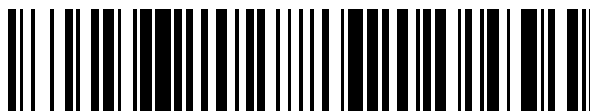


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 032**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2009 PCT/IT2009/000035**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.08.2010 WO10089782**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2009 E 09787638 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2393512**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 y sus usos en el tratamiento y diagnóstico de tumores**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.05.2017**

73 Titular/es:  
**ONCOXX BIOTECH S.R.L. (100.0%)**  
**Via Garibaldi Vico XVII, 15**  
**66034 Lanciano (CH), IT**

72 Inventor/es:  
**ALBERTI SAVERIO**

74 Agente/Representante:  
**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 611 032 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 y sus usos en el tratamiento y diagnóstico de tumores

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 y sus usos en el tratamiento y diagnóstico de tumores. Más en particular, la invención se refiere a anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 que tienen una alta afinidad y son capaces de reconocer diferentes regiones de la molécula Trop-2 y sus usos en el tratamiento y diagnóstico de tumores, tales como por ejemplo tumores de endometrio, mama, cabeza y cuello, colon-recto, estómago, pulmón, ovario, próstata, páncreas, cuello uterino, riñón y vejiga (uroteliales).

La Trop-2 (AC: P09758) es una molécula que transduce una señal que determina un aumento del calcio citoplasmático<sup>1</sup> y que está implicado en la adhesión célula-célula y célula/matriz en los tejidos epiteliales. Trop-2 es también conocido como transductor 2 de señales de calcio asociado a tumores (TACSTD-2)<sup>2,3</sup>, GA733-1, EGP, MR23, MR54, RS-7 y T16<sup>4-6</sup>. Trop-2 se localiza a todo lo largo de la membrana en las células epiteliales<sup>4</sup>. El dominio extracelular de Trop-2, la porción globular, contiene un dominio similar a EGF, seguido por un dominio de tiroglobulina y está implicado en la adhesión celular. La región globular va seguida por una región sin cisteínas, que se supone actúa como un vástago de soporte<sup>3,7</sup>. El dominio intracelular de Trop-2 tiene una longitud de 26 aminoácidos y contiene un dominio HIKE<sup>8</sup>, que incluye un sitio de fosforilación de proteína-quinasa C (PKC) (Ser303)<sup>9</sup>.

Los autores de la presente invención han confirmado y ampliado los datos anteriores<sup>4-6</sup>, mostrando que Trop-2 es expresado por la mayoría de los tumores en el hombre. Los análisis de micromatrices de DNA, EST, SAGE, transferencia de Northern y RT-PCR mostraron la expresión del mRNA de Trop-2 en las líneas celulares de cánceres de ovario, NSCLC, de próstata, de mama y de colon y en tumores humanos de estómago, colon, mama, endometrio, riñón, pulmón y ovario. La expresión del mRNA de Trop-2 también se detectó en el tejido mamario humano normal, en pulmón, útero, próstata, glándulas salivales, páncreas, vías respiratorias, timo, riñón y placenta.

Un análisis inmunohistoquímico de la expresión de la proteína Trop-2 realizado en 1755 casos de neoplasias humanas (Figura 1 y Tabla 1) mostró que la proteína Trop-2 está altamente expresada en la gran mayoría de neoplasias epiteliales malignas (entre 64% y 90% de los casos). La mayor prevalencia de la expresión de Trop-2 se encontró en los tumores de cuello uterino y páncreas, seguida por los cánceres de estómago, colon, mama y próstata y por las neoplasias de ovario, pulmón y endometrio. Los linfomas, melanomas, tumores cerebrales y sarcomas no expresan Trop-2 (Figura 1 y Tabla 1 en relación con la expresión de Trop-2 en tumores primarios humanos y sus metástasis correspondientes).

Tabla 1

N ° de casos	Tejidos normales <sup>a</sup>			Tumores <sup>b</sup>		Metástasis <sup>c</sup>		P <sup>d</sup>
	Alto	Medio	Bajos o ausente	Superior	Inferior	Superior	Inferior	
Mama	4 (4%)	30 (30%)	66 (66%)	95 (95%)	5 (5%)	58 (58%)	16 (16%)	<0,001
Colon	0	0	48 (100%)	42 (88%)	6 (12%)	20 (42%)	8 (17%)	0,003
Estómago	0	0	39 (100%)	28 (72%)	11 (28%)	16 (41%)	3 (9%)	0,001
Ovario	0	0	10 (100%)	9 (90%)	1 (10%)	6 (60%)	2 (20%)	

a: expresión en tejidos normales. b, c: mayor o menor expresión en tumores primarios con respecto a los tejidos normales, y en las metástasis con respecto a los tumores primarios correspondientes. d: valor de p en el ensayo de Wilcoxon.

Tanto *in vitro* como *in vivo* se ha demostrado una función directa de Trop-2 en el desarrollo de tumores. La introducción de Trop-2 en MTE 4-14 e Igrov-1 o su sobreexpresión en KM12SM estimuló el crecimiento tanto de células completamente transformadas como simplemente inmortalizadas (Figura 2a), lo que indica que la expresión de Trop-2 es a la vez necesaria y suficiente para estimular el crecimiento de células tumorales.

Se obtuvieron resultados similares en tumores experimentales (células tumorales 293 o L inyectadas por vía subcutánea en ratones atímicos) (Figura 2b). Se demostró que la expresión de Trop-2 inducía una mayor actividad mitótica, pleomorfismo nuclear y células gigantes multinucleadas. El desarrollo del tumor era proporcional a los niveles de expresión de Trop-2.

La delección de la región citoplasmática de Trop-2 abolió la estimulación del crecimiento dependiente de Trop-2, lo que demuestra que esta región juega un papel clave en la señalización de Trop-2 (Figura 2b). La cola contiene un residuo de serina (S303) que es fosforilada por PKC<sup>9</sup>. La mutagénesis de S303 abolió la actividad de estimulación del crecimiento, lo que indica que la actividad estimulante de Trop-2 es dependiente de la fosforilación (Figura 2a).

Los análisis proteómico y fosfoproteómico de micromatrices de anticuerpos han permitido la identificación de moléculas situadas aguas abajo implicadas en la señalización de Trop-2 (Figura 3). Se mostraron alteraciones de la expresión inducida en Trop-2 para los receptores de tirosina-quinasas transmembranales (PDGFR, Met, Ret, VEGFR), tirosina-quinasas solubles, serina/treonina-quinasas, fosfatasa, reguladores del ciclo celular y moléculas reguladoras de la apoptosis. Análisis por transferencia de Western validaron los análisis de micromatrices con anticuerpos para un conjunto de moléculas y sitios de fosforilación de referencia. Los resultados obtenidos indican la activación dependiente de Trop-2 de PKC- $\alpha$ , FAK y Raf-1, la implicación de la vía de PTEN-Akt-GSK3 $\alpha$ / $\beta$ -S6K, la modulación de ERK, JNK y p38 MAPK, la inducción de NF-kappa B y la modulación de los factores de apoptosis, p53 y Rb. La modulación de las moléculas clave de este modelo (por ejemplo, ERK, ciclina D1, NFkB) se demostró que era dependiente de la presencia de una cola citoplasmática intacta de Trop-2.

La diseminación metastásica es la causa principal de muerte en la mayoría de los cánceres en el hombre<sup>10</sup>. Los tumores comunes, tales como por ejemplo los cánceres de colon, de mama y de pulmón en muchos casos ya han generado metástasis en el momento de la cirugía. Los tumores metastásicos son a menudo resistentes a la mayoría de los tratamientos terapéuticos actualmente disponibles<sup>10</sup>.

Por lo tanto, un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares de la diseminación tumoral podría desempeñar un papel crítico para un mejor tratamiento de la enfermedad neoplásica avanzada. En particular, la identificación de nuevos marcadores de la agresividad del tumor y del potencial metastásico puede contribuir a la identificación de los casos agresivos en una etapa temprana y proporcionar nuevas dianas para nuevas terapias<sup>10</sup>.

Siguiendo este enfoque estratégico los autores de la presente invención mostraron que Trop-2 es el único gen que está sobre-expresado en células metastásicas en los diferentes sistemas experimentales. Un análisis a gran escala de la expresión de Trop-2 en cánceres primarios humanos y en sus metástasis correspondientes reveló la sobre-expresión de Trop-2 en las metástasis de tumores de colon, estómago, mama y ovario. Esto fue confirmado por transferencias de Northern y Western y por técnicas de inmunohistoquímica (Figura 1 y las Tablas 1, 2).

Después de esto se demostró un papel causante para Trop-2 en la diseminación de las células metastásicas, transfectando la línea celular de tumor de colon KM12SM con Trop-2 de tipo natural o mutagenizado. A continuación, las células transfectadas se inyectaron en el bazo de ratones atímicos y se evaluó el potencial metastásico. Se demostró que la expresión de Trop-2 inducía un aumento de la diseminación metastásica en el hígado (en el 90% de los casos). La Tabla 2 muestra la capacidad metastásica de las células que expresan Trop-2.

Tabla 2

KM12SM	% de bazo invadido	Tamaño (cm <sup>3</sup> )	% de metástasis hepáticas	Tamaño (cm <sup>3</sup> )
Controles	64,9±8,7	0,11 ±0,04	45,8±14,8	0,50±0,21
Trop-2 natural	69,0±10,6	0,09±0,03	90,0±12,0 <sup>a</sup>	0,45±0,18
Trop-2 Dcyto	100,0±0 <sup>b</sup>	0,37±0,23	76,9±11,7	3,25±0,64 <sup>c</sup>
Trop-2 DHIKE	84,6±13,3	0,38±0,22	63,6±30,0	0,28±0,15
Trop-2 S303A	90,0±8,3	0,28±0,21	88,9±6,7	0,85±0,55
Trop-2 E → K	66,7±17,6	0,20±0,12	75,0±33,3	2,20±0,95 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>: Prueba exacta de Fisher: P = 0,0114 frente a controles.

<sup>b</sup>: Prueba exacta de Fisher: P = 0,0382 frente a Trop-2 natural.

<sup>c</sup>: Prueba T de Student: p <0,0001 frente a Trop-2 natural.

<sup>d</sup>: Prueba T de Student: p = 0,0204 frente a Trop-2 natural.

La expresión de Trop-2 también modificó los patrones de crecimiento, la inducción de la apoptosis, la morfología celular, la velocidad de replicación celular y las dimensiones de la metástasis.

Los altos niveles de frecuencia y expresión de Trop-2 en tumores humanos y en sus correspondientes metástasis han hecho de esta molécula en una diana atractiva para la inmunoterapia "adoptiva", es decir, basada en la administración de anticuerpos producidos experimentalmente (Figura 1 y Tabla 1).

Otros anticuerpos monoclonales dirigidos contra Trop-2 se han generado previamente<sup>4-6</sup>, pero no han sido utilizados esencialmente en ensayos clínicos como fármacos antitumorales.

Además, muchos anticuerpos tienen una baja afinidad, mientras que se sabe que los anticuerpos de alta afinidad dirigidos contra una molécula que es estructuralmente análoga a Trop-2 (Trop-1, Ep-CAM, GA733-2)<sup>3,7</sup> pueden ser más citotóxicos para las células tumorales. Los datos *in vitro* sobre el efecto de una afinidad de anticuerpos y de la densidad del antígeno diana sobre la eficacia de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) reveló que la alta afinidad de un anticuerpo puede inducir la muerte de las células con bajos niveles de expresión del antígeno, o, en el caso de niveles comparables, con mayor eficacia<sup>11</sup>. Puesto que la heterogeneidad de la expresión del antígeno diana es una característica común en los tumores humanos, el uso de anticuerpos de alta afinidad

podría jugar un papel importante en conseguir mejores resultados clínicos.

Por otra parte, la mayoría de los anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 actualmente disponibles en el mercado, por ejemplo, T16, han sido generados usando líneas celulares de mieloma, tales como NS-1 o SP2-1 como parejas de fusión, que retienen la expresión de la cadena ligera de la inmunoglobulina parental. Esto hizo que estos anticuerpos fueran en realidad mezclas heterogéneas de anticuerpos con una, ambas o ninguna de las cadenas ligeras que participan directamente en el reconocimiento de Trop-2.

Se conocen las solicitudes de patentes WO03/074566, US2004/001825, US2007/212350 y US2008/131363, que muestran anticuerpos RS7 y sus usos en el tratamiento y diagnóstico de tumores.

Se obtuvo el anticuerpo monoclonal RS7 por inmunización de ratones con tejido procedente de carcinoma epidermoide de pulmón, es decir, sin seleccionar la reactividad frente a porciones específicas y diferentes de la molécula de Trop-2. Esto evita la utilización sinérgica y personalizada de los diferentes anticuerpos monoclonales, es decir, el uso del mejor anticuerpo monoclonal para cada tumor individual, como se determina por las modificaciones pos-traduccionales de Trop-2 y por la capacidad de esta molécula de generar señales intracelulares que controlan el crecimiento del tumor.

Es conocida la solicitud de patente WO2008/144891, que describe un anticuerpo monoclonal anti-Trop 2 para el tratamiento de tumores. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal AR47A6.4.2 allí descrito se deriva de la selección de anticuerpos con capacidades citotóxicas o citostáticas *in vitro*. En otros términos, esta selección no se basa en la eficacia *in vivo*, que es el parámetro fundamental por el que se debe evaluar la eficacia de estos anticuerpos. De hecho la solicitud de patente antes mencionada no describe ninguna prueba de mejora con respecto a los anticuerpos de la técnica anterior, tal como RS7 por una comparación de las eficacias.

Además, el anticuerpo monoclonal AR47A6.4.2 mostró eficacia contra un solo tipo de tumor (BxPC-3) en una fase avanzada del crecimiento, que crece ya en el animal experimental, que se considera que es la prueba más rigurosa y fiable de la actividad en tumores experimentales.

El anticuerpo monoclonal AR47A6.4.2 se obtuvo por inmunización de ratones con tejido procedente de un tumor de ovarios, es decir, sin seleccionar la reactividad frente a porciones específicas y diferentes de la molécula de Trop-2. Como en el caso del anticuerpo RS7 esto impide el uso sinérgico y personalizado de los diferentes anticuerpos monoclonales, es decir, usar el mejor anticuerpo monoclonal para cada tumor individual, tal como se determina por las modificaciones pos-traduccionales de Trop-2 y por la capacidad de esta molécula para generar señales intracelulares que controlan el crecimiento del tumor.

Por último, la solicitud de patentes WO2008/144891 utiliza el ratón como único modelo experimental para mostrar la falta de toxicidad del anticuerpo monoclonal AR47A6.4.2. El ratón no expresa Trop-2 humano, por lo tanto, no es adecuado para la verificación de la toxicidad de anticuerpos anti-Trop-2 contra células normales. Por el contrario, la presente solicitud describe la expresión de Trop-2 en células epiteliales de epidermidis, esófago, páncreas exocrino, urotelio y otros tejidos humanos. Esto implica una citotoxicidad esperada potencialmente grave, por ejemplo, como la pancreatitis aguda, en el caso de administración sistémica (por ejemplo, intravenosa), como se muestra para los anticuerpos anti-Trop-1 (ING-1).

También las solicitudes de patentes US 2008/305104, WO2007/095748, Truong A. H. L. et al., *European Journal of Cancer, Supplement, Pergamon, Oxford, GB*, vol. 6, nº 12, 2008, Truong A. H. L. et al., *Proceedings of the American Association for Cancer Research, Annual Meeting* vol. 49, 2008 y Truong A. H. L. et al., *Proceedings of the American Association for Cancer Research, Annual Meeting* vol. 48, 2007 se refieren al anticuerpo AR47A6.4.2 y a su uso en el tratamiento y diagnóstico de tumores en modelos de ratón.

Por lo tanto, a la luz de lo que se ha descrito anteriormente existe claramente la necesidad de nuevos anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 capaces de superar las desventajas de los anticuerpos de la técnica anterior.

En particular, es importante que los anticuerpos monoclonales anti-tumorales (es decir, dirigidos contra Her2/neu) se dirijan contra porciones específicas de la molécula, de modo que eviten cambios conformacionales o interacciones específicos con otras moléculas de señalización, que desempeñan un papel fundamental en la determinación de la eficacia terapéutica antitumoral<sup>12</sup>.

Otro aspecto importante es la posibilidad de tener múltiples anticuerpos, que no compitan por la unión a Trop-2. Esto hace que sea posible que se unan a mayor número de células tumorales, cuando las dianas de los anticuerpos individuales (epítomos en términos técnicos) se expresan selectivamente en diferentes fases de desarrollo o diferenciación del tumor. Por otra parte, esto permite la unión simultánea de un número mayor de moléculas de anticuerpo a su diana, con el correspondiente aumento en la eficacia.

Los autores de la presente invención han preparado ahora nuevos anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 que son homogéneos y con gran afinidad y que están dirigidos contra diferentes regiones de la molécula (Figuras 4 y 5), al contrario que los anticuerpos ya conocidos, para una utilización eficaz en aplicaciones biomédicas. Los anticuerpos anti-Trop-2 objeto de la presente invención son activos contra el crecimiento de múltiples tipos de tumores, tales como, por ejemplo, cánceres de colon Colo-205, HCT-116 y HT29; cáncer de ovario SKOV; cáncer de mama SKBR3 y MDA MB468. Por otra parte los anticuerpos objeto de la presente invención tienen una actividad anti-tumoral superior respecto a los anticuerpos RS7 de la técnica anterior, como se muestra en modelos experimentales de

tumores humanos inyectados en ratones inmuno-deprimidos (Figura 6).

Los autores de la presente invención han desarrollado nuevas estrategias para la generación de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer diferentes regiones de la molécula Trop-2. Para la generación de nuevas líneas celulares de hibridoma que segregan anticuerpos monoclonales dirigidos contra Trop-2, se sometieron a múltiples ciclos de inmunización ratones Balb/c utilizando la porción extracelular completa de la molécula Trop-2 humana (NCBI RefSeq NM\_002353)<sup>3</sup>, producida por líneas de células de mamíferos (L y 293) o por baculovirus que expresan las construcciones correspondientes.

Un aspecto fundamental de la estrategia de aislamiento de hibridomas anti-Trop-2 fue el procedimiento de selección de las poblaciones celulares de hibridoma por su reactividad específica contra las células L transfectadas con Trop-2 y ausencia de reactividad contra transfectantes L de control de vector vacío, que hizo que el procedimiento de cribado fuera tanto estricto como eficaz. Este procedimiento de cribado se realizó por ensayos de citofluorimetría o ELISA sobre células L transfectadas o no transfectadas.

Los procedimientos empleados en la presente invención hacen uso de ensayos ELISA y similares en proteínas Trop-2 recombinantes o porciones de la proteína, producidas en células de insecto infectadas con Trop-2-baculovirus o en células de mamífero. Esto permitió la utilización de las proteínas Trop-2 recombinantes con plegamiento natural y glicosilación, por lo tanto, estrictamente correspondientes a las moléculas realmente expresadas por las células tumorales, para un cribado eficiente.

Además, los autores generaron vectores que expresaban sólo la región globular o de vástago de Trop-2. Esto permitió la selección específica de anticuerpos monoclonales dirigidos contra cualquier porción de la molécula (Figura 4) y por lo tanto potencialmente provistos de capacidades diferenciales o interferentes para la agregación homotípica/adhesión celular o penetración a través de retículos moleculares de Trop-2 ya establecidos, respectivamente.

La prueba formal del reconocimiento de la molécula Trop-2 por los anticuerpos monoclonales generados como se describe anteriormente está constituida por la capacidad de estos anticuerpos de teñir la línea celular murina MTE-4-14 transfectada con el gen Trop-2 humano, como se ve en experimentos de inmunofluorescencia (Figura 5).

Estas nuevas tecnologías permitieron obtener anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 con alta afinidad para la molécula de tipo natural y especificidad para diferentes porciones de la molécula. La eficacia de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra Trop-2 se demostró en ratones atímicos usando como modelos ya sea fibrosarcomas originados por células L que expresan Trop-2 o xenoinjertos de líneas celulares de tumores humanos, por ejemplo, de tumores de ovario, mama y colon. A continuación se seleccionaron los anticuerpos monoclonales, que resultaron ser los mejores/más eficaces *in vivo*<sup>4</sup>, alcanzando esencialmente la inhibición completa del crecimiento tumoral (Figuras 6 y 7).

Como se indica anteriormente, los anticuerpos objeto de la presente invención mostraron una mayor eficacia respecto a la del anticuerpo RS7 (Figura 6). El anticuerpo utilizado en estos experimentos es el anticuerpo monoclonal mRS7, como se describe en la solicitud de patente WO03/074566, y en esa misma solicitud se muestra que tienen la misma afinidad y actividad de unión que las variantes cRS7 y hRS7.

En lo que respecta a las estrategias de utilización de los anticuerpos anti-Trop-2 también se encontró que se podrían reducirse los potenciales efectos tóxicos sistémicos, relacionados con el uso terapéutico de los anticuerpos anti-Trop-2 de alta afinidad, por estrategias de optimización que incluirían procedimientos de "captura" para eliminar el anticuerpo circulante residual rápidamente y de manera segura/reproducibile. Como complemento de este enfoque, el uso de anticuerpos anti-Trop-2 de alta afinidad se puede aplicar a tratamientos de regiones localizadas. En particular, los autores de la presente invención han encontrado que los anticuerpos monoclonales así preparados se pueden emplear ventajosamente en administración terapéutica intraperitoneal, donde, contrariamente a la difusión sistémica, la "captura" del anticuerpo es realizada por la adsorción por las células tumorales a través de enlaces específicos. Esto es debido a la combinación de la farmacocinética esperada después de la administración intraperitoneal del anticuerpo y de los altos niveles de expresión de Trop-2 por el carcinoma de ovario y sus metástasis (Figura 1 y Tabla 1). Una segunda estrategia basada en principios esencialmente correspondientes es la administración arterial intrahepática en el caso de metástasis hepáticas de carcinoma de colon. Debe entenderse que estos tratamiento son ampliables para incluir casos similares, por ejemplo, administración local en los tumores de cabeza y cuello, así como la administración intrapleural, intravesical y en general intralesional.

Por lo tanto, es una realización específica de la presente invención, una combinación que comprende o, consiste en, los anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 aislados producidos por las líneas celulares de hibridoma depositadas en el organismo AID-ICLC en Génova (Italia) el 27 de agosto de 2008 con los números de depósito PD 08020 y PD 08021.

Preferiblemente, la combinación comprende además los anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 producidos por la línea celular de hibridoma que tiene el número de depósito PD 08019, o que consiste en los anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 aislados producidos por las líneas celulares de hibridoma que tienen los números de depósito PD 08020, PD 08021 y PD 08019.

Otras realizaciones de la presente invención son cada anticuerpo monoclonal anti-Trop-2 producido por la línea

celular de hibridoma que tiene el número de depósito PD 08020 o PD 08021.

Los anticuerpos objeto de la presente invención pueden ser anticuerpos completamente humanizados o quiméricos, en los que la región constante de murino está sustituida por regiones constantes humanas<sup>13</sup>, o variantes que contienen por lo menos una de las regiones determinantes de la complementariedad (abreviadamente CDR por sus iniciales en inglés) de la región variable de las cadenas ligera y/o pesada correspondientes y/o posiblemente mutagenizados para modificar su afinidad por la diana.

Los epítomos reconocidos por los anticuerpos descritos anteriormente están localizados en la región globular o en el vástago (Figura 4).

Además de los anticuerpos mencionados anteriormente, se podrían utilizar fragmentos de anticuerpos o moléculas quiméricas, fragmentos Fv, Fab, F(ab)<sub>2</sub>, anticuerpos anti-Trop-2 de una sola cadena o multiméricos. Los anticuerpos, fragmentos o quimeras de anticuerpos pueden proceder de los isotipos de IgM, IgD, IgG, IgA, o IgE, o ser obtenidos por su modificación por ingeniería genética.

Además, se pueden preparar derivados recombinantes de los anticuerpos objetos la presente invención, donde la región constante está sustituida por una pareja biológicamente activa o conjugada con ella, por ejemplo avidina o sus derivados, o factor de crecimiento, toxinas, citoquinas, fármacos anti-tumorales y radioisótopos o cualquier otro compuesto que sea biológicamente activo y/o útil para aumentar la eficacia terapéutica anti-tumoral.

Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas descritas anteriormente pueden ser clonados en un vector de expresión. Se entiende por vector de expresión un plásmido, cósmido, fagémido, BAC, baculovirus, vectores para levaduras o plantas, vectores de fagos, plásmidos Ti o similares, incluyendo los vectores para organismos transgénicos, para desactivación y para terapia génica. Por lo tanto se pueden preparar células que contienen y, posiblemente, expresan moléculas de ácido nucleico como se describe en la presente invención.

Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende, o consiste en, como ingrediente activo, una combinación como se ha definido anteriormente o un anticuerpo monoclonal anti-Trop-2 como se ha definido anteriormente, en asociación con uno o más excipientes y/o adyuvantes que sean farmacéuticamente aceptables. En particular, la composición farmacéutica puede estar en una forma aceptable para administración intraperitoneal, intravenosa, intrapleural, intravesical, intralesional o administración a través de la arteria hepática.

Una realización adicional de la presente invención es el uso de las combinaciones que se han definido anteriormente o el anticuerpo monoclonal anti-Trop-2 que se ha definido anteriormente o la composición que se ha definido anteriormente para la preparación de un medicamento para la prevención o la curación de tumores y/o metástasis.

El tumor, por ejemplo que expresa Trop-2, puede ser tratado antes o después de su eliminación, por medio de la administración de agentes antineoplásicos, tales como el anticuerpo o sus derivados, solos o en combinación con otras modalidades terapéuticas. En particular, las modalidades de administración de los anticuerpos anti-Trop-2 y sus derivados pueden ser sistémica o regional localizada, por ejemplo intraperitoneal, intrapleural, intravesical, intra-arteria hepática o intralesional (intratumoral). Una lista indicativa y no exhaustiva de dianas para las terapias basadas en anticuerpos anti-Trop-2 incluye tumores de endometrio, mama, cabeza y cuello, colon-recto, estómago, pulmón, ovario, próstata, páncreas, cuello uterino, riñón y vejiga (uroteliales).

Además, la presente invención describe el uso de las combinaciones que se define anteriormente, de un anticuerpo monoclonal anti-Trop-2 que se define anteriormente, para el diagnóstico de tumores *in vitro*.

Una realización adicional de la presente invención es un kit para el diagnóstico de tumores *in vitro* que comprende, o consiste en, las combinaciones que se han definido anteriormente, o el anticuerpo monoclonal anti-Trop-2 que se ha definido anteriormente o la composición que se ha definido anteriormente y medios de detección en el que dichos medios de detección son moléculas etiquetas.

Los anticuerpos descritos en la presente invención o sus derivados se pueden fusionar a secuencias, residuos individuales o moléculas sintéticas (etiquetas) que permitan la purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad. Las etiquetas utilizadas se pueden emplear como moléculas o indicadores de detección (por ejemplo, etiquetas radioisotópicas o fluorescentes) o etiquetas enzimáticas capaces de catalizar una modificación detectable de un sustrato, tanto para uso en diagnóstico en el laboratorio como para la formación de imágenes. Las técnicas de diagnóstico que se pueden utilizar son, por ejemplo microscopía óptica, confocal, fotónica múltiple y electrónica, ELISA, transferencia de Western, inmunoprecipitación, radioinmunoanalíticas y otras similares.

Los anticuerpos descritos en la presente invención se pueden utilizar para la preparación de composiciones para la detección de Trop-2 que se expresa en neoplasias, incluyendo imágenes de tumores *in vivo*. Los anticuerpos anti-Trop-2 se pueden enlazar a isótopos radiactivos o trazadores fluorescentes, por ejemplo, puntos cuánticos o cromóforos orgánicos o enzimas que pueden ser detectadas por quimioluminiscencia. La señal originada por anticuerpos anti-Trop-2 marcados es detectable por escáneres o instrumentación de tomografía, de acuerdo con los principios de los equipos avanzados actualmente utilizados, tales como en tomografía axial computarizada (abreviadamente TAC por sus siglas en inglés)/tomografía por emisión de positrones (abreviadamente PET por sus siglas en inglés).

La presente invención se describirá ahora a modo de ilustración y ejemplo aunque sin limitación, de acuerdo con algunas de sus realizaciones preferidas, con referencia particular a las figuras de los dibujos adjuntos.

**Figura 1:** Expresión de la proteína Trop-2 en tumores humanos. Los porcentajes de expresión de Trop-2 en tumores humanos se indican en la parte superior del panel. Los números absolutos de las muestras analizadas se indican en la parte inferior del panel.

**Figura 2:** Inducción del crecimiento celular por Trop-2.

(a) Tasas de crecimiento *in vitro* de células Igrov-1, KM12SM y MTE 4-14 transfectadas con Trop-2 de tipo natural o Trop-2 que tiene delecionada la cola citoplasmática ( $\Delta$ cyto) o mutado en el sitio de fosforilación de PKC (S303A). Las células de control corresponden a las líneas de puntos; los transfectantes de Trop-2 naturales corresponden a las líneas continuas; los transfectantes Trop-2 mutagenizados corresponden a las líneas de trazo discontinuo. Barras: errores típicos de las medias (ETM) de las mediciones.

(b) Tasas de crecimiento *in vivo* de tumores de células L (fibrosarcomas) y 293 (carcinomas). Las células transfectadas con el vector solo corresponden a líneas de puntos; los transfectantes de Trop-2 de tipo naturales corresponden a líneas continuas; los transfectantes de Trop-2 mutagenizados corresponden a las líneas de trazo discontinuo.

**Figura 3:** Análisis proteómico de las vías de señalización de Trop-2.

(a) Las células MTE 4-14 transfectadas establemente con Trop-2 o vector de control se analizaron en matrices con anticuerpos para los niveles de expresión de diversas moléculas de señalización. La tabla muestra los cambios significativos en los niveles absolutos de proteína (pan) o en los niveles de fosforilación de sitios específicos. Los datos de la columnas de color gris se refieren a aumentos (izquierda) o disminuciones (derecha) porcentuales en las células transfectadas con Trop-2 respecto a los controles: Los datos debajo de la columna P se refieren al análisis de la prueba t de los niveles de expresión de Trop-2 respecto a los controles.

(b) Análisis de transferencia de Western en paralelo.

**Figura 4:** Reconocimiento específico de Trop-2 por los anticuerpos monoclonales producidos. Análisis por citometría de flujo.

(a) Células L de fibrosarcoma de múridos (líneas finas) o células L transfectadas con Trop-2 de tipo natural (líneas gruesas) fueron incubadas con anticuerpos monoclonales anti-Trop-2. Se utilizó T16 como anticuerpo de control positivo.

(b) Células L de fibrosarcoma de múridos (líneas finas) o células L transfectadas con los por deleción de Trop-2 correspondientes a las regiones globulares o del vástago, respectivamente (líneas gruesas) fueron incubadas con anticuerpos monoclonales anti-Trop-2. La unión de los anticuerpos se detectó con un antisuero anti-ratón de cabra conjugado con el fluoróforo Alexa488.

**Figura 5:** Reconocimiento específico de Trop-2 por los anticuerpos monoclonales producidos. Análisis por microscopía confocal.

Las células epiteliales tímicas de múridos MTE 4-14 transfectadas con el gen *Trop-2* humano fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales Trop-2 indicados. La unión de los anticuerpos se detectó con un antisuero anti-ratón de cabra conjugado con el fluoróforo Alexa488. Se utilizó T16 como anticuerpo de control positivo.

**Figura 6:** Inhibición del crecimiento de los tumores tratados con los anticuerpos anti-Trop-2 indicados.

(a) Células transfectadas con el vector solo y tratadas con un anticuerpo con especificidad irrelevante (anti-dansilo) corresponden a las líneas de puntos; los transfectantes de *Trop-2* corresponden a las líneas continuas; los transfectantes de *Trop-2* tratados con anticuerpos anti-Trop-2 corresponden a las líneas de trazos discontinuos. Barras: errores típicos de las medias de las mediciones.

(b) Eficacia de inhibición del crecimiento de tumores tratados con diferentes anticuerpos anti-Trop-2. Los transfectantes de *Trop-2* tratados con un anticuerpo con especificidad irrelevante (anti-dansilo) corresponden a las líneas continuas; los transfectantes de Trop-2 tratados con anticuerpos anti-Trop-2 y RS7 corresponden a las líneas de trazo discontinuo; los transfectantes de *Trop-2* tratados con los anticuerpos anti-Trop-2 descritos en esta solicitud corresponden a las líneas de trazos discontinuos. Barras: errores típicos de las medias de las mediciones.

**Figura 7:** Inhibición del crecimiento de tumores ya crecidos avanzados, tratados con los anticuerpos anti-Trop-2 indicados comparados con tumores tratados de manera profiláctica.

(a) Eficacia de la inhibición del crecimiento de tumores (HT29 y HCT-116 U5.5) tratados con diferentes anticuerpos anti-Trop-2 de una manera profiláctica (inyección conjunta de células tumorales y de anticuerpos). Los tumores tratados con un anticuerpo con especificidad irrelevante (anti-dansilo) corresponden a las líneas de puntos; Los tumores tratados con diferentes anticuerpos anti-Trop-2 (cuadrados 2G10: triángulos 2E7) corresponden a las líneas continuas. Barras: errores típicos de las medias de las mediciones.

(b) Eficacia de inhibición del crecimiento de tumores (COLO205 y HT29) tratados con diferentes anticuerpos anti-

5 Trop-2 en una etapa avanzada. Los tumores tratados con un anticuerpo con especificidad irrelevante (anti-dansilo) corresponden a las líneas de puntos; los tumores tratados con diferentes anticuerpos anti-Trop-2 (2E7 y 2G10) corresponden a las líneas continuas. En el panel de la derecha se muestran los resultados de un tratamiento combinado con 2E7 y 2G10. Las flechas verticales indican el comienzo del tratamiento con los anticuerpos. Barras: errores típicos de las medias de las mediciones.

**Ejemplo 1: Preparación y estudio de eficacia de los anticuerpos monoclonales descritos en la presente invención.**

**Citometría de flujo**

10 Se analizó por citometría de flujo en líneas celulares la unión de anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 a la superficie de células tumorales y transfectadas (Figura 4). La tinción y análisis se llevaron a cabo esencialmente como se describen en la referencia<sup>15</sup>.

**Generación de los anticuerpos monoclonales**

15 Se sometieron ratones Balb/c a múltiples ciclos de inmunización utilizando la región extracelular completa de la molécula Trop-2 humana (nucleótidos 339-1157 de NCBI RefSeq NM\_002353)<sup>3</sup> producida por las líneas celulares de mamíferos (L y 293) o por baculovirus que contienen y expresan las construcciones correspondientes. Dichas construcciones se prepararon por amplificación por PCR del gen *Trop-2* gen con los siguientes cebadores:

HT2-sigpeptide\_EcoRI - para

5' CCCC GAATTC ATGGCTCGGGGCCCCGGCCTCGC (SEQ

ID NO: 1)

hT2-6His-XbaI-rev

5'CCCCCTCTAGATCACGTGATGGTGATGGTGATGCCCCCC

GGTGAGGCGCTTCATGGAG

(SEQ ID NO: 2)

20 Se añadió una etiqueta de 6-histidina al extremo C para permitir una purificación más fácil de la proteína. La banda de PCR se subclonó en el vector pBJI-neo para la expresión en células de mamífero o pFastBac HTA para la expresión en baculovirus (sistema de expresión de baculovirus "Bac to Bac", Invitrogen, EE.UU.). La proteína Trop-2 recombinante que se produjo de esta manera se purificó posteriormente del medio de cultivo por medio de cromatografía de afinidad en Ni-NTA agarosa (Qiagen, Holanda). Se fusionaron esplenocitos de ratones inmunizados con células de mieloma Sp2/0 o NS-0, siguiendo metodologías conocidas en la técnica<sup>14</sup>. Las células de hibridoma se seleccionaron por su reactividad específica contra las células L transfectadas con *Trop-2* y por la ausencia de reactividad contra las células L transfectadas con el vector vacío. Estos ensayos se integraron con ensayos ELISA en proteínas Trop-2 recombinantes o en porciones de ellas. En particular, se generaron varios vectores de expresión para células de mamíferos y baculovirus que expresan ya sea la región globular sola (nucleótidos 339-773) o ya sea la región de vástago sola (nucleótidos 774-1157) de la región extracelular de Trop-2, con el fin de seleccionar anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra cualquiera de las regiones (Figura 4). Las construcciones se prepararon por amplificación por PCR del gen *Trop-2* con los siguientes cebadores:

35 HT2-gl\_EcoRI- para

5' CCCC GAATTC TAAATGGCTCGGGGCCCCGGCCTCGC

(SEQ ID NO:3)

HT2-gl\_HindIII-Ap- rev

5'

GCGAAGCTTTTAGTGATGGTGATGGTGATGGCAGCGTAGGCTCAGGT

C (SEQ ID NO:4)

para la región globular;

40 HT2-st\_EcoRI- para

5'CCCC GAATTC TAAATGGCTCGGGGCCCCGGCCTCGCGC

CGCCACCGCTGCGGCTGCCGCTGCTGCTGCTGGTGCTGGCGGCGG

ATGAGCTGGTGCGCACC (SEQ ID NO:5)



HT2-st\_HindIII- rev

5'GCGAAGCTTCTAGTGATGGTGATGGTGATGCCCCCGGT  
GAGGCGCTTCATGGAG (SEQ ID NO:6)

para la región de vástago. En ambos casos se añadió una etiqueta de 6-histidina al extremo C para permitir una purificación más fácil de las proteínas recombinantes.

- 5 Posteriormente, los fragmentos fueron clonados en el vector pYFP-ΔFP para la expresión en células de mamífero o pFastBac HTA para la expresión en baculovirus.

#### **Análisis por SDS-PAGE y transferencia de Western**

- 10 Las preparaciones de anticuerpos o lisados de tejidos diana se sometieron a análisis en geles de SDS-PAGE, y luego se tiñeron con azul de Coomassie (Invitrogen, EE.UU.). Para análisis por transferencias de Western los geles se electro-transferieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios y secundarios para detectar las moléculas diana por quimioluminiscencia.

#### **Transfección de células**

Las transfecciones con construcciones que codifican Trop-2 se realizaron como se describe en la referencia<sup>15</sup> o por lipofección (Gibco-BRL, EE.UU.).

#### **15 Microscopia confocal**

- Las muestras se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 conjugados con Alexafluor-488, o con los mismos anticuerpos no conjugados revelados por un antisuero anti-ratón de cabra conjugado con Alexafluor-488. Después de la fijación en paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente y permeabilización en suero con PBS al 10% y saponina al 0,05%, las células se incubaron con los anticuerpos durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido si era necesario por una segunda incubación con el antisuero anti-ratón de cabra. Los portaobjetos se lavaron a continuación, y se montaron para su observación.

#### **Inmunohistoquímica**

Se analizaron cortes de tejidos normales y tumorales por inmunohistoquímica esencialmente como se describe en la referencia<sup>16</sup>.

#### **25 Modelos *in vivo*: Xenoinjertos en ratones atímicos.**

- Líneas celulares L o 293 transfectadas con Trop-2 o con el vector vacío de control, o células de carcinoma humano (mama, ovario, colon) que se expresan naturalmente o transfectadas con Trop-2 se inyectaron por vía subcutánea en grupos de ratones atímicos (10 animales/grupo). Para el protocolo de co-inyección (tratamiento profiláctico), el día de la inyección, se trataron los ratones IP con 200 µg de anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 o anticuerpos irrelevantes. Para el tratamiento de los tumores establecidos, ya crecidos en los animales inyectados, los ratones atímicos se trataron con 800 µg de anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 o anticuerpos irrelevantes, iniciando el tratamiento en un volumen de tumor de aproximadamente 0,1 cm<sup>3</sup>. Se administraron tres dosis más en los días 7, 15 y 22 desde el comienzo del tratamiento, como se indica. En todos los grupos el crecimiento del tumor se midió esencialmente dos veces por la semana como se indica<sup>17</sup>.

#### **35 *Secuenciación de las regiones variables de los anticuerpos monoclonales anti-Trop-2.***

- Se extrajo RNA de los hibridomas que producían los anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 de la presente invención utilizando Trizol (Invitrogen, EE.UU.). Las regiones variables tanto de la cadena pesada (VH) como ligera (LH) de los genes de inmunoglobulina se amplificaron a partir de RNA total por RT-PCR como se describe<sup>18</sup>. Los fragmentos amplificados se secuenciaron utilizando el kit de secuenciación por ciclos BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EE.UU.); los productos de reacción se analizaron en un analizador de genes de Applied Biosystems 3130xl. Las regiones FR y CDR de las cadenas VH y VL se identificaron de acuerdo con el *ImmunoGenetics Information System* (IMGT) como se describe en<sup>19</sup>.

Las regiones codificadoras (marco de lectura abierto, ORF) y las secuencias de aminoácidos correspondientes a las VH y VL de cada uno de los anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 se enumeran a continuación:

45

**VH del anticuerpo monoclonal 4F6 (línea celular de hibridoma N. PD 08019)**

**ORF (SEQ ID NO:7)**

1 CAGCTGCAGC AGTCTGGAGC TGAGGTGGTG  
 AAGCGTGGGG CTCAGTGAA GCTGTCCTGC AAGACTTCTG  
GCTTCACCTT CAGCAGTAGC TATATAAGTT  
 101 GGTTGAAGCA GAAGCCTCGA CAGAGTCTTG  
 AGTGGATTGC ATGGATTTAT GCTGGAACTG GTGGTACTAG  
 CTATAATCAG AAGTTCACAG GCAAGGCCCA  
 201 ACTGACTGTA GACACATCCT CCAGCACAGC  
 CTACATGCAA CTCAGCAGCC TGACATCTGA GGACTCTGCC  
ATCTATTACT GTGCAAGACA TAACCCTTGT  
 301 TACTATGCTA TGGATTACTG GGGTCAAGGA  
**FR1:** 1 - 69  
**CDR1:** 70 - 93  
**FR2:** 94 - 144  
**CDR2:** 145 - 168  
**FR3:** 169 - 282  
**CDR3:** 283 - 330

**Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8)**

1 DVQLEQFGAE LVRPGTSVKM SCKAAGYTFI NYWIGWVKQR  
 PGHGLEWIGD IYPGGGYTNY NEKFKGKATL TADTSSSTAY  
 MQLSSLTFED FAIYYCARGT  
 101 GGGDYWGQG  
**FR1:** 1 - 25  
**CDR1:** 26 - 33  
**FR2:** 34 - 50  
**CDR2:** 51 - 58  
**FR3:** 59 - 96  
**CDR3:** 97 - 110

*VL del anticuerpo monoclonal 4F6* (línea celular de hibridoma N. PD 08019)

**ORF (SEQ ID NO: 9)**

1 TATTGTGATC ACCCAGTCTC CAGCATCCCT  
 GTCCATGGCT ATAGGAGAAA AAGTCTCCAT CAGATGCATA  
 ACCAGCACTG ATATTGATGA TGATATGAAC  
 101 TGGTACCAGC AGAAGCCAGG GGAACCTCCT  
 AAGCTCCTTA TTTCAGAAGG CAATACTCTT CGTCCTGGAG  
 TCCCATCCCG ATTCTCCAGC AGTGGCTATG  
 201 GTACAGATTT TGT TTTTACA ATTGAAAAACA  
 TGCTCTCAGA AGATGTTGCA GATACTACT GTTTGCAAAG  
TGATAACTTG CCGTACACGT TGGAGGGGG

301 A

**FR1:** 1 - 76

**CDR1:** 77 - 94

**FR2:** 95 - 145

**CDR2:** 146 - 154

**FR3:** 155 - 261

**CDR3:** 262 - 301

**Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10)**

1 IVITQSPASL SMAIGEKVSI RCITSTDIDD DMNWYQQKPG  
 EPPKLLISEG NTLRPGVPSR FSSSGYGTDF VFTIENMLSE  
 DVADYYCLQS DNL

**FR1:** 1 - 25

**CDR1:** 26 - 31

**FR2:** 32 - 48

**CDR2:** 48 - 51

**FR3:** 52 - 87

**CDR3:** 88 - 93

*VH del anticuerpo monoclonal 2G10* (línea celular de hibridoma N. PD 08020)

**ORF (SEQ ID NO: 11)**

1 CAGCTGCAGC AGTCTGGAGC TGAGGTGGTG  
 AAGCGTGGGG CTTCAGTGAA GCTGTCTGC AAGACTTCTG  
GCTTCACCTT CAGCAGTAGC TATATAAGTT  
 101 GGTGAAGCA GAAGCCTCGA CAGAGCTTG  
 AGTGGATTGC ATGGATTAT GCTGGAACTG GTGGTACTAG  
 CTATAATCAG AAGTTCACAG GCAAGGCCCA  
 201 ACTGACTGTA GACACATCCT CCAGCACAGC  
 CTACATGCAA CTCAGCAGCC TGACATCTGA GGACTCTGCC  
 ATCTATTACT GTGCAAGACA TAACCCTTGT  
 301 TACTATGCTA TGGATTACTG GGGTCAAGGA

**FR1:** 1 - 69

**CDR1:** 70 - 93

**FR2:** 84 - 144

**CDR2:** 145 - 168

**FR3:** 169 - 282

**CDR3:** 283 - 330

**Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12)**

1 DVQLEQFGAE LVRPGTSVKM SCKAAGYTFT NYWIGWVKQR  
PGHGLEWIGD IYPGGGYTNY NEKFKGKATL TADTSSSTAY  
MQLSSLTFED FAIYYCARGT  
101 GGGDYWGQG

**FR1:** 1 - 25

**CDR1:** 26 - 33

**FR2:** 34 - 50

**CDR2:** 51 - 58

**FR3:** 59 - 96

**CDR3:** 97 - 110

**VL del anticuerpo monoclonal 2G10** (línea celular de hibridoma N. PD 08020)

**ORF (SEQ ID NO: 13)**

1 TATTGTGATC ACCCAGTCTC CAGCATCCCT GTCCATGGCT  
ATAGGAGAAA AAGTCACCAT CAGATGCATA ACCAGCACTG  
ATATTGATGA TGATATGAAC  
101 TGGTACCAGC AGAAGCCAGG GGAACCTCCT AAGCTCCTTA  
TTTCAGAAGG CAATACTCTT CGTCCTGGAG TCCCATCCCG  
ATTCTCCAGC AGTGGCTATG  
201 GTACAGATTT TGTTTTTACA ATTGAAAACA TGCTCTCAA  
GATGTTGCAG ATTACTACTG TITGCAAAGT GATAACTTGC  
CGTACACGTT CGGAGGGGGA

**FR1:** 1 - 76

**CDR1:** 77 - 94

**FR2:** 95 - 145

**CDR2:** 146 - 154

**FR3:** 155 - 261

**CDR3:** 262 - 300

**Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:14)**

1 IVITQSPASL SMAIGEKVTI RCITSTDIDD DMNWWYQKPG  
EPPKLLISEG NTLRPGVPSR FSSSGYGTDF VFTIENMLSE  
DVADYYCLQS DNL

**FR1:** 1 - 25

**CDR1:** 26 - 31

**FR2:** 32 - 48

**CDR2:** 49 - 51

**FR3:** 52 - 87

**CDR3:** 88 - 93

**VH del anticuerpo monoclonal 2EF** (línea celular de hibridoma N. PD 08021)

**ORF (SEQ ID NO: 15)**

1 CAGCTGGAGC AGTTTGGAGC TGAGCTGGTA  
 AGGCCTGGGA CTTCAGTGAA GATGTCCTGC AAGGCTGCTG  
GATACACCTT CACTAACTAC TGGATAGGTT

101 GGGTAAAGCA GAGGCCTGGA CATGGCCTTG  
 AGTGGATTGG AGATATTTAC CCTGGAGGTG GTTATACTAA  
 CTACAATGAG AAGTTCAAGG GCAAGGCCAC

201 ACTGACTGCA GACACATCCT CCAGCACAGC  
 CTACATGCAG CTCAGCAGCC TGACATTGTA GGACTTTGCC  
 ATCTATTACT GTGCAAGAGG AACTGGGGGG

301 GGGGACTACT GGGGCCAAGG G

**FR1:** 1 - 69  
**CDR1:** 70 - 93  
**FR2:** 94 - 144  
**CDR2:** 145 - 168  
**FR3:** 169 - 282  
**CDR3:** 283 - 321

**Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 16)**

1 DVQLEQFGAE LVRPGTSVKM SCKAAGYTFI NYWIGWVKQR  
 PGHGLEWIGD IYPGGGYTNY NEKFKGKATL TADTSSSTAY  
 MQLSSLTFED FAIYYCARGT

101 GGGDYWGQG

**FR1:** 1 - 25  
**CDR1:** 26 - 33  
**FR2:** 34 - 50  
**CDR2:** 51 - 58  
**FR3:** 59 - 96  
**CDR3:** 97 - 110

**VL del anticuerpo monoclonal 2EF** (línea celular de hibridoma N. PD 08021)

**ORF (SEQ ID NO: 17)**

1 GATATTGTGA TGACACAGTC TCCTGCTTCC  
 TTAGCTGTAT CTCTGGGGCA GAGGGCCACC ATCTCATGCA  
GGGCCAGCCA AAGTGTCACT ACATCTAGCT

101 ATAGTTATAT GCACTGGTAC CAACAGAAAC  
 CAGGACAGCC ACCCAAATC CTCATCAAGT ATGCATCCAA  
 CCTAGAAATGT GGGGTCCTG CCAGGTTGAG

201 TGGCAGTGGG TGTGGGACAG ACTTCACCCT  
 CAACATCCAT CCTGTGGAGG AGGAGGATAG TGCAACATAT  
 TACTGTCAAGC ACAGTCGGGA GATTCCGTAC

301 ACGTTCCGGAG GGGGA

**FR1:** 1 - 87  
**CDR1:** 88 - 107  
**FR2:** 108 - 159  
**CDR2:** 160 - 178  
**FR3:** 179 - 286  
**CDR3:** 287 - 315

**Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 18)**

1 DIVMTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASQSVS TSSYSYMHWY  
 QQKPGQPPKL LIKYASNLEC GVPARFSGSG CGTDFTLNIH  
 PVEEEDSATY YCQHSREI

**FR1:** 1 - 26

**CDR1:** 27 - 36

**FR2:** 37 - 53

**CDR2:** 53 - 55

**FR3:** 56 - 92

**CDR3:** 93 - 98

**Referencias**

5 Lista de secuencias

1. Ripani, E., Sacchetti, A., Corda, D. & Alberti, S. The human Trop-2 is a tumor-associated calcium signal transducer. *Int. J. Cancer* 76, 671-676 (1998).
2. Calabrese, G. et al. Assignment of TACSTD1 (alias TROP1, M4S1) to human chromosome 2p21 and refinement of mapping of TACSTD2 (alias TROP2, M1S1) to human chromosome 1p32 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 92, 164-5 (2001).
3. Fornaro, M. et al. Cloning of the gene encoding TROP-2, a cell-surface glycoprotein expressed by human carcinomas. *Int. J. Cancer* 62, 610-8 (1995).
4. Alberti, S. et al. Biochemical characterization of Trop-2, a cell surface molecule expressed by human carcinomas: formal proof that the monoclonal antibodies T16 and MOv-16 recognize Trop-2. *Hybridoma* 11, 539-5 (1992).
5. Fradet, Y., Cordon-Cardo, C., Whitmore, W. F., Jr., Melamed, M. R. & Old, L. J. Cell surface antigens of human bladder tumors: definition of tumor subsets by monoclonal antibodies and correlation with growth characteristics. *Cancer Res* 46, 5183-8 (1986).
6. Stein, R., Chen, S., Sharkey, R. M. & Goldenberg, D. M. Murine monoclonal antibodies raised against human non-small cell carcinoma of the lung: specificity and tumor targeting. *Cancer Res* 50, 1330-6 (1990).
7. Linnenbach, A. J. et al. Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1507-1515 (1993).
8. Ciccarelli, F., Acciarito, A. & Alberti, S. Large and diverse numbers of human diseases with HIKE mutations. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1001-7 (2000).

9. Basu, A., Goldenberg, D. M. & Stein, R. The epithelial/carcinoma antigen EGP-1, recognized by monoclonal antibody RS7-3G11, is phosphorylated on serine 303. *Int. J. Cancer* 62, 472-479 (1995).
10. De Vita, V. T., Hellman, S. & Rosenberg, S. A. *Cancer - Principles and Practice of Oncology* (eds. De Vita, V. T., Hellman, S. & Rosenberg, S. A.) (Lippincott J. B. Co., Philadelphia, 2001).
11. Velders, M. P. et al. The impact of antigen density and antibody affinity on antibody- dependent cellular cytotoxicity: relevance for immunotherapy of carcinomas. *Br.J.Cancer* 78, 478-483 (1998).
12. Johnson, B. E. & Janne, P. A. Rationale for a phase II trial of pertuzumab, a HER-2 dimerization inhibitor, in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12, 4436s-4440s (2006).
13. Oi, V. T., Morrison, S. L., Herzenberg, L. A. & Berg, P. Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 825-9 (1983).
14. Weir, D. M., Herzenberg, L. A. & Blackwell, C. C. *Handbook of experimental immunology* (eds. Eds. Weir, D. M., Herzenberg, L. A. & Blackwell, C. C.) (Plenum Press, New York, 1986).
15. Alberti, S., Nutini, M. & Herzenberg, L. A. DNA methylation prevents the amplification of TROP1, a tumor associated cell surface antigen gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5833-7 (1994).
16. Zanna, P. et al. Trop-1 is a novel cell growth stimulatory molecule that marks early stages of tumor progression. *Cancer* 110, 452-464 (2007).
17. Garofalo, A. et al. Comparative study on the metastatic behavior of human tumors in nude, beige/nude/xid and severe combined immunodeficient mice. *Invasion Metastasis* 13, 82-91 (1993).
18. Zhongde, W. et al. Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *J. Immunol. Methods* 233, 167-177 (2000).
19. Lefranc, MP. et al. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucl. Acids Res.* 37, D1006-1012 (2009).

**Listado de secuencias**

- <110> Alberti, Saverio
- <120> Anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 y sus usos en el tratamiento y diagnóstico de tumores
- 5 <130> PCT27500
- <160> 18
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 33
- 10 <212> DNA
- <213> artificial

ES 2 611 032 T3

<220>  
 <223> cebador directo del gen trop-2  
 <400> 1  
 ccccgaaattc atggctcggg gccccggcct cgc 33  
 5 <210> 2  
 <211> 58  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 10 <223> cebador inverso del gen trop-2  
 <400> 2  
 ccccctctag atcacgtgat ggtgatggtg atgcccccg gtgaggcgct tcatggag 58  
 <210> 3  
 <211> 36  
 15 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador directo del gen trop-2  
 <400> 3  
 20 ccccgaaattc taaatggctc ggggccccgg cctcgc 36  
 <210> 4  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 25 <220>  
 <223> cebador inverso del gen trop-2  
 <400> 4  
 gcgaagcttt tagtgatggt gatggtgatg gcagcgtagg ctcaggct 48  
 <210> 5  
 30 <211> 100  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador directo del gen trop-2  
 35 <400> 5  
 ccccgaaattc taaatggctc ggggccccgg cctcgcgccg .ccaccgctgc ggctgccgct 60  
 gctgctgctg gtgctggcgg cggatgagct ggtgctgacc 100  
 <210> 6  
 <211> 55  
 <212> DNA  
 40 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador inverso del gen trop-2  
 <400> 6  
 gcgaagcttc tagtgatggt gatggtgatg cccccgggtg aggcgcttca tggag 55  
 45 <210> 7  
 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 50 <223> ORF que codifica la región VH del anticuerpo monoclonal anti-trop-2 producida por la línea celular de  
 hibridoma PD08019  
 <400> 7



ES 2 611 032 T3

cagctgcagc agtctggagc tgaggtggtg aagcgtgggg cttcagtga gctgtcctgc 60  
 aagacttctg gcttcacctt cagcagtagc tatataagtt ggttgaagca gaagcctcga 120  
 cagagtcttg agtggattgc atggatttat gctggaactg gtggtactag ctataatcag 180  
 aagttcacag gcaaggccca actgactgta gacacatcct ccagcacagc ctacatgcaa 240  
 ctcagcagcc tgacatctga ggactctgcc atctattact gtgcaagaca taacccttgt 300  
 tactatgcta tggattactg ggtcaagga 330

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> secuencia peptídica codificada por el ORF que tiene la secuencia SEQ ID NO:7

<400> 8

Asp Val Gln Leu Glu Gln Phe Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

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

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

10

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Thr Gly Gly Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105

<210> 9

<211> 301

<212> DNA

15 <213> artificial

<220>

<223> ORF de la región VL del anticuerpo monoclonal anti-trop-2 producida por la línea celular de hibridoma PD08019

<400> 9

tattgtgatc acccagtctc cagcatccct gtccatggct ataggagaaa aagtctccat 60

cagatgcata accagcactg atattgatga tgatatgaac tggtaccagc agaagccagg 120

ggaacctcct aagctcctta tttcagaagg caatactctt cgtcctggag tcccatcccg 180

attctccagc agtggctatg gtacagattt tgtttttaca attgaaaaca tgctctcaga 240

agatgttgca gattactact gtttgcaaag tgataacttg ccgtacacgt tcggaggggg 300

20

a 301

<210> 10

<211> 93

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> secuencia peptídica codificada por la región de ORF que tiene la secuencia SEQ ID No:9

ES 2 611 032 T3

<400> 10

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

Lys Val Ser Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met  
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser  
35 40 45

Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser  
50 55 60

Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu Asn Met Leu Ser Glu  
65 70 75 80

Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu  
85 90

<210> 11

<211> 330

5 <212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> ORF de la región VH del anticuerpo monoclonal anti-trop-2 producida por la línea celular de hibridoma PD08020

10 <400> 11

cagctgcagc agtctggagc tgagggtggtg aagcgtgggg cttcagtga gctgtcctgc	60
aagacttctg gcttcacctt cagcagtagc tatataagtt ggttgaagca gaagcctcga	120
cagagtcttg agtggattgc atggatttat gctggaactg gtggtactag ctataatcag	180
aagttcacag gcaaggccca actgactgta gacacatcct ccagcacagc ctacatgcaa	240
ctcagcagcc tgacatctga ggactctgcc atctattact gtgcaagaca taacccttgt	300
tactatgcta tggattactg ggtcaagga	330

<210> 12

<211> 109

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<223> secuencia peptídica codificada por el ORF que tiene la secuencia SEQ ID NO:11

<400> 12

ES 2 611 032 T3

Asp Val Gln Leu Glu Gln Phe Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr  
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

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

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Gly Gly Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105

<210> 13

<211> 300

<212> DNA

5 <213> artificial

<220>

<223> ORF de la región VL del anticuerpo monoclonal anti-trop-2 producida por la línea celular de hibridoma PD08020

<400> 13

tattgtgatc acccagtctc cagcatcct gtccatggct ataggagaaa aagtcaccat 60

cagatgcata accagcactg atattgatga tgatatgaac tgggtaccagc agaagccagg 120

ggaacctcct aagctcctta tttcagaagg caatactctt cgtcctggag tcccatcccg 180

attctccagc agtggctatg gtacagattt tgtttttaca attgaaaaca tgctctcaaa 240

10 gatgttgcag attactactg tttgcaaagt gataacttgc cgtacacggt cggaggggga 300

<210> 14

<211> 93

<212> PRT

<213> artificial

15 <220>

<223> secuencia peptídica codificada por el ORF que tiene la secuencia SEQ ID NO:13

<400> 14

ES 2 611 032 T3

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

Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met  
 20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser  
 35 40 45

Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser  
 50 55 60

Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu Asn Met Leu Ser Glu  
 65 70 75 80

Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu  
 85 90

<210> 15

<211> 321

<212> DNA

5 <213> artificial

<220>

<223> ORF de la región VH del anticuerpo monoclonal anti-trop-2 producida por la línea celular de hibridoma PD08021

<400> 15

cagctggagc agtttggagc tgagctggta aggcctggga cttcagtga gatgtcctgc 60

aaggctgctg gatacacctt cactaacctac tggataggtt gggtaaagca gaggcctgga 120

catggccttg agtggattgg agatatttac cctggaggtg gttatactaa ctacaatgag 180

10 aagttcaagg gcaaggccac actgactgca gacacatcct ccagcacagc ctacatgcag 240

ctcagcagcc tgacatttga ggactttgcc atctattact gtgcaagagg aactgggggg 300

ggggactact ggggccaagg g 321

<210> 16

<211> 109

15 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> secuencia peptídica codificada por el ORF que tiene la secuencia SEQ ID NO:15

<400> 16

ES 2 611 032 T3

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

<210> 17

<211> 315

<212> DNA

5 <213> artificial

<220>

<223> ORF de la región VL del anticuerpo monoclonal anti-trop-2 producida por la línea celular de hibridoma PD08021

<400> 17

gatattgtga tgacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc	60
atctcatgca gggccagcca aagtgtcagt acatctagct atagttatat gcaactggtag	120
caacagaaac caggacagcc acccaaaactc ctcacaaagt atgcatcaa cctagaatgt	180
gggggtccctg ccaggttcag tggcagtgagg tgtgggacag acttcaccct caacatccat	240
cctgtggagg aggaggatag tgcaacatat tactgtcagc acagtcggga gattccgtac	300
acgttcggag gggga	315

10

<210> 18

<211> 98

<212> PRT

<213> artificial

15

<220>

<223> secuencia peptídica codificada por el ORF que tiene la secuencia SEQ ID NO:17

<400> 18

ES 2 611 032 T3

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser  
20 25 30

Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Cys Gly Val Pro Ala  
50 55 60

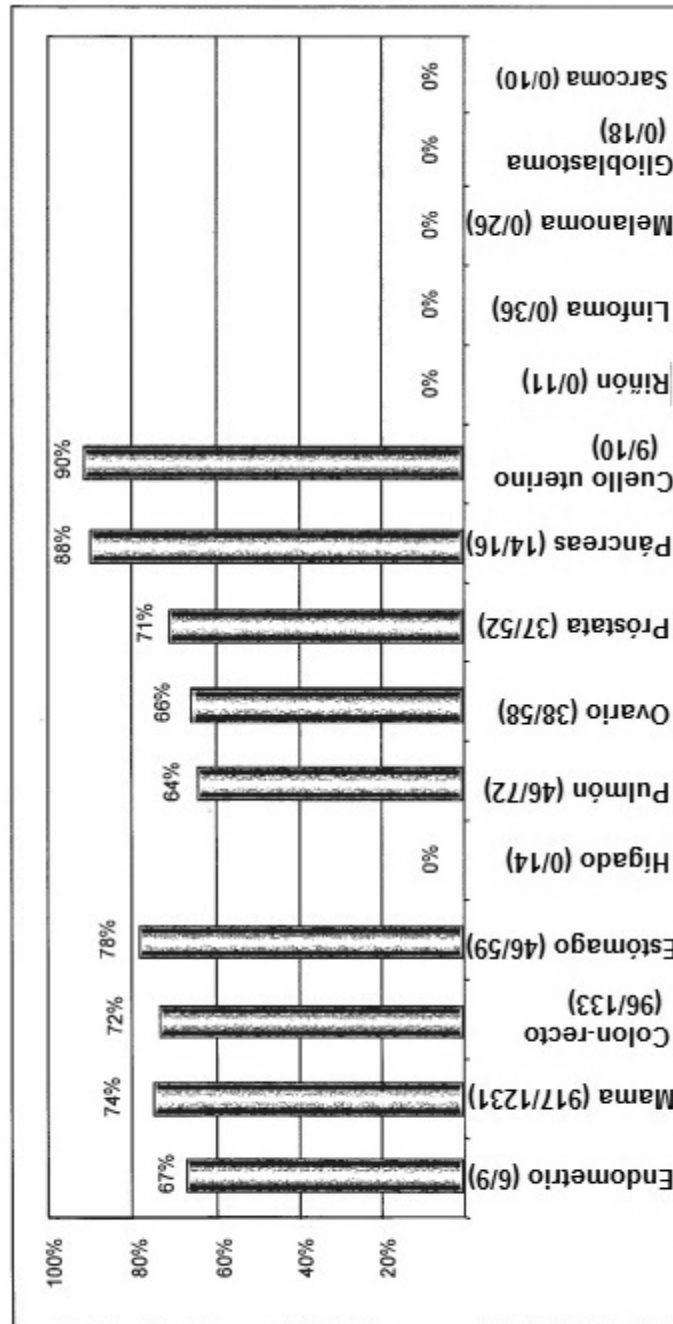
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Cys Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
85 90 95

Glu Ile

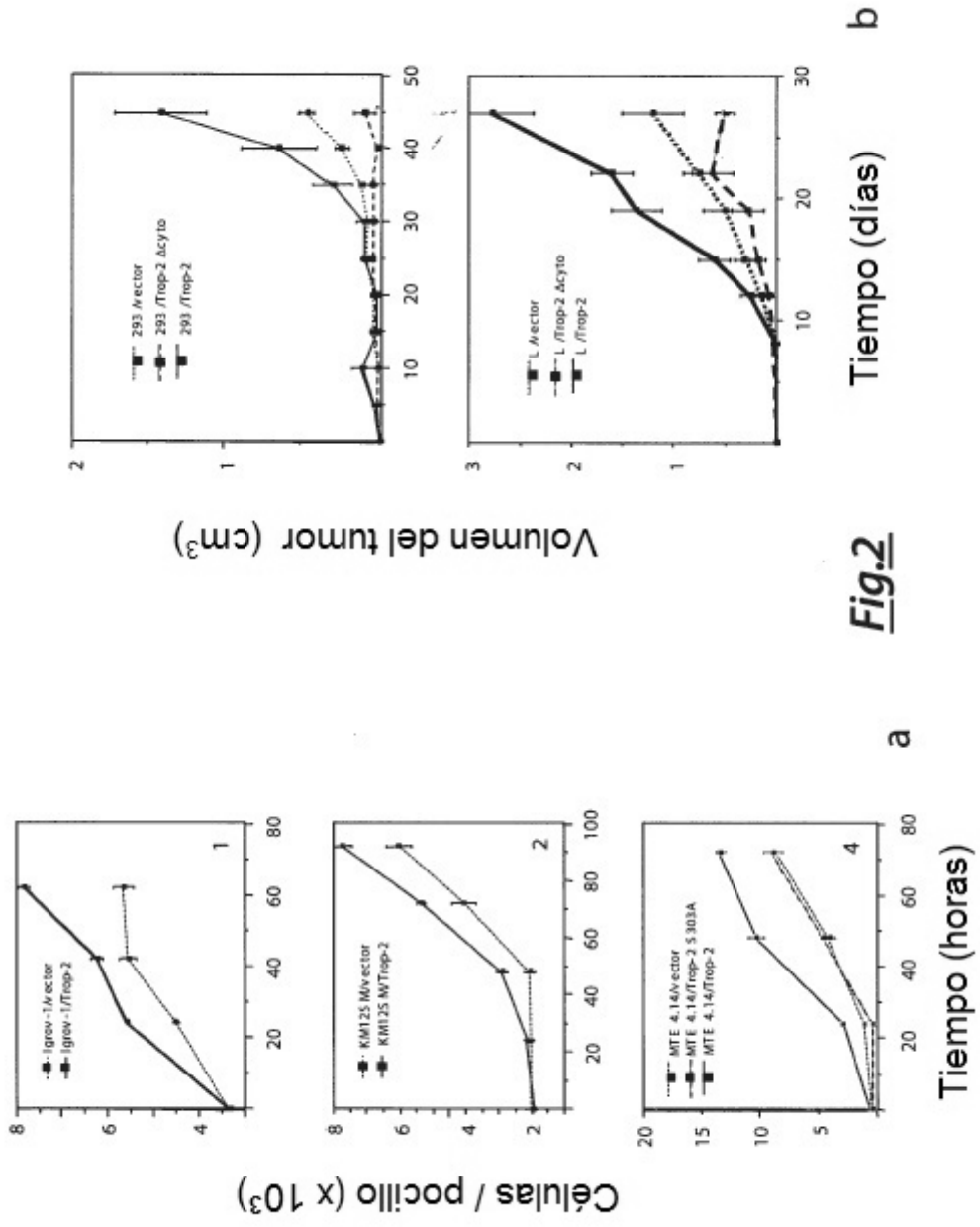
**REIVINDICACIONES**

1. Combinación que comprende, o que consiste en, anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 aislados producidos por las líneas celulares de que tienen los números de depósito PD 08020 y PD 08021.
- 5 2. Combinación de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además los anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 producidos por la línea celular de hibridoma que tiene el número de depósito PD 08019 o que consiste en los anticuerpos monoclonales anti-Trop-2 aislados producidos por las líneas celulares de hibridoma que tienen los números de depósito PD 08020, PD 08021 y PD 08019.
3. Anticuerpo monoclonal anti-Trop-2 producido por la línea celular de hibridoma que tiene el número de depósito PD 08020.
- 10 4. Anticuerpo monoclonal anti-Trop-2 producido por la línea celular de hibridoma que tiene el número de depósito PD 08021.
- 5 15 5. Composición farmacéutica que comprende, o consiste en, como ingrediente activo, una combinación como se define en cada una de las reivindicaciones 1 a 2 o un anticuerpo monoclonal anti-Trop-2 como se define en cada una de las reivindicaciones 3-4, en asociación con uno o más excipientes y/o adyuvantes que sean farmacéuticamente aceptables.
6. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en una forma aceptable para administración intraperitoneal, intravenosa, intrapleural, intravesical, intralesional o administración a través de la arteria hepática.
- 20 7. El uso de las combinaciones como las definidas en cada una de las reivindicaciones 1-2 o de un anticuerpo monoclonal anti-Trop-2 como se define en cada una de las reivindicaciones 3-4 o de una composición como la definida en cada una de las reivindicaciones 5-6 para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de tumores.
- 25 8. El uso de las combinaciones como las definidas en cada una de las reivindicaciones 1-2 o de un anticuerpo monoclonal anti-Trop-2 como el definido en cada una de las reivindicaciones 3-4 o de una composición como la definida en cada una de las reivindicaciones 5-6 para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de metástasis tumorales.
9. El uso de las combinaciones como las definidas en cada una de las reivindicaciones 1-2 o un anticuerpo monoclonal anti-Trop-2 como el definido en cada una de las reivindicaciones 3-4 para el diagnóstico *in vitro* de tumores.
- 30 10. Kit para el diagnóstico *in vitro* de tumores que comprende, o consiste en, las combinaciones como las definidas en cada una de las reivindicaciones 1-2 o del anticuerpo monoclonal anti-Trop-2 como el definido en cada una de las reivindicaciones 3-4 o de la composición como la definida en cada una de las reivindicaciones 5-6 y medios de detección en el que dichos medios de detección son moléculas etiquetas.

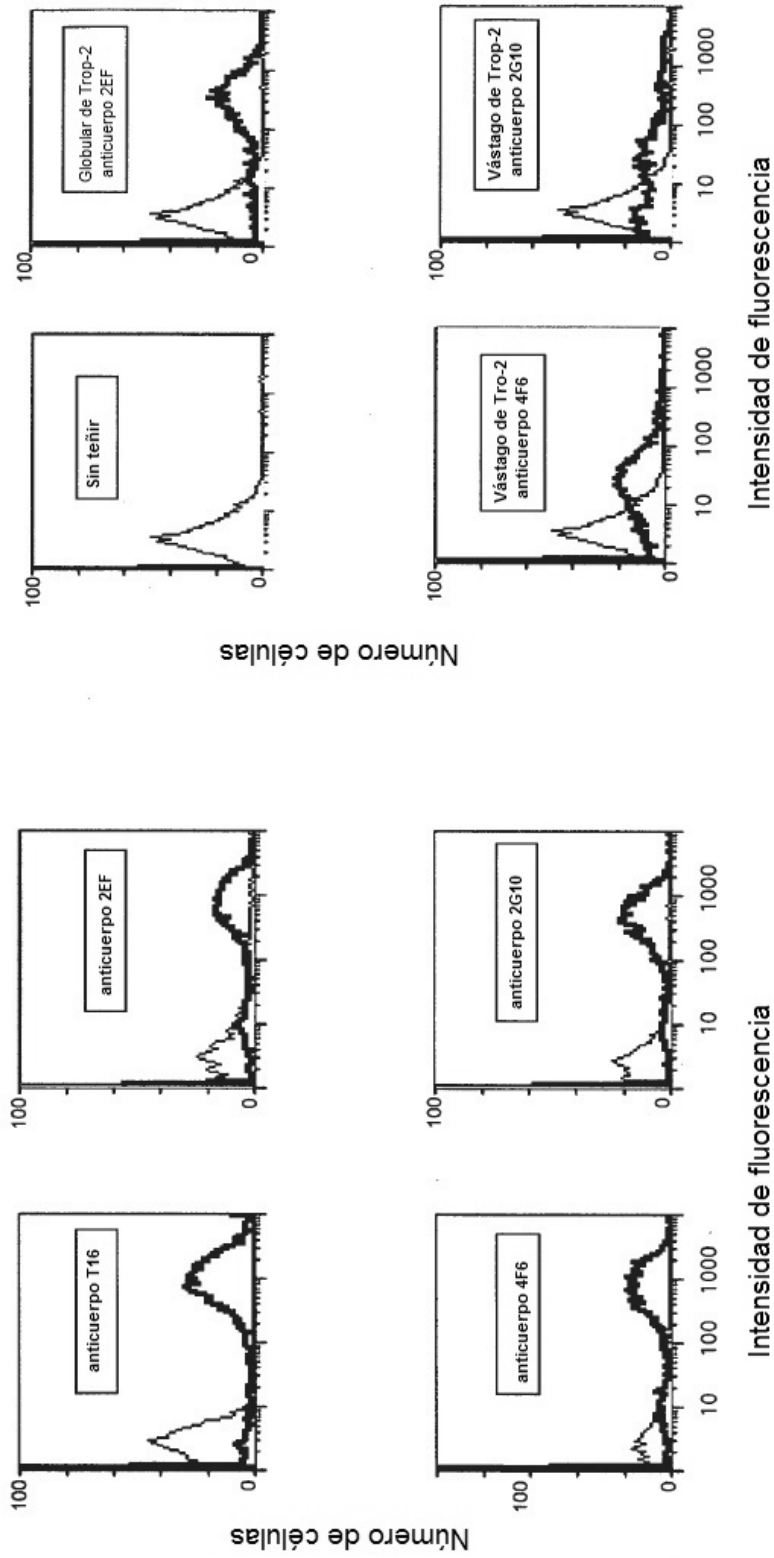


**Fig.1**





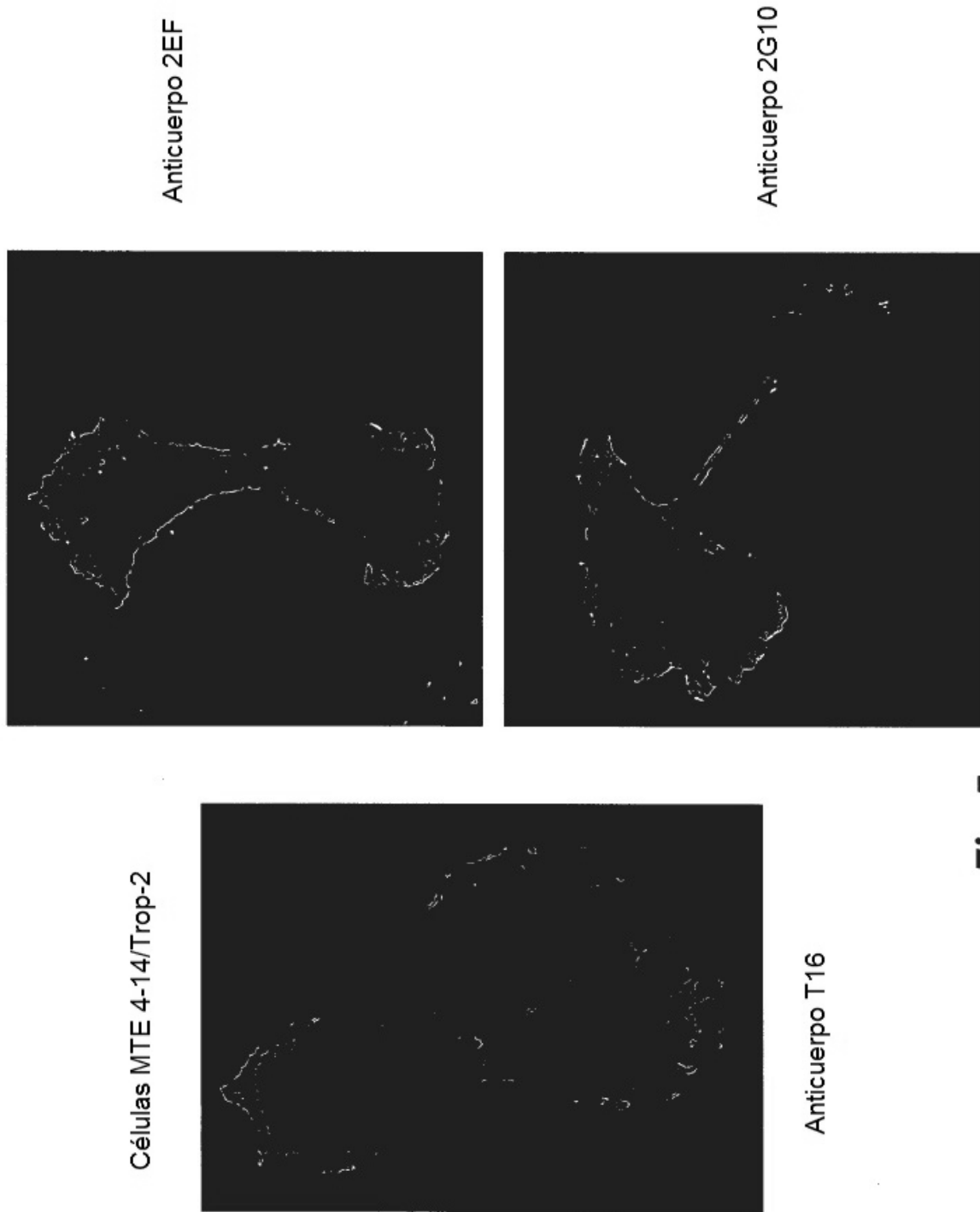




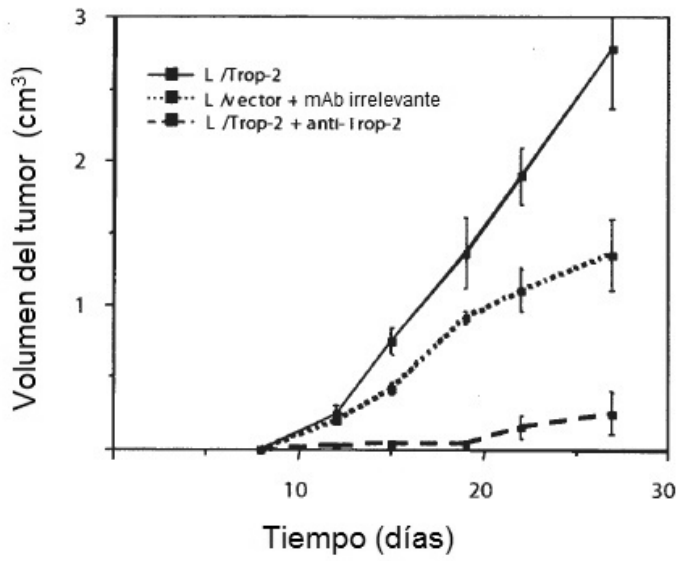
a

**Fig.4**

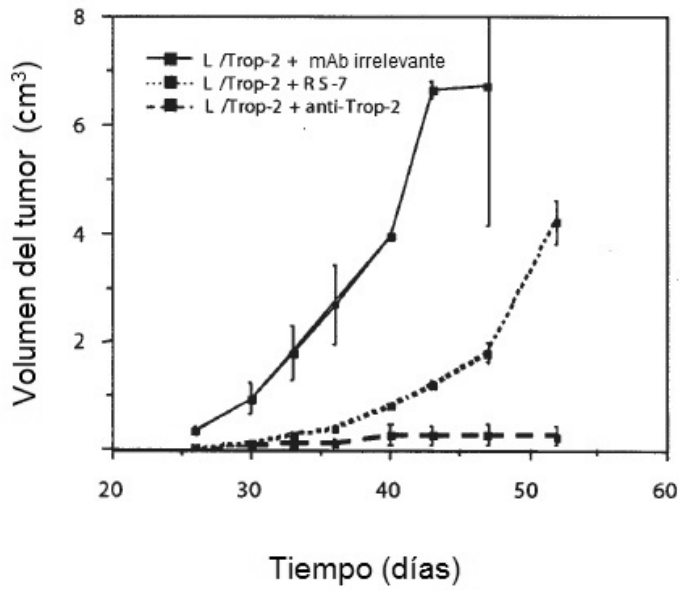
b



**Fig.5**

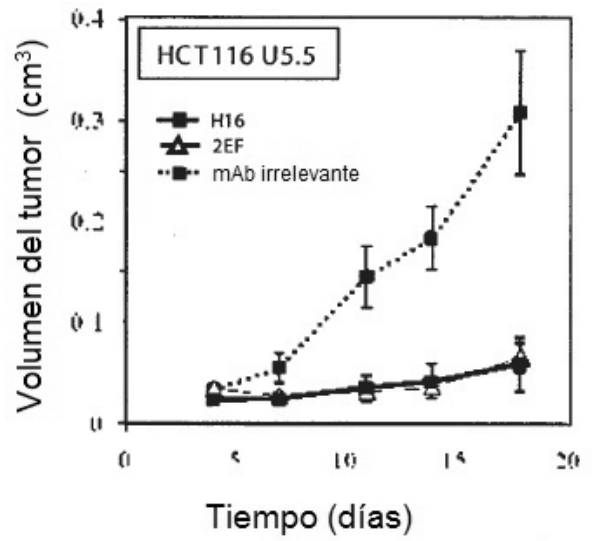
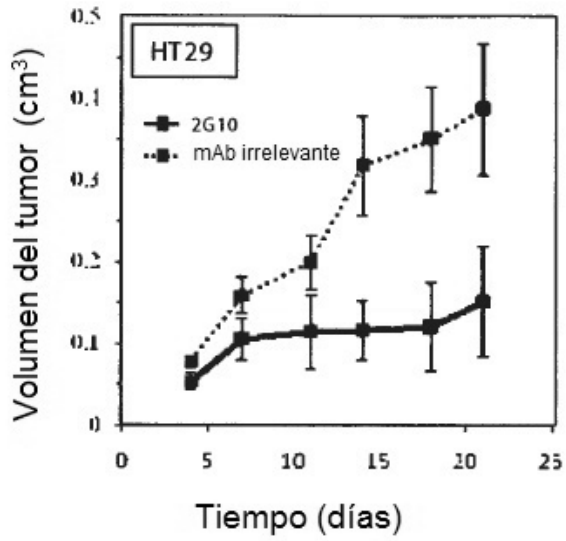


a

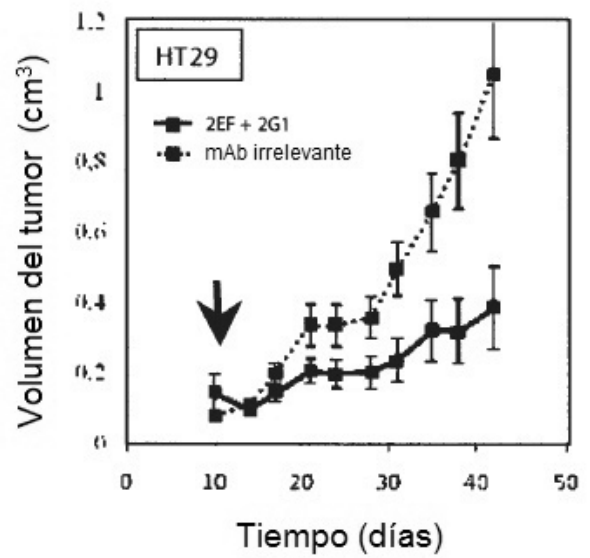
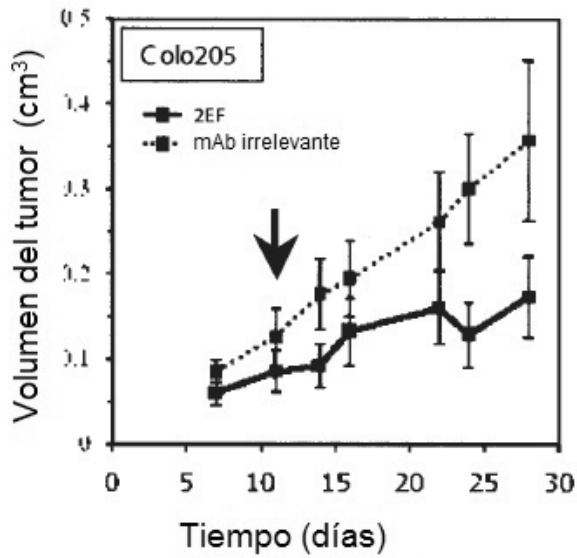


b

**Fig.6**



**a**



**Fig.7**