MA, ME, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, RS, SC, SD, SE, SG, SI, SL, SM, ST, SV, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated or elected Office(s) listed above, the applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be **30 MONTHS** from the priority date.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated or elected Office(s) listed above. For regular updates on the applicable time limits (30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Masashi Honda
Facsimile No. +41 22 338 82 70	e-mail: pi02.pct@wipo.int

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/002690

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12F21/08(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/30(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12F21/08, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/30, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), Caplus (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GenSeq,
SwissProt/PIR/GenSeq, JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII),

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/046751 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 04 May, 2006 (04.05.06), Examples; referential examples & EP 1816140 A1 & CA 2585196 A & KR 10-2007-0070222 A & CN 101068836 A	1-14
Y	WO 2006/067913 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 29 June, 2006 (29.06.06), Examples; referential examples & EP 1829962 A1 & EP 1829961 A1 & WO 2006/067847 A1	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

*

Special categories of cited documents:

"A"

document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E"

earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L"

document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O"

document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P"

document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 December, 2008 (15.12.08)

Date of mailing of the international search report

22 December, 2008 (22.12.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/002690

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 02-023200 A (NeoEx Corp.), 30 January, 1990 (30.01.90), Claims 1, 3, 9; page 2, lower left column, lines 14 to 18; examples; Figs. 2, 3; abstract & US 5322678 A & US 5625180 A & EP 329185 A2 & DE 68914699 C & AU 3006939 A & AU 3006939 A1	1-14
Y	WO 2007/005612 A2 (MEDIMMUNE, INC.), 11 January, 2007 (11.01.07), Examples 2 to 5 & EP 1899477 A & CA 2614181 A	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/002690

Continuation of E. FIELDS SEARCHED

Electronic data base consulted during the international search
(name of data base and, where practicable, search terms used)

JST7580 (JDreamII)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/002690

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1 - 14

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JF2008/002690

Continuation of Box No. III of continuation of first sheet (2)

The inventions of claims 1-65 are grouped into the following 1st to 8th groups of inventions.

(1st group of invention)

A method for producing an anti-glypican-3 antibody having controlled kinetics in the plasma, which comprises the steps of:

(a) culturing a host cell carrying a nucleic acid encoding an anti-glypican-3 antibody under the conditions where the nucleic acid can be expressed, wherein the anti-glypican-3 antibody has an amino acid sequence which is so modified that the electrical charge of at least one amino acid residue that can be exposed on the surface of the antibody is altered; and

(b) collecting the anti-glypican-3 antibody from a culture of the host cell.

(2nd group of invention)

A method for producing an antibody having controlled kinetics in the plasma, which comprises the steps of:

(a) culturing a host cell carrying a nucleic acid encoding an antibody under the conditions where the nucleic acid can be expressed, wherein the antibody has an amino acid sequence which is so modified that the electrical charge of an amino acid residue located in a constant region other than the FcRn-binding region of the antibody is altered; and

(b) collecting the antibody from a culture of the host cell.

(3rd group of invention)

A method for stabilizing an anti-glypican-3 antibody having a complementary-determining region (CDR) derived from a non-human animal, a framework region (FR) derived from human, and a human constant region, which comprises the steps of:

(a) culturing a host cell carrying a nucleic acid encoding an anti-glypican-3 antibody under the conditions where the nucleic acid can be expressed, wherein the anti-glypican-3 antibody has an amino acid sequence which is so modified that the T_m value can be increased by the modification of at least one amino acid residue; and

(b) collecting the antibody from a culture of the host cell.

(4th group of invention)

A method for producing an antibody having controlled cytotoxicity, which comprises the steps of:

(a) culturing a host cell carrying a nucleic acid encoding an antibody under the conditions where the nucleic acid can be expressed, wherein the antibody has an amino acid sequence which is so modified that the electrical charge of at least one amino acid residue that can be exposed on the surface of the antibody having a cytotoxicity is altered; and

(b) collecting the antibody from a culture of the host cell.

(continued to next sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/002690

(5th group of invention)

An antibody which has:

(1) a heavy-chain variable region having one or more substitutions selected from the following substitutions (a) to (f) in the amino acid sequence for the heavy-chain variable region depicted in SEQ ID NO:1:

(a) the substitution of K that is an amino acid residue at position-19 by T;

(b) the substitution of Q that is an amino acid residue at position-43 by E;

(c) the substitution of Q that is an amino acid residue at position-62 by E;

(d) the substitution of K that is an amino acid residue at position-63 by S;

(e) the substitution of K that is an amino acid residue at position-65 by Q; and

(f) the substitution of G that is an amino acid residue at position-66 by D; and/or

(2) a light-chain variable region having one or more substitutions selected from the following substitutions (g) to (k) in the amino acid sequence for the light-chain variable region depicted in SEQ ID NO:7:

(g) the substitution of R that is an amino acid residue at position-24 by Q;

(h) the substitution of Q that is an amino acid residue at position-27 by E;

(i) the substitution of K that is an amino acid residue at position-79 by T;

(j) the substitution of R that is an amino acid residue at position-82 by S; and

(k) the substitution of K that is an amino acid residue at position-112 by E.

(6th group of invention)

An antibody which has:

(1) a heavy-chain variable region having one or more substitutions selected from the following substitutions (a) to (c) in the amino acid sequence for the heavy-chain variable region depicted in SEQ ID NO:1:

(a) the substitution of Q that is an amino acid residue at position-43 by K;

(b) the substitution of D that is an amino acid residue at position-52 by N; and

(c) the substitution of Q that is an amino acid residue at position-107 by R; and/or

(2) a light-chain variable region having one or more substitutions selected from the following substitutions (d) to (f) in the amino acid sequence for the light-chain variable region depicted in SEQ ID NO:7:

(d) the substitution of E that is an amino acid residue at position-17 by Q;

(e) the substitution of Q that is an amino acid residue at position-27 by R; and

(f) the substitution of Q that is an amino acid residue at position-105 by R.

(continued to next sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/002690

(7th group of invention)

An antibody having one or more substitutions selected from the following substitutions (a) to (f) in the amino acid sequence for the heavy-chain constant region depicted in SEQ ID NO:31:

- (a) the substitution of H that is an amino acid residue at position-151 by Q;
- (b) the substitution of K that is an amino acid residue at position-157 by Q;
- (c) the substitution of R that is an amino acid residue at position-239 by Q;
- (d) the substitution of D that is an amino acid residue at position-239 by E;
- (e) the substitution of L that is an amino acid residue at position-241 by M; and
- (f) the substitution of Q that is an amino acid residue at position-302 by E.

(8th group of invention)

An antibody having the heavy-chain constant region depicted in SEQ ID NO:33.

The 1st to 3th groups of inventions share no common special technical feature.

The claims describe the above-stated eight general inventive concepts. However, these general inventive concepts share no common novel special technical feature. Consequently, it is considered that the present application do not comply with the requirement of unity of invention (PCT Rule 13 (PCT Rule 13.1, 13.2 and 13.3)).

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C12P21/02(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/30(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C12P21/02, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/30, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
日本国実用新案公報 1995-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2002年 日本国実用新案登録公報 1996-2002年 日本国登録実用新案公報 1994-2002年			
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
BIOSIS/MEDLINE/WPIDE (STN), Caplus (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	WO 2006/046751 A1 (中外製薬株式会社) 2006.05.04, 実施例、参考 実施例 & EP 1816140 A1 & CA 2585196 A & KR 10-2007-0070222 A & CN 101068836 A	1 ~ 14	
Y	WO 2006/067913 A1 (中外製薬株式会社) 2006.06.29, 実施例、参考 実施例 & EP 1829962 A1 & EP 1829961 A1 & WO 2006/067847 A1	1 ~ 14	
Y	JP 02-028200 A (ネオロジクス コーポレーション) 1990.01.30, 請 求項1, 3, 9, 8頁左下欄14~18行、実施例、図2, 3, 要	1 ~ 14	
② C欄の続きにも文献が列挙されている。 ③ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 15.12.2008		国際調査報告の発送日 22.12.2008	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田中 晴絵 電話番号 03-3581-1101 内線 3458	411 9739

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表す	関連する 請求の範囲の番号
Y	約等 & US 5322678 A & US 5635130 A & EP 329185 A2 & DE 68914693 C & AU 3006939 A & AU 3006989 A1 WO 2007/005612 A2 (MEDIMMUNE, INC.) 2007.01.11, EXAMPLE 2 ~ 5 & EP 1899477 A & CA 2614181 A	1 ~ 14

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1～14

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求の範囲 1 ～ 35 に記載される発明は、以下の発明群 1 ～ 8 に区分される。

(発明群 1)

血漿中動態が制御されたグリピカイン抗体の製造方法であって、

(a) グリピカイン抗体をコードする核酸を保持する宿主細胞を、当該核酸が発現する条件下で培養し、ここで、当該グリピカイン抗体は、抗体の表面に露出され得る少なくとも一つのアミノ酸残基の電荷が改変されるように変更されたアミノ酸配列を有しており、そして

(b) 当該宿主細胞の培養物からグリピカイン抗体を回収する、
の各段階を含む方法。

(発明群 2)

血漿中動態が制御された抗体の製造方法であって、

(a) 抗体をコードする核酸を保持する宿主細胞を、当該核酸が発現する条件下で培養し、ここで、当該抗体は、抗体の FcRn 結合領域以外の定常領域にあるアミノ酸残基の電荷が改変されるように変更されたアミノ酸配列を有しており、そして

(b) 当該宿主細胞の培養物から抗体を回収する、
の各段階を含む方法。

(発明群 3)

ヒト以外の動物由来の相補性決定領域 (CDR)、ヒト由来のフレームワーク領域 (FR) 及びヒト定常領域を含むグリピカイン抗体の安定化方法であって、

(a) グリピカイン抗体をコードする核酸を保持する宿主細胞を、当該核酸が発現する条件下で培養し、ここで、当該グリピカイン抗体は、少なくとも一つのアミノ酸残基の改変により Tm 値の増大をもたらすように変更されたアミノ酸配列を有しており、そして

(b) 当該宿主細胞の培養物から抗体を回収する、
の各段階を含む方法。

(発明群 4)

細胞傷害活性が制御された抗体の製造方法であって、

(a) 抗体をコードする核酸を保持する宿主細胞を、当該核酸が発現する条件下で培養し、ここで、当該抗体は、細胞傷害活性を有する抗体の表面に露出され得る少なくとも一つのアミノ酸残基の電荷が改変されるように変更されたアミノ酸配列を有しており、そして

(b) 当該宿主細胞の培養物から抗体を回収する、
の各段階を含む方法。

(発明群 5)

(1) 配列番号 1 で表される重鎖可変領域のアミノ酸配列において以下のいずれか一つ又はそれ以上の置換、

- (a) 19 番目のアミノ酸残基である R の T への置換、
- (b) 43 番目のアミノ酸残基である Q の E への置換、
- (c) 62 番目のアミノ酸残基である Q の E への置換、
- (d) 63 番目のアミノ酸残基である K の S への置換、
- (e) 65 番目のアミノ酸残基である K の Q への置換、
- (f) 66 番目のアミノ酸残基である G の D への置換、

が施された重鎖可変領域、および、又は、

(2) 配列番号 7 で表される軽鎖可変領域のアミノ酸配列において以下のいずれか一つ又はそれ以上の置換、

- (g) 24 番目のアミノ酸残基である R の Q への置換、
- (h) 27 番目のアミノ酸残基である Q の E への置換、
- (i) 79 番目のアミノ酸残基である K の T への置換、
- (j) 82 番目のアミノ酸残基である R の S への置換、
- (k) 112 番目のアミノ酸残基である K の E への置換、

が施された軽鎖可変領域、
を含む抗体。

(発明群 6)

配列番号 1 で表される重鎖可変領域のアミノ酸配列において以下のいずれか一つ又はそれ以上の置換；

- (a) 43 番目のアミノ酸残基である Q の E への置換、
- (b) 52 番目のアミノ酸残基である D の H への置換、
- (c) 107 番目のアミノ酸残基である Q の R への置換、

が施された重鎖可変領域、および、又は、

(2) 配列番号 7 で表される軽鎖可変領域のアミノ酸配列において以下のいずれか一つ又はそれ以上の置換；

- (d) 17 番目のアミノ酸残基である E の Q への置換、
- (e) 27 番目のアミノ酸残基である Q の R への置換、
- (f) 105 番目のアミノ酸残基である Q の R への置換、

が施された軽鎖可変領域、
を含む抗体。

(発明群 7)

配列番号 31 で表わされる重鎖定常領域のアミノ酸配列において以下のいずれか一つ又はそれ以上の置換；

- (a) 151 番目のアミノ酸残基である H の Q への置換、
- (b) 157 番目のアミノ酸残基である K の Q への置換、
- (c) 238 番目のアミノ酸残基である R の Q への置換、
- (d) 239 番目のアミノ酸残基である D の E への置換、
- (e) 241 番目のアミノ酸残基である L の M への置換、
- (f) 302 番目のアミノ酸残基である Q の E への置換、

を有する抗体。

(発明群 8)

配列番号 33 で表わされる重鎖定常領域を含む抗体。

上記の発明群 1 ～ 8 は、共通した特別な技術的特徴を有していない。

請求の範囲には、上記の 8 つの一般的発明概念が記載されているが、それぞれの一般的発明概念の間には、新規な特別の技術的特徴が共有されていないため、この出願は発明の単一性の要件（法施行規則第 13 条（PCT 規則 13.1、13.2 及び 13.3））を満たしていないと認める。



No. 10-041193- -00000-0000

Fecha: 2010-04-09 15:30:02
Tra: 11 PATENTEIYI
Act: 411 PRESENTACIONDep: 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 229PATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
 - ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D' ALEMAN DILIA MARIA
Apoderado(a) y/o Representante de
CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

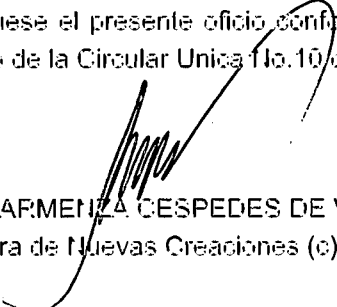
REFERENCIA	Radicación No.	10 041193
	Solicitud internacional	PCT/JP2008/002680
	Fecha inicio fase nacional	28/04/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	 070881

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal E) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título I de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.


ALIX CARMONA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 04 JUN. 2010
adpa11